جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة المثنى / كلية الزراعة
قسم الإنتاج الحيواني

تأثير إستعمال المعززات الحيوية في بعض الصفات الانتاجية والمناعية والفسلجية لأسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L.

أُطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية الزراعة / جامعة المثنى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة

في العلوم الزراعية / الإنتاج الحيواني – تغذية أسماك

من قبل

أحمد راضي جبار

بإشراف

أ. د. علي حسين سلمان

1445هـ **2023 م**

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الاطروحة الموسومة بعنوان **(تأثير إستعمال المعززات الحيوية في بعض الصفات الانتاجية والمناعية والفسلجية لأسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L.)**، قد جرى تحت إشرافي في قسم الانتاج الحيواني/كلية الزراعة/جامعة المثنى، وهي جزء من متطلبات نيل درجة فلسفة دكتوراه في العلوم الزراعية/الإنتاج الحيواني.

المشرف

أ.د. علي حسين سلمان

توصية رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءاً على الشروط والتوصيات المتوافرة أرشح هذه الأطروحة للمناقشة

أ.م.د هادي عواد حسوني
رئيس لجنة الدراسات العليا
في قسم الإنتاج الحيواني
جامعة المثنى/كلية الزراعة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير استعمال ثلاث عزلات بكتيرية من مجموعة بكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus acidophilus* 4453 و*Bifidobacterium bifidum* 5144 و *Streptococcus thermophilus* 5935 كمعززات حيوية مفردة ومتعددة العزلات البكتيرية وبتخفيفين (10^{-6} و10^{-7}) لكل معزز حيوي في أداء النمو والدم والمناعة والمعايير النسيجية الشكلية للجزء الوسطي من القناة المعوية والتركيب الكيمياوي والمايكروبي لإصبعيات أسماك الكارب الشائع المرباة في حاويات عائمة تجريبية لمدة 12 أسبوع من 2022/3/3 إلى 2022/6/3 في محافظة المثنى في محطة الأبحاث والتجارب الزراعية الأولى في منطقة أم العكف التي تبعد عن نهر الفرات/ العطشان حوالي 570 م وحسب الإحداثيات N,31.32139445.189309 E.

إستعملت 288 سمكة بمعدل وزن 44±0.69 غم ووزعت عشوائياً على 16 معاملة، معاملة مقارنة A خالية من أي إضافة ومعاملة مقارنة B تحتوي على معلق الصمغ العربي وملح دارئ الفوسفات و7 معاملات معزز حيوي، المعاملة الأولى تحتوي على العزلة البكتيرية *Lactobacillus acidophilus* 4453 والمعاملة الثانية تحتوي على العزلة البكتيرية *Bifidobacterium bifidum* 5144 والمعاملة الثالثة تحتوي على العزلة البكتيرية *Streptococcus thermophilus* 5935 ، أما المعاملة الرابعة تحتوي على العزلتين *Lactobacillus acidophilus* 4453 و*Bifidobacterium bifidum* 5144 والمعاملة الخامسة فتحتوي على *Lactobacillus acidophilus* 4453 و *Streptococcus thermophilus* 5935 والمعاملة السادسة فتحتوي على *Bifidobacterium bifidum* 5144 و *Streptococcus thermophilus* 5935 أما المعاملة السابعة فتحتوي على *Lactobacillus acidophilus* 4453 و *Bifidobacterium bifidum* 5144 و *Streptococcus thermophilus* 5935 بتخفيف 10^{-6} ونفس المعاملات السبعة بتخفيف 10^{-7} بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة وكل مكرر يحتوي على 6 أسماك. حضرت عليقة قياسية بمحتوى بروتيني 29.14% وطاقة كلية 417.95 كيلو سعرة/غم، أضيفت المعززات الحيوية بمعدل 10 مل لكل 100غم من العليقة التجريبية باعتبارها مادة حاملة للمعززات الحيوية ولكلا التخفيفين. غذيت الأسماك على العلائق التجريبية بمستوى 3% و4% و5% من وزنها يومياً.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن جميع معاملات المعزز الحيوي أفضل من معاملتي المقارنة A و B وتعد معاملة المعزز الحيوي السابعة الأفضل بين المعاملات التجريبية الأخرى إذ أشارت النتائج إلى وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بينها وبين جميع المعاملات لمعظم الصفات المدروسة، إذ سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} أعلى قيمتان للزيادة الوزنية بلغتا 196.34±2.63 و189.82±0.31 غم. كما

سجلت المعاملة السابعة أعلى قيمتين لمعدل النمو اليومي إذ بلغتا 2.33±0.03 و2.25±0.003 غم/يوم وأعلى قيمتين لمعدل النمو النسبي لمعاملة المعزز الحيوي السابعة بلغتا 448.98±8.29 و426.92±2.60 % ولم تختلف هاتان القيمتان معنوياً عن قيمتي معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ بلغتا 432.31±3.12 و426.02±3.69 %، وسجلت أعلى قيمتان لمعدل النمو النوعي لصالح معاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت أعلى قيمتان لهذا المعيار بلغتا 2.02±0.01 و1.97±0.005 %/ يوم ومعاملة المعزز الحيوي السادسة 1.99.31±0.007 و1.97±0.008 %/ يوم. وسجلت معاملة المعزز الحيوي السادسة أعلى قيمتان لمعامل النمو الحراري بلغتا 0.12±0.00 و0.13±0.00% ولم تختلف هاتان القيمتان معنوياً عن قيمتي معاملة المعزز الحيوي السابعة 0.13±0.001 و0.13±0.00%، كما أن معاملة المعزز الحيوي السابعة مستمرة بتفوقها معنوياً ($p\leq0.05$) على المعاملات التجريبية الأخرى إذ سجلت أعلى قيمتان لمعامل النمو الايضي بلغتا 11.65±0.09 و11.41±0.02 غم/كغم/ يوم. وكان أفضل معدل تحويل غذائي محسوباً للأسماك المغذاة على عليقة معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 1.74±0.04 و1.73±0.04 وبكفاءة تحويل غذائي 57.30±1.56 و57.81±1.58% من وزن الغذاء المتناول وبأعلى نسبة كفاءة بروتين 1.96±0.05 و1.98±0.05.

سجلت فروق معنوية لخلايا الدم الحمر بين المعاملات التجريبية ، فحققت معاملتا المعزز الحيوي السابعة والسادسة أعلى قيمتين بلغتا للمعاملة السابعة 2.45±0.39 و2.07±0.36 10^6 خلية/ ملم^3 وللمعاملة السادسة 2.36±0.35 و1.83±0.27 10^6 خلية/ ملم^3 دون تسجيل أي فرق معنوي بينهما. كما حققت المعاملة السابعة أعلى قيمتين للهيموغلوبين بلغتا 9.55±0.45 و8.26±0.14 غم/ ديسيلتر وأعلى قيمتين لمكداس الدم 28.42±0.66 و26.50±0.99 %. ووجدت فروق معنوية في قيم خلايا الدم البيض بين المعاملات التجريبية فكانت أعلى قيمتان تعودان لمعاملة المعزز الحيوي السابعة بلغتا 214.05±1.83 و209.18±1.18 10^3/ملم^3، كما حققت أعلى قيمتان للغلوبيولين المناعي IgM بلغتا 0.0061±0.001 و0.0072±0.00 غم/لتر. حققت معاملة المعزز الحيوي السابعة أعلى قيمتان للهرمون المحفز للغدة الدرقية بلغتا 0.65±0.05 و0.62±0.04 مايكرو وحدة دولية/مل ولهرمون الثايرونين بلغتا 5.80±0.30 و5.10±0.10 نانومول/لتر ولهرمون الثايروكسين بلغتا 9.09±0.90 و8.76±0.46 نانومول/لتر. حققت معاملة المعزز الحيوي السابعة أعلى قيمتان لأداء الدم بلغتا 13.42±0.24 و12.98±0.15 ولم تختلف معنوياً عن معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت

لهذا المعيار قيمتين بلغتا 13.29±0.32 و12.71±0.24. حققت معاملة المعزز الحيوي السابعة أعلى قيم لجميع المعايير النسيجية الشكلية كسمك الطبقة المخاطية 822.50±2.50 و787.50±2.50 مايكرومتر وسمك الطبقة تحت المخاطية 126.00±0.00 و120.25±0.75 مايكرومتر وسمك الطبقة العضلية 186.25±1.25 و183.12±0.62 مايكرومتر وسمك الطبقة المصلية 66.50±1.50 و61.50±1.50 مايكرومتر وعدد الخلايا الكأسية 56.50±0.50 و55.00±1.00 وعدد الزغابات في المقطع الواحد 13.75±0.00 و12.37±0.62 وطول الزغابات 722.50±0.00 و718.12±3.12 مايكرومتر وعرض الزغابات 215.00±0.00 و205.00±0.00 مايكرومتر ، كما أنها حققت أعلى قيمتان للعد المايكروبي الكلي للقناة المعوية 2.35±0.15 و1.75±0.05*10^{-9}. نستنتج من هذه الدراسة أن استعمال المعززات الحيوية بالتوليفات المفردة والمزدوجة والثلاثية للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} في غذاء أسماك الكارب الشائع عزز كل من معايير النمو وبعض معايير الدم والمناعة وهرمونات الغدة الدرقية والمعايير النسيجية الشكلية والمايكروبية لأسماك التجربة.

قائمة المحتويات

الفقرة	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	أ, ب , ت
	الفصل الاول	1
1	المقدمة	1
	الفصل الثاني	4
2	أستعراض المصادر	4
1-2	سمكة الكارب الشائع	4
2-2	بكتيريا حامض اللبنيك	6
1-2-2	بكتيريا *Lactobacillus acidophilus*	7
2-2-2	بكتيريا *Bifidobacterium bifidum*	9
3-2-2	بكتيريا *Streptococcus thermophilus*	10
3-2	المعزز الحيوي المفرد والمتعدد الانواع البكتيرية	12
4-2	آلية عمل المعززات الحيوية في الأسماك	15
1-4-2	الأستيطان داخل القناة الهضمية للأسماك	15
2-4-2	تحسين الاستفادة من العناصر الغذائية	16
3-4-2	تحسين نمو الأسماك	17
4-4-2	التأثير على الهضم وتركيب الجسم	18
5-4-2	التأثير على الأداء المناعي والفسيولوجي للأسماك	19
6-4-2	الاستبعاد التنافسي للكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض	20
5-2	المادة الغذائية الناقلة للمعزز الحيوي	22
6-2	الصمغ العربي كعامل مغلف	24
7-2	اعتبارات مهمة في المعززات الحيوية في مجال الاستزراع السمكي	25
8-2	الدم في الأسماك	27
9-2	اداء الدم في الأسماك	30
10-2	الغلوبيولين المناعي IgM في الأسماك	31
11-2	هرمونات الغدة الدرقية في الأسماك	33
12-2	الاحياء الدقيقة المتعايشة في القناة الهضمية للأسماك	34
	الفصل الثالث	37
3	المواد و طرائق العمل	37

الفقرة	الموضوع	الصفحة
1-3	الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة	37
2-3	الأوساط والكواشف والمواد المستعملة في الدراسة	38
3-3	إجراءات تحضير المعززات الحيوية مختبرياً	39
1-3-3	اختيار العزلات البكترية	39
2-3-3	الاختبارات الكيموحيوية	39
1-2-3-3	وسط المرق المغذي Nutrient broth	39
2-2-3-3	وسط الحركة Motility medium	39
3-2-3-3	وسط مرق المثيل الاحمر – فوكس بروسكار Methyl red-Voges proskauer broth medium	40
4-2-3-3	وسط أكار النشأ Starch agar medium	40
5-2-3-3	وسط اختزال النترات السائل Nitrate reduction broth	40
6-2-3-3	وسط التربتوفان السائل Tryptophan broth medium	40
7-2-3-3	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium	40
8-2-3-3	وسط أكار الحديد ثلاثي السكرياتTriple sugar iron agar medium	41
9-2-3-3	وسط أكار اليوريا Urea agar medium	41
10-2-3-3	وسط الإدامة Maintenance medium	41
11-2-3-3	وسط الماكونكي MacConkey agar medium	41
12-2-3-3	وسط اكار الدم Blood agar medium	41
3-3-3	تحضير الكواشف والصبغات	41
1-3-3-3	كاشف فوكس بروسكار Voges –proskuer reagent	41
2-3-3-3	كاشف المثيل الأحمر Methyl Red (MR) reagent	42
3-3-3-3	كاشف لوكاس Lugols reagent	42
4-3-3-3	كاشف اختزال النترات Nitrate reduction reagent	42
5-3-3-3	عدة صبغة كرام Gram stain kit	42
4-3-3	تشخيص العزلات البكتيرية	42
1-4-3-3	الصفات الزرعية	43
1-1-4-3-3	النمو على وسط الماكونكي	43
2-1-4-3-3	النمو على وسط أكار الدم	43
2-4-3-3	الفحص المجهري المباشر	43

الفقرة	الموضوع	الصفحة
3-4-3-3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	43
1-3-4-3-3	اختبار أنتاج إنزيم الكاتاليز	43
2-3-4-3-3	اختبار الحركة Motility test	43
3-3-4-3-3	اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test	44
4-3-4-3-3	اختبار أنتاج أنزيم اليوريز Urease test	44
5-3-4-3-3	اختبار المثيل الأحمر Methyl Red test	44
6-3-4-3-3	اختبار فوكس بروسكار Voges proskauer test	44
7-3-4-3-3	اختبار الاندول Indol test	44
8-3-4-3-3	اختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test	45
9-3-4-3-3	اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	45
10-3-4-3-3	اختبار النمو على وسط أكار الحديد ثلاثي السكريات Triple sugar iron agar	45
5-3-3	اختبار التضاد الحيوي بين العزلات البكتيرية Antagonistic test	46
6-3-3	اختبار قدرة العزلات البكتيرية الثلاث على تكوين الاغشية الحيوية	46
7-3-3	اختبار حيوية بكتيريا المعززات الحيوية بعد خزنها على درجة حرارة 4 م°	46
8-3-3	خطوات تحضير المعززات الحيوية	47
1-8-3-3	تحضير المعززات الحيوية	47
2-8-3-3	تحضير العليقة التجريبية	48
3-8-3-3	إضافة المعززات الحيوية إلى معلق الصمغ العربي	51
4-8-3-3	إضافة المعززات الحيوية إلى العليقة التجريبية	51
9-3-3	أسماك التجربة	51
10-3-3	مدة الأقلمة	51
11-3-3	مكان التجربة	51
12-3-3	المعايير المدروسة	54
1-12-3-3	الزيادة الوزنية الكلية Weight Gain	54
2-12-3-3	معدل النمو اليومي Daily Growth Rate	54
3-12-3-3	معدل النمو النسبيRelative Growth Rate	54
4-12-3-3	معدل النمو النوعيSpecific growth ratio	54
5-12-3-3	معامل النمو الحراري Thermal growth coefficient	54

الفقرة	الموضوع	الصفحة
6-12-3-3	معامل النمو الايضي Metabolic growth rate	54
7-12-3-3	معدل التحويل الغذائي Food Conversion rate	55
8-12-3-3	كفاءة التحويل الغذائي Food Conversion Efficiency	55
9-12-3-3	البروتين المتناول Protein intake	55
10-12-3-3	نسبة كفاءة البروتين Protein Efficiency ratio	55
11-12-3-3	القياسات الفيزيائية والكيميائية للمياه	55
12-12-3-3	فحوصات الدم	55
13-12-3-3	أداء الدم لأسماك التجربة	56
14-12-3-3	تحضير وفحص المقاطع النسيجية	56
15-12-3-3	التحليلات الكيمياوية للعليقة التجريبية والأسماك	57
16-12-3-3	العد المايكروبي الكلي للقناة الهضمية للأسماك	58
13-3-3	الفرضيات الإحصائية Statistical hypotheses	58
أ	الفرضية الصفرية Null hypothesis	58
ب	الفرضية البديلة Alternative hypothesis	59
14-3-3	التحليل الإحصائي Statistical Analysis	59
	مخطط التجربة	60
	الفصل الرابع	61
4	النتائج والمناقشة	61
1-4	نتائج تشخيص العزلات البكتيرية	61
1-1-4	الصفات الزرعية والمجهرية	61
2-1-4	الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية الثلاث	63
2-4	اختبار التضاد الحيوي بين العزلات البكتيرية	64
3-4	اختبار قدرة العزلات البكتيرية الثلاث على تكوين الأغشية الحيوية	64
4-4	اختبار حيوية بكتيريا المعززات الحيوية بعد خزنها على درجة حرارة 4 م	65
5-4	القياسات البيئية للمياه في أحواض التربية	66
6-4	معايير النمو المدروسة	67
1-6-4	الزيادة الوزنية Weight gain	67
2-6-4	معدل النمو اليومي Daily growth rate	68
3-6-4	معدل النمو النسبي Relative growth rate	68
4-6-4	معدل النمو النوعي Specific growth rate	69
5-6-4	معامل النمو الحراري Thermal growth cofficient	76

الفقرة	الموضوع	الصفحة
6-6-4	معدل النمو الايضي Metabolic growth rate	77
7-6-4	معدل التحويل الغذائي Food conversation rate	77
8-6-4	كفاءة التحويل الغذائي Food conversation efficiency	78
9-6-4	نسبة كفاءة البروتين Protein efficiency ratio	78
7-4	بعض معايير الدم والمناعة لأسماك التجربة	92
1-7-4	معايير الدم	92
1-1-7-4	خلايا الدم الحمر RBC	92
2-1-7-4	الهيموغلوبين Hb	93
3-1-7-4	مكداس الدم PCV	93
4-1-7-4	متوسط حجم خلايا الدم الحمر MCV	94
5-1-7-4	متوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر MCH	94
6-1-7-4	متوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر MCHC	95
2-7-4	المعايير المناعية	100
1-2-7-4	خلايا الدم البيض WBC	101
2-2-7-4	الغلوبيولين المناعي Immunoglobulin IgM	101
8-4	هرمونات الغدة الدرقية	107
1-8-4	الهرمون المحفز للغدة الدرقية TSH	107
2-8-4	هرمون الثايرونين T3	107
3-8-4	هرمون الثايروكسين T4	108
9-4	أنزيمات الكبد	112
1-9-4	انزيم ناقل أمين الاسبارتيت AST	112
2-9-4	انزيم ناقل أمين الالانين ALT	112
3-9-4	انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP	113
10-4	أداء الدم لأسماك التجربة	116
11-4	المعايير النسيجية	119
1-11-4	سمك الطبقة المخاطية	119
2-11-4	سمك الطبقة تحت المخاطية	119
3-11-4	سمك الطبقة العضلية	120
4-11-4	سمك الطبقة المصلية	120
5-11-4	عدد الخلايا الكأسية	121
6-11-4	عدد الزغابات الدقيقة	121

الفقرة	الموضوع	الصفحة
7-11-4	طول الزغابات الدقيقة	122
8-11-4	عرض الزغابات الدقيقة	122
12-4	التحليل الكيميائي لأسماك التجربة	132
1-12-4	المادة الجافة	132
2-12-4	البروتين الخام	132
3-12-4	الدهن الخام	133
4-12-4	الرماد	133
13-4	العد المايكروبي الكلي للقناة المعوية للأسماك	136
	الفصل الخامس	140
5	الاستنتاجات والتوصيات	140
1-5	الاستنتاجات	140
2-5	التوصيات	141
	الفصل السادس	142
6	المصادر	142
1-6	المصادر العربية	142
2-6	المصادر الاجنبية	144
	Abstract	a,b,c

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة	37
2	الأوساط والكواشف والمواد المستعملة في الدراسة	38
3	العزلات البكتيرية المستعملة في التجربة	39
4	التوليفات البكتيرية للمعززات الحيوية	48
5	المعاملات التجريبية والتخافيف	48
6	مكونات العليقة التجريبية	49
7	التحليل الكيميائي للمواد الداخلة في تكوين العليقة التجريبية	50
8	الصفات الزرعية والمجهرية للعزلات البكتيرية على أوساط زرعية مختلفة	62
9	الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية	64
10	حيوية المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المفردة للتخفيف 10^{-6}	66
11	بعض القياسات البيئية للمياه في حوض التربية	67
12	بعض معايير النمو المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	72
13	بعض معايير النمو المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	88
14	بعض معايير الدم المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	96
15	بعض المعايير المناعية المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	103
16	هرمونات الغدة الدرقية المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	109
17	أنزيمات الكبد المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	114
18	أداء الدم المدروس (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	118
19	القياسات النسيجية الشكلية المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	124
20	التحليل الكيمياوي (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	134
21	العد المايكروبي الكلي للقناة المعوية (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة	137

قائمة الأشكال و الصور

الرقم	العنوان	الصفحة
	الاشكال	
1	الوزن النهائي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-6}	73
2	الوزن النهائي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-7}	73
3	الزيادة الوزنية لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-6}	73
4	الزيادة الوزنية لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-7}	74
5	معدل النمو اليومي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-6}	74
6	معدل النمو اليومي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-7}	74
7	معدل النمو النسبي للتخفيف 10^{-6}	75
8	معدل النمو النسبي للتخفيف 10^{-7}	75
9	معدل النمو النوعي للتخفيف 10^{-6}	75
10	معدل النمو النوعي للتخفيف 10^{-7}	76
11	معامل النمو الحراري للتخفيف 10^{-6}	89
12	معامل النمو الحراري للتخفيف 10^{-7}	89
13	معدل النمو الايضي للتخفيف 10^{-6}	89
14	معدل النمو الايضي للتخفيف 10^{-7}	90
15	معدل التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-6}	90
16	معدل التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-7}	90
17	كفاءة التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-6}	91
18	كفاءة التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-7}	91
19	نسبة كفاءة البروتين للتخفيف 10^{-6}	91
20	نسبة كفاءة البروتين للتخفيف 10^{-7}	92

قائمة الأشكال و الصور

الرقم	العنوان	الصفحة
الصور		
1	خارطة تبين موقع محطة الأبحاث والتجارب الزراعية الأولى موقع اجراء التجربة بإستعمال برنامج الخرائط Google map	52
2	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المقارنة A	125
3	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المقارنة B	125
4	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الأولى	125
5	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الثانية	126
6	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة	126
7	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الرابعة	126
8	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الخامسة	127
9	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي السادسة	127
10	مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي السابعة	127

قائمة المختصرات

ت	المختصر	المعنى باللغة الانكليزية	المعنى باللغة الانكليزية
1	CFU	Colony Forming Unit	وحدة تكوين المستعمرات
2	AST	Aspartate transaminase	أنزيم ناقل أمين الاسبارتيت
3	ALT	Alanine transaminase	أنزيم ناقل أمين الالنين
4	ALP	Alkaline Phosphatase	أنزيم الفوسفاتيز القاعدي
5	ITIS	Integrated Taxonomic Information System	نظام المعلومات التصنيفية المتكامل
6	EMP	Embden-Meyerhof-Parnas	إمبدن مايرهوف بارناس
7	FDA	Food and Drug Administration	منظمة الغذاء والدواء
8	SPP.	species plurimae	أنواع متعددة أو عدة أنواع
9	SP.	species	نوع
10	TNFα	Tumour necrosis factor α	عامل تنخر الورم α
11	(IGF)-I	Insulin-like growth factor 1	عامل النمو شبيه الأنسولين 1
12	mRNA	Messenger RNA	الحامض النووي الرايبيوزي المراسل
13	FAO	Food and Agriculture Organization	منظمة الأغذية والزراعة
14	Ln	Natural logarithm	اللوغاريتم الطبيعي
15	IgM	Immunoglobulin M	الغلوبيولين المناعي M
16	Ig	Immunoglobulin	الغلوبيولين المناعي
17	IgD	Immunoglobulin D	الغلوبيولين المناعي D
18	IgZ/IgT	Immunoglobulin zebrafish/ Immunoglobulin rainbow trout	الغلوبيولين المناعي لأسماك الزرد/ الغلوبيولين المناعي للتراوت القزحي
19	T3	Triiodothyronine (Thyronine)	الثايرونين
20	T4	Thyroxine	الثايروكسين
21	TSH	Thyroid Stimulating Hormone	الهرمون المحفز للغدة الدرقية
22	TSHb	Thyroid Stimulating Hormone Subunit Beta	الوحدة الثانوية للهرمون المحفز للغدة الدرقية
23	KI	Potassium iodide	يوديد البوتاسيوم
24	Rpm	Revolutions per minute	دورة بالدقيقة
25	PBS	Phosphate-buffered saline	ملح دارئ الفوسفات
26	AOAC	Association of Official Analytical Chemists	رابطة الكيميائيين التحليليين الرسميين
27	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	إيثيلين ثنائي الأمين رباعي حمض الخليك
28	BP	Blood performance	إداء الدم
29	Hb	Hemoglobin	الهيموغلوبين
30	Ht	Hematocrit	مكداس الدم
31	RBC	Red Blood Cells	خلايا الدم الحمر
32	WBC	White Blood Cells	خلايا الدم البيض
33	TSP	Total Serum Protein	بروتينات مصل الدم الكلية
34	MPN	Most Probable Number	العدد الاكثر أحتمالاً
35	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences	الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية(
36	CRD	Complete Random Design	التصميم العشوائي الكامل
37	YiJK	قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملة i	
38	μ	المتوسط العام للصفة المدروسة	
39	Ai	تأثير العامل الأول	
40	Bj	تأثير العامل الثاني	
42	PCV	Packed Cell Volume	خلايا الدم المرصوصة
43	MCV	Mean corpuscular volume	متوسط حجم خلايا الدم الحمراء
44	MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	متوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر

الفصل الاول

1- المقدمة

يعد الاستزراع السمكي من القطاعات الزراعية الواعدة في إنتاج الغذاء إذ يساهم بحوالي النصف من الانتاج السمكي العالمي (Shefat and Hossain,2018) .وشهد الإنتاج السمكي في العالم زيادة سريعة وتضاعف خلال العقد الماضي بسبب توسع وتنوع وتكثيف أنشطة الاستزراع السمكي (FAO,2018)، كما نتج عن التوسع السريع في الاستزراع السمكي زيادة انتشار الأمراض الناتجة عن كثافات الاستزراع الكبيرة وظروف الإجهاد التي تعد العامل المسبب لأنتشار مسببات الأمراض (Al-Faragi and Sundus,2012) الأمر الذي يؤدي إلى حدوث خسائر اقتصادية كبيرة في تلك المشاريع (Aly,2013).

إن استعمال المواد الكيميائية والمضادات الحيوية تؤثر سلبًا في الأسماك والبيئة فضلاً عن إنتاج مسببات مرضية مقاومة للمضادات الحيوية وتثبيط المناعة وتسبب ضرر للبكتيريا المعوية النافعة (Reda وآخرون،2013)، مما دعت الحاجة إلى استعمال مواد أو منتجات بديلة عن المضادات الحياتية باهظة الثمن تتميز بقدرتها على إعطاء الكائن الحي القدرة على مقاومة الإمراض فضلاً عن دورها في تحسين جودة المياه والأداء الفسيولوجي والغذائي للأسماك الامر الذي ينعكس على تحسن الإنتاج السمكي (Nimrat وآخرون,2012)،إذ توجهت الشركات المختصة بتصنيع أغذية الأسماك إلى استعمال الإضافات الوظيفية والتي أصبحت فيما بعد بديلاً للمضادات الحيوية والمواد الكيميائية (Yousefi وآخرون،2018)، والتي تعمل على تعزيز النمو والاستجابة المناعية والوظائف الفسيولوجية والأداء الصحي للأسماك مقارنة مع إضافات الأغذية الاعتيادية وتشمل تلك الإضافات المركبات النباتية ومضادات السموم الفطرية والمحمضات والمنشطات المناعية والخمائر والإنزيمات والمعززات الحيوية (Alemayehu وآخرون،2018).

تعرف المعززات الحيوية بأنها كائنات حية دقيقة نافعة تؤثر بشكل مفيد في فسيولوجيا العائل من خلال تحسين التوازن الغذائي والمايكروبي في الأمعاء (Geng وآخرون،2012). كما تعرف بأنها كائنات دقيقة كاملة حية أو ميتة أو جزء أو مستخلص منها والتي عند تناولها بجرعة مناسبة تعزز أداء النمو ومعدل التحويل الغذائي وزيادة مقاومة الأمراض (Hoseinifar وآخرون،2016). ويعد العالم Elie Metchnikoff (1907) أول من وصف الدور الإيجابي الذي تؤديه بعض أنواع البكتيريا بين المزارعين الذين يتناولون الحليب المحتوي على البكتيريا النافعة وأن الاعتماد على مايكروبات الغذاء

جعل من الممكن اتخاذ خطوات لتغيير الأحياء الدقيقة في أجسام الكائن الحي واستبدال الضارة منها بالأحياء النافعة. استعملت المعززات الحيوية في مجال تربية الأحياء المائية في مكافحة الأمراض وتحسين النمو وفي بعض الحالات كبديل للمضادات الحياتية إذ تتميز بقدرتها على انتاج مركبات مضادة تمنع نمو المسببات المرضية والتنافس على مواقع الارتباط والغذاء وحدوث تغييرات في النشاط الأنزيمي لمسببات الأمراض فضلاً عن دورها في التحفيز المناعي من جهة ومن جهة أخرى لها دور في تحسين الهضم وتحقيق الاستفادة من الغذاء (Khalafalla,2013). تتصف أحياء المعززات الحيوية الدقيقة بقدرتها على الالتصاق والاستيطان داخل القناة المعوية للمضيف وبقدرتها على التكاثر بأعداد كبيرة ويجب أن تكون هذه الكائنات قادرة على تحمل البيئة الحامضية للجهاز الهضمي للكائنات المضيفة (Swarnendu وآخرون،2010). يمكن تحضير المعززات الحيوية بأشكال مختلفة كالمجفدة والمجففة والمخمرة والتي تنتج بالتخمير مع مدة صلاحية مختلفة (Ashraf,2000). سميت بكتيريا حامض اللبنيك بهذا الاسم كونها تنتج حامض اللبنيك من السكريات بعملية التخمر ضمن مسار التحلل السكري اللاهوائي Homo-lactic fermentation (Tamime and Robinson,1999) والذي يعمل كمادة حافظة إذ اعتمدت هذه الطريقة قديماً قبل عمليتي التعقيم والبسترة لحفظ الأغذية ومنع تلفها بفعل الدفاعات الطبيعية لبكتيريا حامض اللبنيك (Aattour وآخرون،2002). تمتلك بكتيريا حامض اللبنيك العديد من الصفات تجعل منها معززات حيوية مناسبة إذ يمكن أن تعد بدائل للمضادات الحيوية في أغذية الحيوانات المصنعة كما تعد آمنة عند استعمالها مع مقدرتها على انتاج العديد من المواد المثبطة لنمو الاحياء الدقيقة الاخرى كالبكتريوسين والأحماض العضوية مثل حامض اللبنيك وبيروكسيد الهيدروجين وثنائي الأسيتيل وثاني أوكسيد الكاربون وتتميز بقدرتها على تثبيط نمو المايكروبات الضارة من خلال آلية الاستبعاد التنافسية على مواقع الارتباط واستغلال العناصر الغذائية وتتصف كذلك بقدرتها على إنتاج بعض الانزيمات مثل الاميليز والبروتييز التي تحسن هضم المواد الغذائية فضلاً عن تحفيز الجهاز المناعي للحيوان (Vieco-Saiz وآخرون،2019). تعد بكتيريا حامض اللبنيك من الأحياء المجهرية المستعملة كمعزز حيوي في مجال الاستزراع المائي كما أنها تستعمر أيضاً بشكل طبيعي في أمعاء الأسماك السليمة (Iman وآخرون،2014). تنتمي معظم سلالات بكتيريا حامض اللبنيك إلى جنس *Lactobacillus* وتتميز بقدرتها على تحليل المواد العضوية واختزال الأمونيا (Nikoskelainen وآخرون،2001) وإنتاج الأحماض العضوية كحامض الفورميك وحامض الخليك وحامض اللبنيك

وبيروكسيد الهيدروجين ومركبات أخرى وتحفيز الجهاز المناعي للأسماك (Lara-Flores وآخرون،2010). وهدفت الدراسة الحالية إلى :

1- التشخيص الزرعي والمجهري والكيموحيوي للعزلات البكتيرية *Lactobacillus acidophilus* 4453 و *Bifidobacterium bifidum* 5144 و *Streptococcus thermophilus* 5935 .

2- اختبار التضاد الحيوي بين العزلات المذكورة فضلاً عن اختبار قدرتها على تكوين الاغشية الحيوية .

3- تحضير معززات حيوية مفردة ومتعددة للأنواع البكتيرية مختبرياً من العزلات المذكورة بالتخفيفين 10^{-6} و 10^{-7} CFU/ml.

4- اختبار حيوية المعززات الحيوية المحضرة مختبرياً عند خزنها على درجة حرارة 4 م°.

5- المقارنة بين تأثير التوليفات البكتيرية المفردة والمتعددة والتخفيفين المذكورين في :

أ- أداء النمو والتحويل الغذائي لأصبعيات أسماك الكارب الشائع.

ب-بعض معايير الدم والمناعة وتقييم تلك المعايير وفق معادلة أداء الدم.

ت-هرمونات الغدة الدرقية

ث-وظائف الكبد من خلال قياس تركيز انزيماته الثلاثة AST و ALT و ALP.

ج- القياسات النسيجية الشكلية لمنطقة الطيات المعوية داخل القناة الهضمية.

ح- التركيب الكيمياوي لجسم الأسماك.

خ- العد الكلي لمجتمع البكتيريا المتعايشة داخل القناة المعوية للأسماك.

الفصل الثاني

2-أستعراض المراجع

2-1- سمكة الكارب الشائع

تعرف أسماك الكارب الشائع بالعراق محلياً بأسم السمتي وهو النوع المستزرع السائد في أغلب مشاريع الأسماك في العراق (Ahmed وأخرون،2020)، وهي سمكة ذات قدرة عالية في البقاء على قيد الحياة عند الحد الحرج من الأوكسجين المذاب في الماء 3 ملغم/ لتر (السلمان،2000) كما أنها تتحمل مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح ما بين 3-35 م° (Froese and Pauly,2011)، ودرجة حامضية بحدود 6.5-9 (FAO,2009). وأشار الجبوري (2017) إلى نجاح تربيتها في مياه الابار ضمن المدى 5.59-7.46. تعد أسماك الكارب الشائع من الأسماك القارتة والتي تتغذى على النباتات المائية والإحياء القاعية كالديدان والحشرات والقشريات كما أنها تتغذى على العلائق الصناعية في مشاريع الاستزراع (Pillay and Kutty, 2005). ويمكن التعرف على هذا النوع بسهولة من خلال الزعنفة الظهرية الطويلة ومن اللوامس الموجودة بجانبي الفم (Al-Faisal وآخرون،2014). أدخلت سمكة الكارب الشائع الى العراق لأول مرة في عام 1955 إلى مزرعة أسماك الزعفرانية في مدينة بغداد (Mhaisen,1993). ويتميز هذا النوع من الأسماك بالنمو السريع والخصوبة العالية وتقبل أنواع مختلفة من الأغذية ومقاومة للأمراض وسهولة تكثيرها إصطناعياً في ظل ظروف مناسبة (Gul وآخرون، 2010).أن الموطن الأصلي لسمكة الكارب هو منطقة الدلتا الداخلية لنهر الدانوب التي يقع الجزء الأكبر منها في رومانيا في مقاطعة تولسيا مع جزء صغير منها يقع في أوكرانيا في مقاطعة أوديسا أوبلاست (Biosphere Reserves: Danube Delta,2019) وقد وجدت فيها منذ حوالي 2000 سنة إذ تشير الدراسات الحفرية إلى اكتشاف بقايا أسماك الكارب الشائع في منطقة دلتا الدانوب وهذا يدل على أن الرومان في جنوب ووسط آسيا كانوا يحتفظون بها بالأسر في أحواض كبيرة مخصصة لها إذ كانت تلك الأسماك ذات شكل طوربيدي ولون اصفر ذهبي وزوج من اللوامس حول الفم والجسم مغطى بقشور بنمط شبيه بالشبكة (Balon,2004). وتعد من الأسماك ذات التغذية القاعية إذ تلتقط غذاءها من خلال انتشارها بإرتفاع 20 سم عن القاع (Huser وآخرون،2016).وتنتشر طبيعياً بشكلها البري من منطقة تضاريس نهر الدانوب الى بحر قزوين والبحر الأسود وبحر آرال كما تنتشر في وسط اسيا وغرب سيبيريا (Kirpitchnikov,1999). وهي من الحيوانات متغيرة الحرارة

Piokilothermic animals إذ تتغير درجة حرارة أجسامها تبعاً للمكان الذي تعيش فيه (السلمان،2000)، كما تتميز بقابليتها على التأقلم مع الاختلافات في الظروف البيئية والعيش في بيئات مختلفة (عواد واحمد،2013). تعمل أسماك الكارب الشائع على تدهور صفات الأنظمة البيئية التي تعيش فيها في موسم السرء وعند النشاط التغذوي الخاص بها فهي تعمل على إعادة تعليق الرواسب في مياه الأنظمة التي تعيش فيها والتي تؤدي الى زيادة العكورة في عمود المياه مما يؤدي إلى تقليل وفرة وتنوع النباتات المائية المغمورة وسيادة العوالق النباتية في المياه (Hnatiuk, 2006 ; Hertam,2010). وذكر Fricke وآخرون (2018) فأن الاسم *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758 هو الاسم الصحيح لهذا النوع من الأسماك وهو الاسم الأصلي لها ايضاً وتصنف أسماك الكارب الشائع حسب ITIS (2018) إلى :

المملكة : الحيوانية	Kingdom : Animalia
تحت مملكة: ثنائية التناظر	Subkingdom : Bilateria
المملكة الدنيا : ثانوية الفم	Infrakingdom : Deuterostomia
الشعبة : الحبليات	Phylum : Chordata
تحت شعبة : الفقريات	Subphylum : Vertebrata
الشعبة الدنيا : الفكيات	Infraphylum : Gnathostomata
فوق صنف: شعاعية الزعانف	Superclass : Actinopterygii
صنف كاملة التعظم الحديثة	Class : Teleostei
فوق رتبة عظمية الإذن الداخلية	Superorder : Ostariophysii
رتبة الشبوطيات	Order : Cypriniformes
فوق عائلة اشباه الشبوطيات	Superfamily : Cyprinoidea
العائلة الشبوطيات	Family : Cyprinidae
الجنس شبوط	Genus : Cyprinus
النوع	Species : *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

2-2- بكتيريا حامض اللبنيك

استعمل اصطلاح بكتيريا حامض اللبنيك Lactic acid bacteria في بداية القرن العشرين كما استعملت اصطلاحات أخرى مثل بكتيريا التحميض أو البكتيريا المنتجة لحامض اللبنيك وتصنف بناءً على الشكل العام لها وطريقة تخمير سكر الكلوكوز والنمو عند درجات حرارة معينة ومدى الاستفادة من السكر(Carol and Leon,2010)، وهي مجموعة من البكتيريا التي تمتلك أوجه تشابه في الشكل العام والفعاليات الفيسيولوجية والايضية كما أنها ترتبط ارتباطًا وثيقًا فيما بينها من حيث الأساس الوراثي وهي كائنات دقيقة نافعة موجبة لصبغة كرام وغير متحركة وغير مكونة للأبواغ وغير هوائية اختيارية وهوائية إجبارية وتتصف بقدرتها على مقاومة الأوساط الحامضية وتكون أما عصوية أو كروية الشكل كما أنها تعمل على تخمير الكاربوهيدرات وإنتاج حامض اللبنيك كمنتج رئيسي لها كما تنتج مواد أخرى تضفي نكهة في الطعام وتمنع التلف وبالتالي فهي نافعة جدًا في صناعة الأغذية والألبان (Hati وآخرون،2013).تتواجد بكتيريا حامض اللبنيك في الاوساط الغنية بالعناصر الغذائية مثل المنتجات الغذائية المختلفة كالحليب واللحوم والخضروات وتوجد أيضًا في فم وأمعاء الكائنات الحية (Hayek وآخرون،2019)، وفي الجهاز الهضمي والجهاز البولي والتناسلي للإنسان والحيوان وفي التربة والمياه (Liu وآخرون،2014) وبمرور الوقت انتقلت من مواطنها الطبيعية في التربة والنباتات إلى أمعاء الثدييات والتي هي عبارة عن مستودع يضم حوالي 100 تريليون من الكائنات الحية الدقيقة التي تُسمى Microbiota (Hooper and Macpherson,2010). تستخدم بكتيريا حامض اللبنيك في العديد في عمليات تخمير الطعام وهي واحدة من أكثر الطرق التقليدية المعروفة في حفظ الطعام وتتصف بقدرتها العالية على الالتصاق والاستيطان داخل القناة الهضمية للكائنات الحية وهذه الصفة تمكنها من النمو بسهولة في بيئات مختلفة مثل منتجات الألبان والأطعمة المخمرة والخضروات (Bintsis,2018) .لا تستطيع بكتيريا حامض اللبنيك تخليق بعض مكونات السلاسل التنفسية كالسايتوكرومات والبورفيرينات وبالتالي لا يمكنها توليد الطاقة بشكل مركب ادينوسين ثلاثي الفوسفات ATP عن طريق إحداث تدرج في مستويات البروتونات في السلسلة التنفسية لذا تستحصل الطاقة بشكلATP عن طريق عملية التخمير اللاهوائي للسكريات وانتاج حامض اللبنيك كمنتج نهائي من خلال مسار Embden Meyerhof Parnas Pathway (EMP) (Kenneth,2009) ونظرًا لكونها لا تستخدم الأوكسجين في إنتاج الطاقة فإنها تنمو بحرية في الظروف اللاهوائية كما يمكنها النمو أيضًا في وجود الأوكسجين بدون أن تواجه أي مشكلة لإمتلاكها القدرة على حماية نفسها من الضرر التأكسدي بفعل مركبات الأوكسجين الثانوية كبيروكسيد الهيدروجين الذي ينتج من استعمال الأوكسجين في التنفس Gravier-Hernandez) and Gil-del Valle,2018) عن طريق انتاجها انزيمي Catalase و peroxidase واللذان

يعملان على تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى الماء والأوكسجين وبالتالي حماية الخلية البكتيرية من الضرر التأكسدي (Chelikani واخرون،2004). تقسم بكتيريا حامض اللبنيك الى أجناس رئيسية وهي *Aerococcus* و*Bifidobacterium* و*Carnobacterium* و*Enterococcus* و *Lactobacillus* و*Leuconostoc* و*Lactococcus* و*Pediococcus* و*Streptococcus* و *Tetragenecoccus* و*Vagococcus* ، كما تقسم كل منها الى أنواع أساسية وأنواع ثانوية وسلالات (Erkmen,2022). تستطيع بكتيريا حامض اللبنيك مقاومة الظروف الداخلية للقناة الهضمية والاستيطان بها مثل مقاومة مستويات منخفضة من الحموضة وأملاح المرارة (Colombo وآخرون،2018). تلعب بكتيريا حامض اللبنيك في الاستزراع السمكي دوراً مهماً إذ تعمل على تعزيز النمو والإستجابة المناعية ومقاومة الأمراض وتنظيم التوازن المايكروبي داخل القناة الهضمية وتثبيط مسببات الأمراض(Zuo وآخرون،2018 ; Hoseinifar وآخرون،2019). وتعد من أكثر الكائنات الحية الدقيقة استعمالاً في تحضير المعززات الحيوية (Ringo وآخرون،2018) إذ توجد بأعداد كبيرة في القناة الهضمية للحيوانات السليمة وحسب منظمة الدواء والغذاء (FDA) تعتبر المعززات الحيوية أمنة من حيث الاستعمال وتعمل على تعزيز نمو الأسماك والبقاء على قيد الحياة وتحقيق الاستفادة من الغذاء وتقليل الاضطرابات المعوية وتثبيط دور العوامل المضادة للتغذية الموجودة في اغذية الأسماك (Giri وآخرون،2013). تنتج بكتيريا حامض اللبنيك مجموعة من الفيتامينات الضرورية للعديد من العمليات البيولوجية التي تحدث في جميع الكائنات الحية والتي تتضمن مجموعتين الاولى مجموعة الفيتامينات الذائبة في الدهون وتشمل فيتامين A وD وE وK، والثانية مجموعة الفيتامينات الذائبة في الماء وتشمل فيتامين C ومجموعة فيتامينات B مثل الثايمين والرايبوفلافين والنياسين وحامض البانتوثنيك والبايرودوكسين والبايوتين وحامض الفوليك والكوبالامين (Leblanc وآخرون،2013)، كما تتميز بأنتاجها لمجموعة من المنتجات الايضية الثانوية كأنزيم البروتييز والببتيديز واليوريز واللايبيز والاميليز والايستريز ومجموعة الانزيمات المحللة للسكريات المتعددة (Tallapragada وآخرون،2018)، كما تتصف بإنتاجها لبعض الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة مثل كحامض اللبنيك والخليك والبروبيونيك والبيوتريك (Hati وآخرون،2019).

واهم أنواع بكتيريا حامض اللبنيك التي تستعمل في تحضير المعززات الحيوية هي :

2-2-1- بكتيريا *Lactobacillus acidophilus*

اكتشف العالم Beijerinck (1901) جنس بكتيريا *Lactobacillus* وسميت بإسم النوع acidophilus أي بمعنى المحبة للحموضة إذ أنها عزلت من بيئات حامضية كالقناة الهضمية للإنسان والحيوانات، وهي بكتيريا غير متحركة وموجبة لصبغة كرام ولا تنتج ابواغ وذات شكل أما

دائري أو عصوي وتنتج هذه البكتيريا حامض اللبنيك كناتج نهائي لعملية الايض الغذائي التخميري (Anonymous,2010). تعيش هذه البكتيريا ضمن أس هيدروجيني 4–5 أو اقل من ذلك (Ivanova وآخرون،2000)، وتنمو عند درجة حرارة 30–45 م° وهذا ما يجعلها ذات قابلية للعيش في درجات حرارة عالية (Gopal,2011) وتتصف بقدرتها على مقاومة حموضة الجهاز الهضمي إذ توجد هذه البكتيريا في بيئات مختلفة كمنتجات الألبان والجهاز الهضمي للأنسان(Ivanova وآخرون،2000)، وتقوم بأنتاج كميات كبيرة من حامض اللبنيك وتتصف سلالات تلك البكتيريا بخصائص المعززات الحيوية لذا فإنها تستخدم تجارياً في الصناعات الغذائية وبالأخص في صناعة منتجات الالبان وفي الغالب تستعمل مع بكتيريا *Streptococcus thermophilus* او مع*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* في إنتاج الزبادي من النوع الحامضي المعروف بإسم acidophiline (Fijan,2014).تنتج بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* اغلب البكتريوسينات وهي ببتيدات مستقرة حرارياً ولا تعتبر مضادات حياتية وذات كتلة جزيئية منخفضة تمنحها خاصية مضادة للمايكروبات الضارة (Chumchalova وآخرون،2004). كما انها تمثل الكاربوهيدرات عن طريق التخمير المتماثل وتتميز بقدرتها على تخمير الكلوكوز والمالتوز وإنتاج بعض الأحماض العضوية مثل mannitol و fructooligosaccharides و inulin (Liong and Shah,2005)، ويحفز إنتاج حامض اللبنيك بواسطتها إنتاج حامض اللبنيك بواسطة بكتيريا *Bifidobacterium bifidum* كما أن نشاطها المحلل للببتيدات يحفز إنتاج حامض اللبنيك بواسطة *Bifidobacterium bifidum* و *Bifidobacterium longum* داخل القناة الهضمية للمضيف (Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis,2014). أثبت هذا النوع من البكتيريا فعاليته كمعزز حيوي في مجال الاستزراع السمكي إذ حققت أعلى معدلات النمو واستهلاك الغذاء وتحويل الغذاء واقصاء اكثر فعالية ضد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* مقارنة مع مجموعة المقارنة لصغار أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* (Ayyat وآخرون،2014)، وسجل افضل أداء للنمو واعلى معدل للزيادة الوزنية ووزن الجسم النهائي ومعدل النمو النوعي ليافعات أسماك الجري الافريقي *Clarias gariepinus* في العلائق التي تحتوي على اقل مستوى 0.5 غم/كغم من المعزز الحيوي المحضر من خليط من بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* مقارنة

مع المستويات الاخرى (1غم/كغم و1.5غم/كغم و2غم /كغم) (Ayoola وآخرون،2013). كما انها زادت من معدل البقاء ليرقات أسماك الجري الافريقي (Dennis and Uchenna,2016).

إن إضافة بكتيريا المعزز الحيوي *L. acidophilus* بمستويات مختلفة أدت إلى تحسين الزيادة الوزنية ومعدل النمو النوعي ومعدل التحويل الغذائي لأسماك الذيل السيفي *Xiphophorus hellerii* مقارنة مع عليقة المقارنة (Hoseinifar وآخرون،2014).

2-2-2- بكتيريا *Bifidobacterium bifidum*

عزلت بكتيريا *Bifidobacterium* من قبل العالم Tissier عام (1899) من براز الاطفال الرضع وهي بكتيريا غير متحركة لا هوائية موجبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ ولا تنتج الغازات خلال نموها ومنتجة للأحماض وذات اشكال مختلفة إذ ربما تكون بشكل عصيات منحنية قصيرة أو طويلة غير منتظمة أو بشكل قضبان متفرعة يشبه حرف Y وكانت تسمى بإسم *Bacillus bifidus* ومن ثم سميت بأسم *Bifidobacterium bifidum* (Tannock,2010). تتواجد هذه البكتيريا بشكل رئيسي في القناة الهضمية للإنسان والحيوان وفي منتجات الألبان (Mustafa,2016)، وتمتلك القدرة على إنتاج الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة والفيتامينات والأحماض العضوية كحامض اللبنيك والخليك والتي تعد مصدر للطاقة الممثلة من الطبقة المخاطية في الأمعاء كما أنها تقلل من حامضية الأمعاء وتشترك في هضم السكريات المحدودة Oligosaccharides ولا تنتج اي غازات بشكل عرضي وزيادة امتصاص الكالسيوم والمغنيسيوم إضافة الى أنها ذات فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم المرضية السالبة لصبغة كرام (الخفاجي، 2014 ; Mehdi وآخرون،2015). وتتميز بإنتاجها للبكتريوسينات والتي تكون ذات فعالية أما مثبطة bacteriostatic أو قاتلة bactericidal ضد الأنواع الجرثومية الاخرى (Balciunas وآخرون،2013)، فضلاً عن أنتاج مواد أخرى مثل بيروكسيد الهيدروجين وحامض الفورميك وحامض البروبيونك علاوة على انتاجها مادة البفدين (Bifidin) وهو نوع من البكتريوسين والذي يمتلك فعالية مشابها للمضادات الحياتية وقتل المسببات المرضية (Mustafa,2016). ودرجة الحرارة المثالية لنموها تتراوح ما بين 25-45 مْ وأقل درجة حرارة تستطيع النمو عندها تتراوح ما بين 25-28 مْ، والحد الأقصى من درجات الحرارة الذي تنمو عنده يتراوح ما بين 43-45 مْ، وتستطيع النمو عند اس هيدروجيني بحدود 6.5-7 (Shah,2011) .وتتميز كذلك بقدرتها على تحمل الحامض المعدي والأملاح الصفراوية وبمجرد دخولها القولون فإنها ترتبط

بالخلايا الظهارية والطبقة المخاطية المعوية (Watson and Preedy,2013). تنتج معظم أنواع بكتيريا *Bifidobacterium spp.* العديد من الفيتامينات مثل الثيامين والرايبوفلافين والبيريدوكسين وحامض الفوليك والكوبالامين وحامض الأسكوربيك وحامض النيكوتينيك وحامض السكسينيك والبايوتين وتعتبر هذه الفيتامينات مهمة للحيوان أو الإنسان وإنتاج هذه الفيتامينات يعد مناسباً لحاجة المضيف.

إن هذه البكتيريا تستطيع العيش بوجود كل من الأوكسجين وثنائي اوكسيد الكاربون (Shah,2011)، ولا تنتج الأمينات الأليفاتية أو كبريتيد الهيدروجين أو النتريت كما أنها تقوم بأنتاج بعض إنزيمات الجهاز الهضمي مثل casein phosphatase وlysozyme (Jonathan,2006). وتنتج بعض سلالات هذه البكتيريا مواد دهنية ذات فعالية تثبطية لبكتيريا *E. coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Yersinia pseudotuberculosis* و *Staphylococcus aureus*. وتعد أنواع بكتيريا *Bifidobacterium spp.* و Lactobacillus spp. من أكثر الاحياء المجهرية استعمالاً في تصنيع المعززات الحيوية (Watson and Preedy,2013).إذ وجد أن أغذية صغار أسماك التراوت القزحي *Oncorhynchus mykiss* التي تحتوي على أقل تركيز من السلالتين *Bifidobacterium animalis* PTCC-1631 المعزولة من فضلات الأسماك و *Bifidobacterium lactis* PTCC-1736 المعزولة من الزبادي ($1*10^7$ CFU g^{-1}) حققت أعلى معدل للنمو والاستفادة من الغذاء وتحسن الهضم واقل معدل لمعامل التحويل الغذائي مع باقي المعاملات التجريبية (Sahandi وآخرون،2018). وحقق مزيج *Bifidobacterium bifidum* و *Saccharomyces cerevisiae* و*Lactobacillus acidophilus* في غذاء اصبعيات أسماك البلطي النيلي اعلى استهلاك وتحويل للغذاء وأعلى معدلات النمو مقارنة مع مجموعة المقارنة (Ayyat وآخرون،2014). وأن هذا النوع من البكتيريا أقل الانواع البكتيرية استعمالاً مع الأغذية أو مع مياه أنظمة تربية الأسماك والمحار (Ringo,2019).

2-2-3-بكتيريا *Streptococcus thermophilus*

هي بكتيريا موجبة لصبغة كرام وغير متحركة تكون بشكل خلايا كروية أو بيضوية الشكل بهيئة أزواج أو في سلاسل قصيرة وبعضها يمكن أن يكون طويلًا جدًا كما أنها محبة للحرارة إذ أن درجة الحرارة المثالية لنموها 42 م° كما أنها بكتيريا لا هوائية ويمكنها العيش بوجود الهواء وتنتمي

إلى مجموعة بكتيريا salivarius التي تضم *S. salivarius* و*S. vestibularis* (Bai وآخرون،2016). وتعتبر النوع الوحيد من مجموعة *Streptococcus* المستخدم في صناعة الأغذية إذ أنها كانت تستهلك من قبل الانسان لوقت طويل جداً دون أن تسبب أي مرض وقد صرحت منظمة الغذاء والدواء FDA بأن استخدامها امناً كما انها تستخدم كبكتيريا بادئة في عمليات تصنيع الزبادي(Uriot وآخرون،2017) من خلال عملية التحميض السريع بفعل إنتاج حامض اللبنيك كما أنها تقوم بأنتاج منتجات التخمير الثانوية مثل formate او acetaldehyde أو تشترك بشكل مباشر في إضفاء الصفات النسجية والعطرية للمنتجات المخمرة (Uriot واخرون،2017).وتشير الدراسات الجينية إلى أنها تخصصت من أنواع *Streptococcus* المرضية منذ حوالي 7000 سنة مضت (Delorme وآخرون،2010).

إن درجة الحرارة المثالية لنموها تتراوح من 40–45 م° كما أنها تستطيع أن تنمو ضمن مدى من درجات الحرارة يتراوح من 20–25 م° وأقصى مدى من درجات الحرارة يتراوح من 47–50 م° وتقوم بتخمير عدد محدود من السكريات بما في ذلك الكلوكوز والفركتوز واللاكتوز والسكروز كما أنها لا تخمر سكر الكالاكتوز وتتميز أيضًا بأنها حساسة نسبيًا للمضادات الحيوية والمطهرات ولديها فعالية منخفضة لتحليل البروتينات (Harnett وآخرون،2011). وتتصف بأمتلاكها القدرة على إنتاج مواد نشطة بيولوجيًا كالسايتوكينات المحفزة للالتهابات والمناعة ومضادات الأكسدة وتحفيز الجهاز المناعي للقناة الهضمية (Del Carmen وآخرون،2014). وتنتج البكتريوسينات المضادة لجميع المايكروبات بما فيها البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Aslam وآخرون،2011). تتميز بكتيريا *S. thermophilus* ببعض الخصائص تجعل منها معززاً حيوياً فعالاً وهي القدرة على مقاومة ظروف القناة الهضمية وعبورها من خلالها والإلتصاق بالخلايا الطلائية المعوية (Elli وآخرون،2006). وتتصف بصفات أخرى إذ أنها كارهة للماء ولها القدرة على تفكيك أملاح الصفراء وزيادة فعالية إنزيم β-Galactosidase كما تتميز بقدرتها على مقاومة الحواجز البايولوجية كالعصير المعدي وأملاح الصفراء (Sreekumar and Hosono, 2000 ; Vinderola and Reinheimer 2003). استعملت بكتيريا *Streptococcus thermophilus* كمعزز حيوي في أغذية الحيوانات المزرعية على الرغم من عدم استخدامها كمعزز حيوي بشكل شائع إلا أنها تمتلك القدرة على تحفيز الاستجابة المناعية (Harnett وآخرون،2011). إن استعمال تلك البكتيريا كمعزز حيوي في مجال الاستزراع السمكي قليل جداً إذ اختبر تأثيرها من قبل

Ayyat وآخرون (2014) مع مزيج من خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* وبكتيريا *Lactobacillus acidophilus* و*Bifidobacterium bifidum* على إصبعيات أسماك البلطي النيلي إذ حققت جميع العلائق المحتوية على المعزز الحيوي المكون من المزيج المذكور أعلى معدلات النمو واستهلاك وتحويل الغذاء وإقصاء أكثر فعالية ضد بكتيريا *Aeromonas hydrophila*. ويمكن تحقيق افضل أداء لبكتيريا *Streptococcus thermophilus* مع أحد الانواع البكتيرية الاخرى *Bifidobacterium bifidum* أو *Lactobacillus plantarum* أو *Lactobacillus paracasei* في توليفة المعززات الحيوية (Nopchinda وآخرون،2002).

2-3- المعزز الحيوي المفرد والمتعدد الانواع البكتيرية

تستعمل المعززات الحيوية في مجال الاستزراع السمكي أما بشكل سلالات أو أنواع مفردة أو بشكل مزيج من عدة أنواع من الكائنات الحية الدقيقة مع المستخلصات النباتية أو خلاصة الخمائر (Shefat,2018). ركزت معظم الدراسات في مجال الاستزراع السمكي على استعمال المعززات الحيوية المكونة من نوع واحد من الاحياء المجهرية إلا أن المعززات الحيوية المتكونة من عدة أنواع من الكائنات الحية الدقيقة تعد أكثر فائدة للأستزراع السمكي (Subedi and Shrestha,2020). كما تتميز تلك المعززات بكونها أكثر فعالية في مجال الاستزراع السمكي (Pannu وآخرون،2014). ذكر Jha وآخرون (2014) إلى وجود تأثيرات معنوية للمعززات الحيوية متعددة السلالات على معدلي النمو والبقاء لأسماك الروهو *Labeo rohita* في مرحلتي التفقيس واليرقات، وأشار Hamka وآخرون (2020) إن استعمال المعزز الحيوي ذو السلالتين *Pediococcus pentosaceus* E2211 و*Bacillus megaterium* PTB 1.4 كان ذا نتيجة أفضل من المعزز الحيوي المفرد من إحدى السلالتين المذكورتين في أسماك الجري الافريقي. وفي أختبر Doan وآخرون (2018) تأثير المعزز الحيوي المتكون من مزيج سلالتي *Bacillus velezensis* H3.1 و*Lactobacillus plantarum* N11 والمعززات الحيوية المفردة المتكونة من كل سلالة بكتيرية في أغذية أسماك البلطي النيلي إذ سجلوا زيادة في معدل البقاء على قيد الحياة بنسبة 58.33% للمعزز الحيوي ذا السلالتين و 54.17% للمعزز الحيوي ذا السلالة *Lactobacillus plantarum* N11 و41.67% للمعزز الحيوي ذو السلالة *Bacillus velezensis* H3.1. ودرس Mohapatra وآخرون (2014) التأثيرات المفيدة لخليط المعزز الحيوي المكون *Bacillus*

subtilis و *Lactococcus lactis* و *Saccharomyces cerevisiae* بالتخفيف $CFU\ kg^{-1}$ 10^{11} مع مستويات مختلفة من درجات الحرارة بتوليفات مختلفة إذ تبين أن خليط المعزز الحيوي ضمن درجات حرارة 34–37 م° كان له الأثر الكبير في تسجيل أعلى قيمة لمعدل الزيادة الوزنية وأقل معدل لمعامل التحويل الغذائي وزيادة مستوى سكر الكلوكوز في الدم وعدد خلايا الدم البيض وبروتينات مصل الدم الكلية وانزيم الفوسفاتيز القاعدي علاوة على دور المعززات الحيوية في زيادة مقاومة الأسماك للأجهاد الناجم عن ارتفاع درجات حرارة المياه في نظام التربية . وقد اختبر Allameh وآخرون (2015) تأثير كل من المعزز الحيوي ذا السلالة الواحدة والمعزز الحيوي متعدد السلالة من السلالات البكترية *Enterococcus faecalis* و *Lactobacillus fermentum* و *Leuconostoc mesenteroides* بالتخافيف(10^9 CFU\g و10^7 و10^5) على أداء النمو ومجتمع البكتيريا النافعة داخل القناة الهضمية وتركيب الجسم لأسماك الكارب الجاوي*Barbonymus gonionotus* وقد أُضيفت المعززات الحيوية للعلائق التجريبية بمعدل 200–300 مل /كغم إذ سجلوا أفضل أداء نمو للأسماك المغذاة على علائق تجريبية الحاوية على المعززات الحيوية ذات سلالة المفردة من إحدى سلالات بكتيريا حامض اللبنيك مقارنة مع الأسماك المغذاة على علائق تجريبية مكونة من المعززات الحيوية المكونة من مزيج نفس السلالات المذكورة ، ووجدوا زيادة اعداد بكتيريا حامض اللبنيك في أمعاء الأسماك بينما انخفض مستوى الانواع البكتيرية الاخرى السالبة لصبغة كرام.

تستعمل العديد من سلالات الاحياء الدقيقة كمعززات حيوية في تربية الأسماك مثل *Lactobacillus spp.* و *Bifidobacterium spp.* و *Pediococcus spp.* و *Streptococcus spp.* و *Carnobacterium spp.* و *Bacillus spp.* و *Flavobacterium spp.* و *cyanophage spp.* و *Pseudomonas spp.* و *Aeromonas spp.* و *Enterococcus spp.* و *Nitrosomonas spp.* و *Vibrio spp.* و *Debaryomyc spp.* (Chandrakala and soundharanay-Akai,2017). ودرس Asadian وآخرون (2015) تأثير المعزز الحيوي التجاري PTX المكون من عدة سلالات من أجناس من بينها *Lactobacillus sp.* و *Bifidobacterium sp.* و *Streptococcus sp.* و *Enterococcus sp.* و *Aspergillus sp.* و *Candida sp.* على أسماك الكارب الشائع إذ حققت زيادة في متوسط وزن الجسم وبنسبة 70% مقارنة بمعاملة السيطرة. وتستعمل المعززات الحيوية متعددة السلالات في

تربية الأحياء المائية لتعزيز المناعة غير النوعية وتحقيق زيادات في الزيادة الوزنية ومعامل النمو ومعدل النمو النوعي ونسبة كفاءة البروتين (Puvanasundram وآخرون،2021). توجد علاقة وثيقة بين نشاط الإنزيمات داخل القناة الهضمية للأسماك وتعزيز النمو والتحسن العام في الحالة الصحية للأسماك وما يعزز تلك العلاقة استعمال المعززات الحيوية كأضافات وظيفية في أغذية الأسماك إذ يؤدي ذلك الى زيادة نشاط الإنزيمات الهاضمة وتعديل قابلية هضم العناصر الغذائية في الأسماك (Mukherjee وآخرون،2019)، وينتج عن زيادة فعالية إنزيمات الجهاز الهضمي البروتييز والأميليز تحسين قابلية الهضم وينتج عن ذلك تحسن نمو الأسماك (Zhang وآخرون،2010). وهذا ما وجده Li وآخرون (2019) بزيادة فعالية كبيرة لأنزيمات الجهاز الهضمي للأسماك كالاميليز واللايبيز والببسين في يافعات أسماك التاربوت *Megalops atlanticus* عند استعمالهم أغذية ذات معزز حيوي متعدد السلالات. وأشارت الدراسات السابقة أن الجمع بين سلالتين أو ثلاثة سلالات من بكتيريا المعزز الحيوي ينتج عنها زيادة كبيرة في بعض معايير النمو كالزيادة الوزنية ومعدل النمو النوعي في أسماك الدنيس *Sparus aurata* (Avella وآخرون،2010) والبلطي النيلي (Iwashita وآخرون،2015) وكارب الروهو (Saravanan وآخرون،2021).

إن استعمال سلالات مختلفة في المعززات الحيوية يؤدي الى تحقيق تنوع أكبر يمكن أن ينعكس عن الأرتباط بفعالية أوسع بفعل التأثير التآزري أو الإضافي بين سلالات الأحياء المجهرية ومن الجدير بالذكر أن وظيفة المعززات الحيوية ترتبط بالسلالة البكتيرية بشكل خاص لذا يمكن أن تنتج علاقة متبادلة إيجابية بين السلالات قد تؤدي في النهاية إلى خلق حالة من التعايش بينهما من جراء استعمال المعززات الحيوية متعددة السلالات (Timmerman وآخرون،2004). ووجد Ayyat وآخرون (2014) أن استعمال توليفة من السلالات البكتيرية الثلاثة *Lactobacillus acidophilus* و*Streptococcus thermophilus* و*Bifidobacterium bifidum* في غذاء أسماك البلطي النيلي حققت أعلى قيمة في معيار الزيادة الوزنية وتحسين استهلاك الغذاء مع تسجيل أقل قيمة لمعامل التحويل الغذائي مقارنة مع المعزز الحيوي ذو السلالة الواحدة.

2-4- آلية عمل المعززات الحيوية في الأسماك

إن طبيعة عمل المعززات الحيوية تتصف بالغموض فيعتقد أنها ربما تزيد من شعور الأسماك بالجوع أو أنها تحفز شهية الأسماك وتحسين هضم المركبات الغذائية غير القابلة للهضم وبالتالي تحقيق الاستفادة من العناصر الغذائية وتزيد من قابلية امتصاصها وزيادة أنتاج الفيتامينات وإزالة السموم من المواد الغذائية كما ويعتقد أن آلية عملها تجمع ما بين الأمور المذكورة لذا من الضروري جداً دراسة تأثير تلك المواد على أنواع مختلفة من الأحياء المائية (Krishna وآخرون،2018).استعملت المعززات الحيوية في مجال الاستزراع المائي لتنمية الأسماك وباقي الأحياء المائية المستزرعة (Rohyati,2015)، وفيما يلي بعض آليات عمل المعززات الحيوية في الأسماك :

2-4-1- الأستيطان داخل القناة الهضمية للأسماك

تتميز كائنات المعزز الحيوي الدقيقة بقدرتها على الاستيطان داخل الجهاز الهضمي للأسماك إذ أن معدل تكاثرها يفوق معدل إزالتها بعد تناول الأسماك لها لمدة طويلة من الزمن وتضاف تلك المواد إلى أغذية الأسماك للمحافظة على صحتها من خلال تحسين فعالية العديد من العوامل المناعية وتقليل حمل العوامل الممرضة على الطبقة المخاطية في الأمعاء الدقيقة عن طريق إشغال المساحة السطحية للقناة الهضمية وتوفر بيئة القناة الهضمية للأسماك مكانًا مناسبًا للكائنات الحية الدقيقة المستوطنة عن طريق توفر السطح المناسب لها ومواقع الالتصاق والغذاء الذي تحتاجه إذ أن مجتمعات الأحياء الدقيقة النافعة المتوازنة مهمة جدًا للحفاظ على صحة الأمعاء (Banerjee and Ray,2017) وعند الحالات المرضية تتعطل مجتمعات الأحياء الدقيقة الطبيعية داخل القناة الهضمية للأسماك مما يسبب العديد من المشاكل المتعلقة بصحتها وبالوقت نفسه تعيش تلك الأسماك في وسط محاط بالعديد من الاحياء الدقيقة الممرضة (Egerton وآخرون،2018)، لذا فأن تنمية وتعزيز مجتمعات الأحياء الدقيقة من خلال المعززات الحيوية في أغذية الأسماك تعتبر طريقة فعالة لتحسين صحة الأسماك (Han وآخرون،2015). كما تساهم المعززات الحيوية بتعديل المستعمرات المايكروبية داخل القناة الهضمية للأسماك عن طريق تصنيع الأحماض الأمينية الأساسية والحوامض الدهنية والمعادن والفيتامينات (Newaj-Fyzul وآخرون،2014). وتعتمد خاصية التعديل الميكروبية لمجتمعات الكائنات الحية الدقيقة المستوطنة على سطح الغشاء المخاطي للقناة الهضمية على عوامل عدة منها: عوامل خارجية كجودة المياه ودرجة الحرارة والأس

الهيدروجيني، وعوامل داخلية كعمر الأسماك ومدى قوة التصاق أحياء المعزز الحيوي ومدة البرنامج الغذائي المكمل بالمعزز الحيوي وطريقة توصيل المعزز الحيوي وأن أي تغيير في عامل من هذه العوامل سينتج عنه تقليل في كفاءة المعززات الحيوية (Hasan and Banerjee,2020). وتتواجد مستعمرات الكائنات الحية الدقيقة النافعة بشكل معقد وديناميكي منذ الفقس في القناة الهضمية للأسماك وتعمل على تسريع معدل الأيض الغذائي والتطور الفسيولوجي وهضم العناصر الغذائية وامتصاصها والاستجابة المناعية ولا ينبغي تجاهل دور تلك الكائنات عند تقييم صحة الأسماك (Semova وآخرون،2012).

2-4-2- تحسين الاستفادة من العناصر الغذائية

تتصف المعززات الحيوية في قابليتها على تسهيل هضم العناصر الغذائية وكذلك في إنتاج الطاقة في الجهاز الهضمي للأسماك ومن أكثر المعززات الحيوية استعمالاً في تحضير المعززات الحيوية هي بكتيريا حامض اللبنيك (Ringo وآخرون،2018)، إذ تتواجد بأعداد كبيرة داخل القناة الهضمية للحيوانات السليمة. تعمل بكتيريا المعزز الحيوي على زيادة هضم العناصر الغذائية من جراء إفراز مجموعة من الأنزيمات الهاضمة مثل Protease وAmylase وCellulase وPhytase وغيرها من الأنزيمات والتي تؤثر كذلك على مجتمعات الكائنات الحية الدقيقة داخل القناة الهضمية للأسماك (Ghosh وآخرون،2017).فضلاً عن ذلك فقد بينت عدد من الدراسات أن المعززات الحيوية يمكنها تحفيز امتصاص العناصر الغذائية من خلال زيادة مساحة سطح الامتصاص داخل القناة الهضمية وفقاً للتغيرات في القياسات النسيجية لمنطقة الطيات المعوية وخلايا نسيج الكرومافين الداخلية والزغابات الدقيقة (Zhou وآخرون،2010).

إن من ضمن آليات عمل بكتيريا المعززات الحيوية إنتاج إنزيمات خارج الخلية كالبروتييز واللاييبز وعوامل تحفيز النمو (Wang وآخرون،2000)، وهذا الأمر ينعكس على تحقيق الاستفادة من العناصر الغذائية ، إذ يؤدي استعمال المعززات الحيوية في أغذية الأسماك إلى تحسين معدل التحويل الغذائي وهذا الامر يعود إلى أن العناصر الغذائية قد استعملت بشكل صحيح من قبل الأسماك وبالتالي تحقيق الاستفاة منها (Giri وآخرون،2014) . ووجد أن أسماك البلطي النيلي المغذاة على علائق تحتوي على معزز حيوي تجاري حققت أعلى قيمة لكفاءة التحويل الغذائي (EL-Haroun وآخرون،2006). وكانت للمعززات الحيوية ذات التركيبة *Bacillus subtilis* و *Lactococcus lactis* و*Saccharomyces cerevisiae* الفعالة والمعززات الحيوية من نفس

الكائنات الدقيقة المقتولة حرارياً في أغذية أسماك كارب الروهو تأثيراً على معامل التحويل الغذائي إذ حققت جميع معاملات المعزز الحيوي أفضل قيمة لمعامل التحويل الغذائي (Mohapatra وآخرون،2012).

2-4-3- تحسين نمو الأسماك

تعمل المعززات الحيوية على تعزيز نمو أنواع مختلفة من الأحياء المائية إذ وجد Allameh وآخرون (2015) أن استعمال المعزز الحيوي الحاوي على بكتيريا *Enterococcus faecalis* بالتركيز 10^7 CFU\g و10^9 في علائق الكارب الجاوي حقق زيادة وزنية في المعاملات التجريبية مقارنة بمعاملة السيطرة. فضلاً عن ذلك عملت هذه المواد على تعزيز العناصر الغذائية داخل المضيف إذ وجد Hamdan وآخرون (2016) إن استعمال سلالة من بكتيريا المعزز الحيوي *Lactobacillus sp.* في علائق أسماك البلطي النيلي نتج عنه تحسن في وزن وتركيب الجسم من حيث الدهن الخام والبروتين الكلي وأعتمد ذلك أيضاً على عوامل أخرى مثل جودة المياه ونوع البكتيريا ومستوى الأنزيمات والقابلية الوراثية. وحقق Tan وآخرون (2016) زيادة في معدل النمو والبقاء على قيد الحياة في أسماك الذيل السيفي وأسماك بلاتي الجنوبي *Xiphophorus maculate* وأسماك غوبي *Poecilia reticulate* عند تغذيتها على علائق تحتوي على معززات حيوية بتركيبة من بكتيريا *Bacillus subtilis* و*Streptomyce* . وأشارت Lara-Flores وآخرون (2003) على أسماك البلطي النيلي أن جميع العلائق التي تحتوي على معززات حيوية سجلت أعلى معدلات نمو مقارنة مع علائق السيطرة ، وإن المعززات الحيوية كان لها الدور الكبير في تقليل آثار عوامل الإجهاد وانعكس ذلك على أداء أفضل للنمو. وسجلت أعلى قيم لمعدلات النمو والسيطرة على الأمراض وزيادة نشاط القناة الهضمية ومعايير الدم من جراء إعطاء المعززات الحيوية في أغذية أسماك القاروص الأسيوي *Dicentrarchus labrax* (Adorian وآخرون،2019) والتراوت القزحي (Jamali وآخرون،2015) أسماك سنوك *Centropomus undecimalis* (Rhody وآخرون،2014 ; Tarnecki and Rhody,2017) أسماك الحفش *Acipenser transmontanus* (Hoseinifar وآخرون،2016)، واستعمل Han وآخرون (2015) المعزز الحيوي كعامل محفز للشهية في غذاء أسماك البلطي النيلي .

2-4-4- التأثير في الهضم وتركيب الجسم

يرجع التأثير الايجابي للمعزز الحيوي في هضم العناصر الغذائية في أغذية الأسماك إلى فعالية الأنزيمات الهاضمة للبكتيريا (De Schrijver and Ollevier,2000). إذ أن المعززات الحيوية تؤثر على عملية الهضم من خلال تعزيز عدد الكائنات الحية الدقيقة النافعة وفعالية الأنزيمات المايكروبية الأمر الذي ينتج عنه تحسن هضم وامتصاص العناصر الغذائية وبالتالي تحقيق الاستفادة منها (Suzer وآخرون،2008). تمتلك المعززات الحيوية تأثير مفيد على العمليات الهضمية داخل الجهاز الهضمي للأسماك إذ تقوم بكتيريا المعزز الحيوي بتصنيع إنزيمات خارج الخلية كالأميليز والبروتييز واللايبيز والسيلوليز بالإضافة إلى إفراز بعض العناصر المهمة للنمو الهضم كالفيتامينات والدهون غير المشبعة والأحماض الأمينية الناتجة من الفعل التأزري لمجتمع الأحياء النافعة داخل القناة الهضمية بالإضافة إلى إحياء المعزز الحيوي داخل المضيف وهي بذلك تؤدي دور المكملات الغذائية (Banerjee and Ray,2017 ; Ghosh وآخرون،2017 ; Hosain and Liangyi,2020).

تمتص العناصر الغذائية بشكل أكثر كفاءة عند معاملة أغذية الأسماك بالمعززات الحيوية (EL-Haroun وآخرون،2006).اختبر Askarian وآخرون (2012) تأثير الكايتين على بكتيريا حامض اللبنيك الملتصقة داخل القناة الهضمية لسمك السلمون الأطلسي *Salmo salar* ومن خلالها اختبر فعالية الأنزيمات المفرزة من قبل بكتيريا حامض اللبنيك مثل Protease وAmylase وCellulase وPhytase وChitinase إذ وجدوا أن بكتيريا حامض اللاكيتك لها القدرة على إنتاج تلك الأنزيمات بفعالية عالية. إن أغذية الأسماك المحتوية على المعززات الحيوية في تركيبها تحسن وبشكل كبير نسبة كفاءة البروتين والاستفادة من النايتروجين الظاهري والذي ينتج عنه تحقيق الاستفادة من البروتين فضلاً عن زيادة كفاءة استهلاك الغذاء (Lara-Flores وآخرون،2003)، إذ أن استعمال المعززات الحيوية في أغذية الأسماك يمكن أن تؤدي إلى زيادة محتوى البروتين والدهن دون تسجيل أي تأثيرات معنوية على محتوى الرطوبة والرماد في أسماك البلطي النيلي (Allameh وآخرون،2017). أشار EL-Haroun وآخرون (2006) إلى تحقيق أعلى معدلات من نسبة كفاءة تحويل البروتين عند إضافة المعززات الحيوية في غذاء أسماك البلطي النيلي، ولاحظوا وجود اختلافات معنوية في نسبة الدهن والطاقة الكلية في الأسماك. لاحظ Hamdan وآخرون (2016) زيادة محتوى جسم أسماك أسماك البلطي النيلي من الدهن الخام

والبروتين الكلي ووزن الجسم عند تغذيتها على علائق تحتوي على معزز حيوي بتركيبة من سلالات *Lactobacillus sp.* ويعتمد ذلك على عدة عوامل منها جودة المياه وأنواع الأحياء الدقيقة في تركيبة المعزز الحيوي ومستويات الإنزيمات المفرزة من قبلها والقابلية الوراثية للأسماك.

2-4-5- التأثير في الأداء المناعي والفسيولوجي للأسماك

تستعمل المعززات الحيوية في مجال الاستزراع السمكي من أجل إدامة صحة الأسماك عن طريق تعزيز العوامل المناعية وتقليل حمل المسببات المرضية على الطبقة المخاطية في القناة الهضمية للأسماك من خلال إشغال السطح المخاطي بطبقة من الأحياء الدقيقة النافعة (Banerjee and Ray,2017). وتتصف كذلك بقدرتها على تنشيط الجهاز المناعي للأسماك من خلال اختزال تأثير الاحياء الدقيقة الممرضة، لذا فإنها تستعمل كمحفزات مناعية والتي تعتبر مسلك عملي ناجح لتحسين تربية الأسماك والأحياء المائية الأخرى (Dawood and Koshio, 2016 ; Hai,2015). وأشار العديد من الباحثين إلى تحسن الاستجابة المناعية ومقاومة الأمراض في أسماك الكارب العشبي *Ctenopharyngodon idella* من جراء استعمال تلك المواد (Wu وآخرون،2015).إن الآلية المحتملة لعمل المعززات الحيوية هي تحفيز الاستجابة المناعية وزيادة الاستجابة للأنترولوكينات نوع بيتا والسايتوكوين الالتهابي TNFα واللايسوزايم نوع (C) في الأسماك المغذاة على علائق تحتوي على بكتيريا *Aeromonas veronii* و*Vibrio lentus* و *Flavobacterium sasangense* (Dawood and Koshio,2016). فضلاً عن تحسن دور كل من أنزيم Myeloperoxidase واللايسوزايم والألبومين وبروتين الجهاز المناعي المسمى complement component C3 ومستويات الغلوبيولينات المناعية والفعالية الالتهامية بواسطة خلايا الدم البيض في عدد من أنواع الأسماك (Giri وآخرون،2013 ; Chi وآخرون،2014).وتعمل المعززات الحيوية كمعدلات للمناعة من خلال ارتباط الأنماط الجزيئية المسببة للأمراض والتي تعرف اختصاراً بمستقبلات تمييز نمط المسببات المرضية على الخلايا المناعية كالخلايا الشجيرية والخلايا البلعمية والتي تحفز سلسلة من الإشارات الخلوية الداخلية والذي ينتج عنها تحرير السايتوكوينات المتخصصة والانترلوكينات والتي تحفز خلايا T المناعية والتي تحرر مضادات الفايروسات أو الفعاليات المضادة لتأثير الألتهابات (Balcazar وآخرون،2006a). وبحسب Nayak (2010b). إن القدرة التحفيزية المناعية للمعززات الحيوية قد تتأثر ببعض العوامل كمصدر كائنات المعزز الحيوي الدقيقة ونوع المعزز الحيوي والجرعة ومدة

الاستعمال.أما فيما يخص الجانب الفيسيولوجي فقد اختبر عدد قليل من الباحثين تأثير المعززات الحيوية على الوظائف الفسيولوجية الأخرى في الأسماك إذ وجد أن استعمال المعزز الحيوي في أسماك القاروص الأوربي وينتج عنه زيادة في وزن الأسماك من خلال تحفيز استنساخ mRNA لهرمون الانسولين المماثل لعامل النمو (IGF)-I (Carnevali وآخرون،2014)، كما وجد أن المعززات الحيوية تعمل على تقليل تركيز هرمون الإجهاد الكورتيزول وتفعيل دور الأنزيمات المضادة للأكسدة مثل Superoxide dismutase وCatalas وGlutathione peroxidase من أجل زيادة مقاومة الإجهاد في الأسماك وتعتبر هذه العملية ضرورية جداً في تحسين الأداء التناسلي في الأسماك (Zolotukhin وأخرون،2018 ; Hasan وآخرون،2020).كما تؤثر المعززات الحيوية على الأداء التناسلي للأسماك من خلال تحقيق زيادات في معدلات الخصوبة ودليل الجسم المنسلي وإنتاج صغار الأسماك من الإناث (Abasali and Mohammad, 2010).وقد وجد أن هنالك زيادة في المساحة السطحية للجهاز الهضمي للأسماك من خلال الاختلافات الحاصلة في القياسات النسيجية لمنطقة الطيات المعوية و الخلايا المعوية أليفة الكروم والزغابات الدقيقة بتأثير المعززات الحيوية في أغذية الأسماك مما يزيد من امتصاص العناصر الغذائية المهضومة (Zhou وآخرون،2010).

2-4-6- الاستبعاد التنافسي للكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض

إن التصاق وأستيطان بكتيريا المعززات الحيوية داخل القناة الهضمية للأسماك يعد أمراً ضرورياً في حصول التنافس على استغلال العناصر الغذائية ومصادر الطاقة والذي ينتج عنه تعديل مجتمع الكائنات الحية الدقيقة داخل القناة الهضمية للأسماك (Newaj-Fyzul وآخرون،2014 ; Dawood and Koshio, 2016).

إن الية عمل المعززات الحيوية في الأسماك هي تعزيز الحاجز الطلائي المعوي والذي يعد وسيلة دفاعية رئيسية في الأسماك والذي يحفاظ على سلامة الظهارة وحمايتها إضافة إلى زيادة التصاق الكائنات الدقيقة النافعة بالغشاء المخاطي المعوي والذي يعتبر شرطًا أساسيًا للأستيطان ومهمًا للتفاعل بين سلالات الكائنات الحية الدقيقة والمضيف كما يسهم في الاستبعاد التنافسي للكائنات الدقيقة المسببة للأمراض إذ ترتبط بكتيريا المعزز الحيوي بمواقع الارتباط في الغشاء المخاطي للأمعاء وتشكل حاجزًا ماديًا يمنع اتصال البكتيريا الممرضة بتلك المواقع إضافة إلى إنتاج المواد المضادة لنمو المسببات المرضية كالأحماض العضوية مثل حامض اللبنيك وحامض الخليك

اللذان يمتلكان تأثير مثبط قوي ضد البكتيريا السالبة لصبغة كرام (Bermudez-Brito وآخرون،2012; Rahman وآخرون،2021). لا يقتصر عملها داخل القناة الهضمية للأسماك على عمر الأسماك ومرحلة نضجها إذ أن تأثير تلك المواد يمتد لجميع الفئات العمرية من المرحلة اليرقية وحتى مرحلة البلوغ ، كما وجد أن بكتيريا الجنس *Lactobacillus* تتميز بقدرتها العالية بالإستيطان والبقاء لمدة طويلة جداً على سطح الظهاري للقناة الهضمية علاوة على ذلك تكون ذات فائدة كبيرة للكائنات الحية الدقيقة المستوطنة داخل القناة الهضمية (Merrifield and Carnevali,2014). وأشار Kelly and Salinas (2017) ألى تأثير المعزز الحيوي على أسماك الزرد *Danio rerio* الخالية من الجراثيم أن المعزز الحيوي بالاشتراك مع العوامل البيئية يؤثر بشكل كبير على تعديل مجتمع الكائنات الحية الدقيقة المستوطنة داخل القناة الهضمية من حيث إنتاج الأجسام المضادة والتحرر من الإجهاد ومقاومة أستيطان الأحياء الدقيقة .

تسعى العديد من البكتيريا الممرضة إلى الالتصاق بالطبقة المخاطية للجهاز الهضمي للمضيف ومن بعدها إحداث الإصابة بالأمراض لذا فأن بكتيريا المعزز الحيوي تمتلك آلية التنافس الاقصائي على مواقع الالتصاق داخل القناة الهضمية للأسماك لذا تعتبر قابلية البكتيريا النافعة على الالتصاق والأستيطان صفة مرغوبة عند اختيار السلالة البكترية المناسبة في تحضير المعزز الحيوي (Lazado وآخرون،2015) إذ تتنافس بكتيريا المعزز الحيوي كبكتيريا الجنس *Lactobacillus sp.* مع الاحياء الدقيقة الممرضة على مواقع الالتصاق على سطح الأمعاء وخاصة على الزغابات المعوية والخلايا المعوية (Brown,2011). يكون ارتباط المعزز الحيوي بمواقع الاتصال غير محدد وخاضع لعوامل فيزيائية وكيميائية أو يكون محدداً بناءً على التصاق بكتيريا المعزز الحيوي بالمستقبلات على سطح الالتصاق على الخلايا الظهارية (Salminen وآخرون،1996 ; Lazado وآخرون،2015).تتنافس بكتيريا المعزز الحيوي مع الاحياء الدقيقة الممرضة على العناصر الغذائية ومواقع الالتصاق داخل القناة الهضمية وتمنعها من الإلتصاق في تلك المواقع وبذلك تعد بديل فعال عن استعمال المضادات الحيوية والمواد الكيميائية الأخرى (Das وآخرون،2010).

2-5- المادة الغذائية الناقلة للمعزز الحيوي

يعتبر العالم Metchnikoff (1907) أول من درس العلاقة ما بين العمر الاستثنائي ونمط الحياة للقرويين المعمرين البلغاريين الذين يعيشون في جبال القوقاز إذ وجد انهم يتناولون الزبادي المخمر بشكل يومي الحاوي على بكتيريا المعزز الحيوي *Lactobacillus bulgaricus* وهي أول طريقة تم من خلالها إيصال بكتيريا المعزز الحيوي إلى القناة الهضمية للمضيف وبذلك أصبح من الممكن الاعتماد على الكائنات الدقيقة النافعة في تغيير مجتمع الإحياء الدقيقة في أجسامنا واستبدال الضارة منها بالإحياء النافعة، ومن الطرق المعتمدة في إيصال المعززات الحيوية في مجال الاستزراع المائي هي إما أضافته إلى العلف أو أضافته بشكل مباشر إلى المياه أو الى الغذاء الحي (Melo وآخرون،2020)، ويمكن مزج بعض السلالات البكتيرية والخمائر مع حبيبات العلف أو تكون مغلفة مع الأغذية الحية أو عن طريق إعطاء كميات قليلة من الأغذية عن طريق الفم (Susmita وآخرون،2017). وتجهز المعززات الحيوية بشكل إضافات غذائية في الاستزراع السمكي (Tuan وآخرون،2013). تعتبر منطقة القولون في القناة الهضمية هي المكان المقصود لعمل المعززات الحيوية لذلك يتم نقل تلك المواد إلى أمعاء الأسماك بشكل أساسي عن طريق الغذاء والتي تعتبر الطريقة الأكثر شيوعاً في إيصال المعززات إلى أماكن استيطانها داخل القناة الهضمية أما بالنسبة ليرقات الأسماك فيتم إضافة المعززات الحيوية أما إلى مياه نظام التربية أو أضافتها إلى الأغذية الحية كناقل الأرتيميا التي تعتبر ناقلاً بايلوجياً (Puvanendran وآخرون،2021). وقد استعملت بكتيريا المعزز الحيوي *Lactibacillus plantarum* بشكل معلق بكتيري في غذاء أسماك الجري الاسود *Pangasius larnaudii* لتحسين أداء النمو والمناعة غير المتخصصة (Silarudee وآخرون،2019) وبشكل مماثل استعملت أنواع من بكتيريا المعزز الحيوي *Bifidobacterium spp.* والتي كان لها الأثر الكبير في تحسين النمو والاستفادة من العناصر الغذائية في صغار أسماك التراوت القزحي (Sahandi وآخرون،2018)، واستعمل Wanka وآخرون (2018) العليقة الغذائية لحمل بكتيريا *Psychrobacter sp.* 002 و077 *Psychrobacter sp.* و242 *Acinetobacter haemolyticus* المعزولة من القناة الهضمية لأسماك التاربوت *Scophthalmus maximus* وأسماك الفلاوندر *Platichthys flesus* والسمك المفلطح الشائع *Limanda limanda* لأختبار تأثير طريقة تغليف العليقة بالمعلق البكتيري المحضر من تلك البكتيريا مع تقييم حيوية تلك البكتيريا بعد عملية التغليف والخزن بطرق بسيطة

وغير مكلفة، واستعمل Allameh وآخرون (2015) العليقة الغذائية كمادة ناقلة للمعزز الحيوي ذات السلالة البكتيرية المفردة والمعزز الحيوي المتعدد السلالة البكتيرية واختبار تأثيرها على النمو ومجتمع بكتيريا القناة الهضمية وتركيب الجسم في أسماك الكارب الجاوي، وفي سياق متصل استعمل Balaji وآخرون (2013) العليقة الغذائية لحمل ونقل المعززات الحيوية الى داخل القناة الهضمية لأسماك الكارب الشائع لتقييم التأثير المناعي لها إذ أضيفت المعلقات البكتيرية عن طريق الرش بمعدل 100 مل/1 كغم إلى العلائق التجريبية مع المزج الثابت، واستعمل كذلك Mohapatra وآخرون (2014) العليقة الغذائية كمادة ناقلة لمزيج المعزز الحيوي المكون من *Bacillus subtilis* و *Lactococcus lactis* و *Saccharomyces cerevisiae* وتقييم تأثيره على بعض معايير الدم والمناعة وموت الخلية المبرمج لأصبعيات أسماك كارب الروهو. واستعمل Hayati وآخرون(2021) العليقة الغذائية لحمل المعلق البكتيري المحضر من مزيج من سلالات متعددة من بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* (NBRC13953) وبكتيريا *Lactobacillus fermentum* (ME3) وبكتيريا *Lactobacillus buchneri* (DSM20057) وبكتيريا *Lactobacillus casei* (DSM 20011) مع فيتامين C بشكل خليط وكلا على حده إذ تم تشكيل المعلق البكتيري للمعزز الحيوي متعدد السلالات بنسبة (1:1:1:1) بتركيز $1*10^{-8}$ CFU\1ml واضيف المعزز الحيوي الى العليقة بمعدل 200 مل/1كغم. ومن الضروري أن تحافظ التوليفة الغذائية على نشاط وصلاحية المعززات الحيوية لفترات طويلة من الزمن وتعتمد فعالية المعزز الحيوي في الأغذية على عدة عوامل منها الأس الهيدروجيني ودرجة حرارة الخزن ومستويات الأوكسجين والنشاط المائي ووجود الكائنات الحية الدقيقة المنافسة والمثبطات (Shah,2007). أضاف Bunnoy وآخرون (2019) المعلق البكتيري المحضر من سلالة جديدة من بكتيريا *Acinetobacter KU011TH* بالتخافيف $1*10^{-5}$ CFU\ml و$1*10^{-7}$ و$1*10^{-9}$ إلى عليقة تجارية بمعدل 200 مل/1 كغم مع المزج البطيئ ومن ثم غلفت بزيت الحبار 2% وبعدد خزنها على درجة حرارة 4 م° اختبر تأثير المعزز الحيوي على أداء النمو والاستجابة المناعية والمقاومة ضد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* لأسماك الجري كبير الرأس *Clarias macrocephalus* Günther,1864.

2-6- الصمغ العربي كعامل مغلف

إن أول من استعمل مصطلح "الصمغ العربي" هم التجار الأوروبيون الذين استوردوه من الموانئ العربية لجدة والإسكندرية وأطلق عليه المصريون اسم كامي ويعتقد أنهم استعملوه منذ السلالة الحاكمة الثالثة بحوالي 2650 سنة قبل الميلاد لتأمين الضمادات حول المومياوات (Dauqan and Abdullah,2013). يعد الصمغ العربي منتج طبيعي مكون من عصير صلب القوام من إفرازات أشجار الأكاسيا وهي مادة غنية بالألياف غير اللزجة القابلة للذوبان في الماء وهو مركب من بروتينات كاربوهيدراتية وسكريات متعددة كالأرابينوز والكالاكتوز والرامنوز وبعض الأحماض العضوية والأمينية وبعض المعادن بشكل خليط من الكالسيوم والمغنيسيوم وملح البوتاسيوم لحامض Polysaccharidic acid ويكون ذو حموضة قليلة أو متوسطة (Badreldin وآخرون، 2008; Al-Baadani وآخرون،2021). يستعمل الصمغ العربي كسابق حيوي طبيعي في أغذية الحيوانات وذلك لكونه مقاوم للهضم ويخمر بواسطة الكائنات الحية الدقيقة اللاهوائية داخل القناة الهضمية للحيوانات إلى أحماض دهنية قصيرة السلسلة التي تؤدي دوراً مهماً في الحفاظ على الاستتباب وتركيب ووظيفة القناة الهضمية للحيوانات كما يتحكم في البيئة المايكروبية داخل القناة الهضمية وتثبيط مسببات الأمراض ويعد كمكمل غذائي طبيعي إذ يلعب دورًا مهمًا في أيض الأمعاء والكبد (Al-Baadani وآخرون،2021). ويتكون مركب الصمغ العربي من 4-39% سكر الكالاكتوز و24-27% الارابيونوز و12-16% الرمانوز و15-16% حامض الكلوكورونك و1.5-2.4% من وحدات بروتينية مثل هيدروكسي برولين والسيرين وحامض الاسبارتيك و16-12% رطوبة (Atgie,2018). غلفت بكتريا حامض اللبنيك لأول مرة من قبل العالم Berl Saddles عام 1975 بإستعمال مادة الالجينات من اجل تخمر الزبادي وأستعملت عملية التغليف الدقيق لحماية للمعززات الحيوية من الظروف غير ملائمة من درجات حرارة وحموضة العصارة المعوية والأوكسجين وغيرها (ظاهر وشاكر،2018). تعرف عملية التغليف على أنها إحاطة مادة بمادة أخرى أو عملية إحاطة مادة مهمة بمادة أخرى أقل أهمية بطبقة ذات سمك لا يتجاوز بضعة مليمترات (Melgar-Lalanne وآخرون،2012)، إذ توفر مواد التغليف الحماية للكائنات الحية الدقيقة ضد ظروف بيئة المعدة كالحموضة والرطوبة وتبادل الغازات ومعدلات التفاعل التأكسدي كما توفر الحماية من الظروف الخارجية الضارة كالأشعة فوق البنفسجية والحرارة (Pech-Canul وآخرون،2020).استعملت أنواع مختلفة من المواد المغلفة في تغليف المعززات الحيوية كالصمغ

العربي وألجينات الصوديوم والنشأ والدكسترين والسكروز وشمع النحل والدهون المفسفرة والسليلوز والجيلاتين والألبومين وتتصف تلك المواد بكونها خاملة تجاه المكونات النشطة وتنظم الإطلاق في ظروف معينة كما أنها اقتصادية وغير ماصة للرطوبة ومستقرة وقابلة للذوبان في الأوساط المائية أو المذيبات (Campos وآخرون،2011). واستعمل الصمغ العربي كمادة مغلفة للمعززات الحيوية لما يتصف به من خصائص كالذوبان في الماء وانخفاض لزوجته وخاصية الاستحلاب (Cano-Chauca وآخرون،2005 ; Fazilah وآخرون،2019)،وقد ثبت نجاحه في تحسين بقاء خلايا الكائنات الحية المجهرية أثناء التصنيع ومحاكاة ظروف الجهاز الهضمي في المختبر وعند التخزين إذ استعمل الصمغ العربي في التغليف الدقيق لكل من *Saccharomyces boulardii* و*Lactobacillus acidophilus* و*Bifidobacterium bifidum* (Pech-Canul وآخرون،2020).وقد أشارت Silva وآخرون (2018) إلى إمكانية استعمال هلام الصمغ العربي أو الزيت النباتي لتغليف بكتيريا المعزز الحيوي وهذا النوع من التغليف له الدور الواضح في حمايتها في ظروف مختبرية تحاكي ظروف القناة الهضمية مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وكلوريد الصوديوم. واستعمل Bunnoy وآخرون (2019) زيت الحبار المعقم بنسبة 2% (v\w) في تغليف العليقة الحاملة للمعزز الحيوي المكون من سلالة جديدة من بكتيريا *Acinetobacter* KU011TH على أداء النمو والاستجابة المناعية والمقاومة ضد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* لسمك الجري كبير الرأس. ويجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار بعض الامور في عملية تغليف المعزز الحيوي مثل نوع الكائنات الحية الدقيقة وطرائق ومواد التغليف (Shori,2017 ; Pavli وآخرون،2018).

2-7- اعتبارات مهمة في المعززات الحيوية في مجال الاستزراع السمكي

من الضروري أن تكون هنالك معرفة حول الهدف من استعمال المعززات الحيوية واختيار الأنواع البكتيرية المستعملة في تحضيرها والية عملها وطريقة نقلها إلى داخل القناة الهضمية للمضيف وطبيعة القناة الهضمية للمضيف والجرعة المستعملة ومدة الاستعمال وإرشادات السلامة (Wanka وآخرون،2018 ; Ringo وآخرون،2020)، ووفقاً لآلية عمل تلك المواد يمكن أن تصنف المعززات الحيوية في مجال الاستزراع السمكي إلى نوعين : النوع الأول هو المعزز الحيوي الذي يستهدف القناة الهضمية والذي يقدم إلى الأسماك مع الغذاء ومن خلاله يمكن تحسين مجتمع الكائنات الحية الدقيقة النافعة داخل القناة الهضمية، أما النوع الثاني فهو المعزز الحيوي الذي

يستهدف المياه في أنظمة التربية إذ تنتشر أحياءه الدقيقة في الوسط المائي لنظام تربية الأسماك وتعمل على إقصاء المسببات المرضية منه عن طريق استهلاك جميع العناصر الغذائية المتوفرة لها مما يؤدي إلى موتها (Hasan and Banerjee,2020). تعد دراسة واختبار أنواع البكتيريا التي ستستعمل في تحضير المعززات الحيوية ضرورية جداً لمعرفتها إن كان استعمالها آمن أم غير آمن ويفضل النوع البكتيري الذي يمتلك القابلية العالية على الالتصاق في الغشاء المخاطي للأمعاء وبدرجة اكبر من البكتيريا المستوطنة التي تكون عابرة ولديها القدرة في تحمل الأس الهيدروجيني للقناة الهضمية (Villamil وآخرون،2003)، يعد أستيطان بكتيريا المعزز الحيوي داخل الجهاز الهضمي للأسماك مهم جداً وهنالك بعض الاعتبارات الرئيسية لإختيار الكائنات الدقيقة في تحضير المعززات الحيوية منها يجب أن تكون الكائنات الحية الدقيقة المستعملة في تحضير المعزز الحيوي غير مرضية وآمنة للبيئة المائية وأحياءها وللإنسان ولبيئة الكائنات الحية الدقيقة داخل القناة الهضمية (Munoz-Atienza وآخرون،2013)، وحسب FAO (2016) لكي يكون المعزز الحيوي مؤثراً في الأغذية يجب أن يكون تركيزه على الأقل 10^{-6}–10^{-7} CFU في الغرام الواحد أو المليليتر الواحد من البكتيريا. وأن تتقبل الأسماك تلك المواد أثناء تناولها لها (Verschuere وآخرون،2000) ، وأن تتصف البكتيريا بقدرتها على التكاثر بشكل فعال داخل القناة الهضمية للأسماك بحيث يتجاوز معدل تكاثرها معدل إزالتها ويجب أن تكون البكتيريا قادرة على الالتصاق بالغشاء المخاطي المعوي ولابد أن تكون لها القدرة على التنافس بفعالية عالية مع البكتيريا الأخرى على سطح الالتصاق إذ أن بعض البكتيريا لها مواقع التصاق محددة على ظهارة الأمعاء أما الأنواع الأخرى من البكتيريا أنها تلتصق بشكل غير محدد وتعد هذه الاعتبارات مهمة للغاية لجميع الأنواع البكتيرية المستعملة كمعززات حيوية في مجال الاستزراع السمكي (Li وآخرون،2019)، وان تكون قادرة على أنتاج بعض المواد المفيدة مثل الفيتامينات والأحماض الدهنية (Gobi وآخرون،2018) فضلاً عن أنتاج المواد المثبطة والأنزيمات مثل Protease وAmylase و Cellulaseو Phytase و Chitinase و Lipase (Banerjee وآخرون،2016) وكميات قليلة من الببتيدات مثل bacteriocins و lysozyme و hydrogen peroxide (Nates,2016) أو إفراز الإنزيمات المحللة للبروتين المضادة للميكروبات مثل aminopeptidase و trypsin-like serine protease و caspase 1-like proteases (Richards وآخرون،2017)، وان تحافظ على حيويتها عند التحضير والخزن وبعد وصولها الى مكان أستيطانها داخل القناة الهضمية

(Adorian وآخرون،2019)، وان تعمل على تحسين الاستجابة المناعية للأسماك (Lazado and Caipang,2014) من خلال تنشيط الجهاز المناعي خلايا T وخلايا B والنظام المتمم (Nunez-Ortiz وآخرون،2014)، وتحفيز مناعة الغشاء المخاطي للأسماك عند التصاقها بسطح الغشاء المخاطي للقناة الهضمية (Lazado and Caipang,2014).

2-8- الدم في الأسماك

يعد الدم من الانسجة الضامة وكبقية الانسجة الضامة يتكون الدم من مكونات خلوية ومادة خلالية وتدعى المكونات الخلوية بالعناصر المكونة له وتشمل خلايا الدم الحمر وخلايا الدم البيض والصفائح الدموية، أما المادة الخلالية فهي البلازما التي تميزه عن باقي الانسجة الضامة وهي بكونه سائل يتكون من الماء وتعلق فيه وبشكل دائم العناصر المكونة وتمكنه من الدوران في جميع أنحاء الجسم ضمن النظام الوعائي (Betts وآخرون،2013). ويؤدي الدم في الأسماك وظائف مختلفة منها نقل الغازات الذائبة كالأوكسجين وثاني أوكسيد الكاربون والأمونيا والعناصر الغذائية والهرمونات، كما ويقوم ايضاً بوظيفة الاستباب من خلال تنظيم تركيز المكونات المختلفة للدم كتركيز الايونات أو الالكتروليتات والاس الهيدروجيني والاوكسجين الشرياني وثاني اوكسيد الكاربون والازموزية (Farrell,2011).تختلف الأسماك عن باقي الفقريات بكون حجم الدم فيها قليل إذ يتراوح في الأسماك العظمية ما بين 2-4 مل/100 غم بينما في الأسماك الغضروفية 6-8 مل/100 غم وقد يرجع الامر الى الاختلافات العرقية بين أنواع الأسماك إذ أن الأسماك العظمية الراقية ذات جهاز وعائي متطور ولهذا تحتاج الى دم اقل لنقل الاوكسجين والمواد الأخرى(بوند،1986)، وينقل الدم في الأسماك مواد عضوية ولا عضوية مختلفة كالهرمونات والفيتامينات وبروتينات بلازما الدم والتي تشكل حوالي 2-6 غم/100 مل دم والتي تكون بشكلين من الالفاغلوبيولين وشكلين من البيتاغلوبيولين والغاما غلوبيولين فضلاً عن الالبومين والتراتسفرين، وتشمل مكونات الدم الخلوية في الأسماك خلايا الدم الحمر وهي ذات نوى وشكل بيضوي ويبلغ عددها في الأسماك العظمية $1-3\times10^6$ خلية/ ملم^3 والغالبية من الأسماك العظمية لا يتجاوز العدد فيها 2×10^6 خلية/ ملم^3 ويتمثل دورها الاساسي في نقل الاوكسجين بتراكيز عالية للهيموغلوبين وتنظيم الاس الهيدروجيني (Farrell, 2011).ويرتبط معها ما يعرف بنسبة الخلايا المضغوطة وتبلغ نسبتها في الأسماك العظمية 20-30% وهو مقياس لقابلية الدم على حمل الاوكسجين وكلما زادت قيمته زادت قابلية الدم على حمل الاوكسجين (Gallaugher,1994). ويتراوح تركيز

الهيموغلوبين في دم الأسماك العظمية بحوالي 7–10 غم/100 مل وان هيموغلوبين الدم في الحيوانات يتوافق مع الاحتياجات الايضية المتنوعة ذات الاختلافات البيئية المستمرة فضلاً عن دوره في نقل الاوكسجين بين أعضاء التبادل الغازي والانسجة المحيطية (De Souza and Bonilla-Rodriguez,2007)، أما في الأسماك فيشكل الهيموغلوبين مؤشر حيوي بينها وبين البيئة (Landini وآخرون،2002) وعلى وجه التحديد من خلال الاختلافات الزمانية والمكانية للتغييرات البيئية مع توفر الاوكسجين المذاب في الماء مقارنة مع الحيوانات الارضية (De Souza and Bonilla-Rodriguez, 2007). وتؤدي خلايا الدم البيض دوراً مهماً في الدفاع والمناعة الخلوية في الأسماك (Farrell,2011)، وتبلغ خلايا الدم البيض في الأسماك العظمية حوالي 0.15×10^3 ملم^3 وتضم أنواع عدة منها خلايا الدم البيض الحبيبية واللمفية ووحيدة النواة وتضم خلايا الدم البيض الحبيبية ثلاثة أنواع من الخلايا تسمى حسب خصائصها الصبغية وهي المتعادلة والحمضية والقاعدية وأغلب خلايا الدم البيض الحبيبية تقوم بوظيفة الالتهام Phagocytic إذ تشترك في التصدي للأمراض وتضم الخلايا اللمفية الخلايا الملتهمة الكبيرة وخلايا بلازمية وخلايا لمفية صغيرة، يتم انتاج خلايا الدم الحمر في الأسماك في الكلية والطحال وفي الأغلب في رأس الكلية أما خلايا الدم البيض فتتكون في الكلية ايضاً (بوند،1986).

يعد انزيم ناقل أمين الالنين وانزيم ناقل امين الاسبارتيت إنزيمات خاصة بالكبد وهما مقياس أكثر حساسية للسمية في الكبد والاختلافات النسيجية المرضية ويمكن قياسهما في مدة زمنية قصيرة (Balint وآخرون،1977) ويوجد الانزيمين كذلك في أعضاء مختلفة من جسم الأسماك ويلعبان دوراً حيويًا في مسار التمثيل الغذائي للأحماض الأمينية والكاربوهيدرات ويمكن لحالات الاجهاد أن تكبح عملهما (Al-Ghanim,2014).إذ لاحظ Oluah (1999) أن حدوث زيادة أو نقصان في قيم الانزيمين عند قياسهما تشير الى حدوث تلف الأنسجة في الكبد والكلى والعضلات والخياشيم في أسماك الجري الافريقي *Clarias albopunctatus*، وبشكل عام تعمل الانزيمات الناقلة للأمين كمؤشر على وظائف وصحة القلب والكبد في الأسماك ويمكن تشخيصها من خلال فحص الحالة الفسيولوجية والتغذوية والمرضية لدم الأسماك ويعمل انزيم الفوسفاتيز القاعدي في الغشاء البلازمي والشبكة الاندوبلازمية كمؤشر لسلامة غشاء البلازما فزيادته دليل على حدوث تلف في الغشاء والكبد (Gabriel وآخرون،2012). وبحسب دراسة Peyghan وJalaly (2008) تبلغ النسب الطبيعية لأنزيمات الكبد في أسماك الكارب الشائع 15–21 وحدة دولية/لتر لأنزيم ناقل أمين

الالانين ولأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت حوالي 43–63 وحدة دولية/لتر ولأنزيم الفوسفاتيز القاعدي 234–237 وحدة دولية/لتر.

إستعملت المعززات الحيوية الأحادية والمتعددة الأنواع البكتيرية لتحسين الحالة الصحية للأسماك من خلال تأثيرها في فعالية الاجسام المضادة واللايسوزايم والسايتوكين (Allameh وآخرون،2017)، فضلاً عن تحسين معايير الدم (Dawood وآخرون،2017). إن الأسماك التي تتغذى على علائق معاملة بالمعززات الحيوية يكون لها مستوى عالي من مكداس الدم ويكون لها استجابة مثالية ضد العوامل المجهدة (Feliatra وآخرون،2018)، وهذا ما توصل اليه كل من Imanpoor و Roohi (2015) من أن معاملة علائق صغار أسماك الروج *Rutilus rutilus* بالمعزز الحيوي Primalac الذي يحتوي على *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* و *Bifidobacterium bifidium* و *Enterococcus faecium* نتج عنه زيادة في مكداس الدم للأسماك المعرضة للأجهاد الملحي مقارنة مع معاملات المقارنة.كما ينتج عن استعمال المعززات الحيوية في أغذية الأسماك زيادة في هيموغلوبين دم الأسماك وقد سجلت دراسات عديدة على هذا الاساس بزيادة مستواه في أسماك الجري الافريقي بأستعمال اغذية حاوية على المعززات الحيوية ذات السلالات *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidium* (Kiron and Watanabe,2010). وتزداد خلايا الدم الحمر أيضاً في دم الأسماك المغذاة على علائق تحتوي على معززات حيوية مقارنة مع علائق المقارنة (Azarin وآخرون،2015). كما يزداد مستوى خلايا الدم البيض في دم الأسماك التي تتغذى على أغذية تحتوي على معززات حيوية مقارنة مع الأغذية غير الحاوية عليه أو معاملة المقارنة في الدراسات التجريبية وقد توصلت دراسات عديدة لهذه النتيجة كإستعمال معزز حيوي ذو أنواع مختلفة *Lactobacillus sporogenes* و *Lactobacillus acidophilus* و *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* في أسماك الكارب الابيض *Cirrhinus cirrhosus* (Sharma وآخرون،2013) وبكتيريا المعزز الحيوي *Bacillus subtilis* في أغذية أسماك التراوت القزحي (Kamgar and Ghane,2014) والمعزز الحيوي المكون من *Bacillus subtilis* وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* في أسماك الكارب الابيض(Ullah وآخرون،2018) والمعزز الحيوي المكون من مزيج من بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* و *Bacillus subtilis* في أغذية أسماك البلطي النيلي (Aly وآخرون،2008) فضلاً عن تمتعها بأفضل

أستجابة مناعية عند مقارنتها مع معاملة المقارنة كما تكون اكثر استجابة للعوامل المجهدة بزيادة عدد خلايا الدم البيض فيها وهذا ما توصل اليه Munir وآخرون (2018) عند دراستهم على أسماك رأس الافعى*Channa striata*.

2-9- أداء الدم في الأسماك

ينقل الدم في الأسماك مجموعة متنوعة من المكونات مثل العناصر الغذائية والهرمونات والمعادن والعناصر المناعية والمياه والغازات والسموم والنواتج الثانوية للعناصر الغذائية ولعل أهم وظائف الدم هي تزويد خلايا جسم الأسماك بالأوكسجين والعناصر الغذائية كالكلوكوز والأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والتخلص من النواتج الثانوية لعمليتي التنفس والتمثيل الغذائي كثاني أوكسيد الكاربون واليوريا وحامض اللبنيك والوظائف المناعية والتخثر (Ciesla,2007). فضلاً عن المهام التي يقوم بها الدم في الأسماك فإن معايير الدم تعطي صورة دقيقة عن الايض الغذائي والحالة الصحية للأسماك عند قياسها كما أنها تعطي مؤشر دقيق عن معيشة الأسماك وصحتها واستجابة الجهاز المناعي والآثار القصيرة والطويلة المدى لظروف الاستزراع غير المثالية وخصوصاً ما يتعلق منها بنوعية المياه والإصابة بالأمراض والحالة التغذوية (Rebl وآخرون،2021). تختلف معايير الدم والبروتين الكلي لبلازما الدم حسب الاختلافات الفردية والانواع المختلفة من الأسماك فضلاً عن ظروف الاستزراع المختلفة وتعد المقارنة بين معايير الدم كمؤشرات بايلوجية بين الأنواع السمكية أو حتى بين نفس النوع الواحد من الأسماك المستزرعة في ظروف تجريبية مختلفة أمر معقد للغاية، إذ تؤثر العديد من العوامل كالعوامل البيئية وطريقة جمع العينات على بيانات الدم الامر الذي ربما يجعل منها خارج النطاق المرجعي (Jan وآخرون،2020)، وبالرغم من تلك المعوقات فإن المقارنة بين معايير الدم والمعايير الكيموحيوية للدم بين المعاملات بنفس التصميم التجريبي يمكن أن تكون أداة مراقبة موثوقة، أستعملت معادلة جديدة تتكون من خمسة معايير شائعة من المعايير الدمية والبايوكيميائية للدم كخلايا الدم الحمر وخلايا الدم البيض والهيموغلوبين ومكداس الدم والبروتين الكلي لمصل الدم وتكمن فكرة هذه المعادلة هي أي معيار مفرد من تلك المعايير لا يمكن الاعتماد عليه بدرجة كافية كمؤشر حيوي لصحة الأسماك ونموها إذ أن أداء الدم يمكن أن يكون أكثر موثوقية ودقة لمراقبة صحة الأسماك ونموها، لذا جاءت فكرة إداء الدم كدليل أفضل لأنه يأخذ في الإعتبار كل هذه المتغيرات في معادلة واحدة إذ أن القيم المرتفعة لأداء دم الأسماك فهذا يدل إلى أرتفاع قيم كل أو

معظم متغيراتها لذا تكون تلك المعادلة اكثر منطقية عند وجود اختلافات في معايير الدم الخمسة خلال المعاملات التجريبية، وقد أضيف اللوغاريتم الطبيعي Ln إلى الصيغة لتقليل تأثير التباين بين المتغيرات وقد وجدت علاقة موجبة بين أداء الدم والنمو وعلاقة سالبة بينه وبين الاجهاد في الأسماك ومما تجدر الإشارة إلى أن أداء الدم معيار مناسب وموثوق للمقارنة بين المعاملات ضمن التجربة الواحدة لكنه غير مناسب عند المقارنة بين التجارب المختلفة كما يعتقد العديد من الباحثين أن القيمة المرتفعة لهذه المعايير الخمسة لا يمكن تفسيرها في جميع الأوقات على أنها علامة على تمتع الأسماك بصحة جيدة وتراوحت قيم هذا المعيار لدراسات مختلفة ما بين 10.68–18.24 لعينات بعدد 441 وبمتوسط 14.43 وتشير قيم أداء الدم العالية إلى أن أنسجة الجسم مؤكسجة جيدًا بسبب زيادة مستوى خلايا الدم الحمر والهيموغلوبين ومكداس الدم فيها كما تشير قيمه المرتفعة أيضاً الى تحسن وظيفة الجهاز المناعي في الأسماك من جراء ارتفاع مستويات خلايا الدم البيض والبروتين الكلي لمصل الدم في الأسماك إذ تفسر هذه العوامل العلاقة الإيجابية القوية بين النمو والمناعة واداء الدم للأسماك (Esmaeili,2021).

2-10- الغلوبيولين المناعي IgM في الأسماك

إن الوسائل الدفاعية الاساسية تكون متماثلة في جميع الفقريات الفكية Gnathostomata إلا أن هنالك بعض الفروق بين تلك الوسائل بإختلاف الكائنات الحية، إذ يوجد هنالك نوعين رئيسين من الاستجابة المناعية هما الإستجابة المناعية الفطرية والاستجابة المناعية التكيفية (المكتسبة) إذ يكون الجهاز المناعي الفطري رد فعل سريعًا وغير محدد على المسبب المرضي وفي حال استمرت الاصابة من قبل المسبب المرضي نفسه على الرغم من وجود الدفاعات الفطرية عندها فإن الجهاز المناعي التكيفي سيميز المسبب المرضي بالنوعية والذاكرة بمعنى آخر هي الاستجابة التي تتكون بعد تعرض الكائن الحي للأمراض (Rauta وآخرون،2012). يتطور نظام المناعة التكيفي أو المكتسب إلى استجابة مناعية شديدة التمييز وطويلة الأمد لمسببات الأمراض الخاصة التي يتم تنظيمها بواسطة نوعين من الخلايا اللمفاوية يقود كل منهما أتجاها مختلفًا من المناعة التكيفية وتعد خلايا T العنصر الاساسي للمناعة الخلوية بينما تنتج خلايا B الغلوبولينات المناعية Ig التي تعد العناصر الاساسية للأستجابات المناعية الخلطية (Alberts وآخرون،2002). إن أول تشخيص للغلوبيولين المناعي IgM سُجل منذ حوالي 50 عام في مصل دم سمكة قرش كلب البحر الشوكي *Mustelus canis* (Marchalonis and Edelman,1966). إذ يعتبر الغلوبيولين المناعي

IgM من الأجسام المضادة الاساسية الموجودة في أغلب الأسماك العظمية (Buonocore and Gerdol,2016).

يعد صنف الغلوبيولين المناعي IgM من الأجسام المضادة الأقدم والأكثر انتشارًا في بلازما دم الأسماك (Flajnik and Kasahara,2010)، إذ يعتبر اول صنف تم تشخيصه في الأسماك والذي ينتج من خلايا B كجسم مضاد ويتم مضاعفته سواء كان في بلازما الدم أو المخاط الى صنف رباعي القسيمات (Sahoo وآخرون،2008). يوجد الغلوبيولين المناعي IgM بشكل طبيعي في مصل دم الأسماك العظمية قبل التمنيع إلا أن تعرض المستضد مع الخلايا B يحفزها على تحريره (Boes,2000). ويبلغ تركيزه في مصل دم الأسماك ما بين (800–9000) مايكروغرام/مل (Ye وآخرون،2013)، بينما ذكر (Bilal وآخرون،2016) أن تركيزه في الأسماك العظمية يتراوح ما بين (800–13000) مايكروغرام/مل، في حين اشار Olesen and Jorgensen (1986) و Solem and Stenvik (2006) و Parra وآخرون (2016) الى اختلاف تركيزه في مصل دم أنواع مختلفة من الأسماك العظمية والذي يتراوح ما بين 0.6–21 ملغم/مل اعتماداً على اختلاف عوامل عديدة كدرجة الحرارة وجودة المياه وحجم الأسماك والإجهاد والاصابة بالامراض والتمنيع. هنالك ثلاثة أنواع رئيسية من الغلوبيولين المناعي في الأسماك العظمية IgM و IgD و IgZ/IgT والنوع الأخير هو المميز للأسماك العظمية (Hikima وآخرون،2011) ولكون كلا الجزيئتين في سمك التراوت القزحي وسمك الزرد لها نفس الخصوصية في الوظيفة في كلا النوعين وقد تم نشرهما بنفس الوقت لذا اطلق عليهما هذا الاسم IgT/ IgZ(Hansen وآخرون،2005). يؤدي الغلوبيولين المناعي IgM دورًا في كل من المناعة الفطرية والمناعة التكيفية إذ تشتمل وظائفه على تنشيط نظام المتمم الدفاعي بربط جزيئات الأوبسونين بالأحياء الدقيقة الممرضة والتلازن من أجل البلعمة ومهاجمة مسببات الامراض (Ye وآخرون،2013).عادة ما يتم التعبير عن IgM في الأسماك في العين والخياشيم والأمعاء والكبد والبنكرياس وخلايا الدم البيض والطحال والخصى وليس في الدماغ والقلب والكلى والعضلات والجلد والمعدة (Honda وآخرون،2010).

2-11- هرمونات الغدة الدرقية في الأسماك

توجد الغدة الدرقية في الأسماك كاملة التعظم الحديثة غالباً في منطقة تحت البلعوم ومع ذلك تنتشر حويصلات الغدة الدرقية في أنواع مختلفة من الأسماك في القلب ورأس الكلية والأجزاء الأخرى من الكلى وهذه الحويصلات المتغايرة الموضع تعمل بالتنسيق مع الغدة الدرقية تحت البلعوم، ففي أسماك البلطي الموزمبيقي *Oreochromis mossambicus* يقتصر نشاط الغدة الدرقية على منطقة تحت البلعوم، أما في أسماك الكارب الشائع ترتبط الغدة الدرقية الصمية بأنسجة الكلى وتشكل حويصلات الغدة الدرقية في أسماك الكارب الشائع في منطقة تحت البلعوم حوالي 10% فقط من إجمالي أنسجة الغدة الدرقية ولا تقوم تلك الحويصلات بتجميع اليود ولا تفرز هرمونات الدرقية وعلى الرغم من اختلاف حويصلات الغدة الدرقية في منطقة تحت البلعوم عن الكلى في أسماك الكارب الشائع إلا أنه لا يوجد اي اختلاف في ارتفاع الخلايا الظهارية للخلايا الدرقية وفعالية هرمون الثايروكسين المناعية وعلى الأغلب تكون حويصلات منطقة تحت البلعوم في الكارب الشائع خاملة (Geven,2009). تشترك هرمونات الغدة الدرقية في العديد من العمليات الحيوية كالنمو وتصبغ الجلد والتنظيم الازموزي والتكاثر (Blanton and Specker, 2007). تنتج هرمونات الغدة الدرقية في حويصلة الغدة الدرقية والتي تتكون من طبقة واحدة من الخلايا الظهارية التي تحيط بحيز مليئ بالمواد الغروية ويعتبر هرمون الثايروكسين T4 الهرمون السائد في أغلب إفرازاتها ويكون له تأثيرات قليلة مباشرة ويعتبر الركيزة الاساسية لهرمون الثايرونين T3 (Hadley,1992). يحدث تحويل هرمون الثايروكسين T4 الى هرمون الثايرونين T3 في الأنسجة المحيطية عن طريق الإزالة اليود الاحادي من الحلقة الخارجية من هرمون الثايروكسين (Eales and Brown,1993). تنتشر هرمونات الغدة الدرقية في بلازما الدم في الأسماك وهي مرتبطة بالبروتينات الناقلة لهرمونات الغدة الدرقية كالألبومين والغلوبيولين المرتبط بالثايروكسين و Transthyretin (Power وآخرون،2000). بالرغم من مرور أكثر من عقد من البحث العلمي إلا أن دور هرمونات الدرقية في الأسماك لازال غير مفهوم تمامًا لأن التركيب المنتشر للغدد الدرقية يجعل الدراسة عليها أكثر صعوبة (Van de Pol وآخرون،2017 ; Campinho,2019). كما تمتلك تلك الهرمونات أيضًا خصائص ووظائف مختلفة بسبب التنوع في تشريح الأسماك وبيئتها ودورة حياتها(Deal and Volkoff, 2020).

إن الثايرونين T3 هو الهرمون النشط بايلوجياً وتؤثر هرمونات الغدة الدرقية في معدل الأيض الأساسي والنمو وعمليات التطور في الأسماك والبرمائيات (Power وآخرون،2001 ؛ Eales,2006). أن هرمون محفز الغدة الدرقية Thyroid stimulating hormone (TSH) في الأسماك العظمية وصفائحية الغلاصم هو هرمون بروتيني سكري يشتمل على وحدة فرعية b خاصة به (TSHb) والتي ترتبط بالوحدة الفرعية للبروتين السكري ويعبر هذا الهرمون عن تأثيره من خلال ارتباطه بالمستقبلات الخاصة به بغشاء حويصلات الغدة الدرقية (MacKenzie وآخرون،2009 ; Maugars وآخرون2014). ولهذا الهرمون في الأسماك تأثير محفز لتخليق وتحرير هرمونات الغدة الدرقية وامتصاص اليود (Maugars وآخرون،2014). وتتطلب عملية انتاج هرمونات الدرقية توافر اليود الذي يتم الحصول عليه في معظم الأسماك عن طريق الغذاء أو من امتصاصه من الماء عن طريق الخياشيم (Eales,2019). يعد محور الدماغ والغدة الدرقية والأعضاء المحيطية مهماً في تحقيق التوازن في استهلاك الطاقة داخل جسم الحيوانات (McAninch and Bianco,2014)، وعدم تحقيق التوازن في استهلاك الطاقة يؤدي الى إطلاق اشارات من الدماغ أو الأعضاء المحيطية تحفز الغدة الدرقية على تحقيق التوازن في استهلاك الطاقة عن طريق تعديل إفراز هرموناتها، وتشير العديد من الدراسات أن إفراز هرمونات الغدة الدرقية تؤدي الى زيادة معدل الايض (Kim,2008) وعكس ذلك تماماً يؤدي قلة إفراز تلك الهرمونات الى تأثيرات مغايرة ولذلك تعد هرمونات الغدة الدرقية هرمونات أساسية للعديد من العمليات الفسيولوجية كالنمو والتطور والتمثيل الغذائي (Rabah وآخرون،2019).

2-12- الاحياء الدقيقة المتعايشة في القناة الهضمية للأسماك

يشير إصطلاح Microbiota الى الكائنات الحية الدقيقة المتعايشة التي تشغل بيئة معينة بينما يشير إصطلاح Microbiome إلى مجموعة جينومات الكائنات الحية الدقيقة داخل مجتمع الكائنات الحية الدقيقة (Burokas وآخرون،2015) التي تشمل الكائنات الحية الدقيقة المتعايشة والتكافلية والممرضة (Sandrini وآخرون،2015)، ومن الممكن أن يكون مجتمع الكائنات الحية الدقيقة المتعايشة متنوعاً بما في ذلك الطلائعيات و الفطريات و الخمائر و الفايروسات والبكتيريا (Merrifield and Rodiles,2015)، وتعد البكتيريا من أكثر الكائنات الدقيقة المتعايشة تواجداً في القناة الهضمية للأسماك (Rombout وآخرون،2011). يتغير التركيب المايكروبي في القناة الهضمية لأسماك المياه العذبة بإختلاف الظروف البيئية في البيئة التي تعيش فيها كما تسود في

أمعاء أسماك المياه العذبة أنواع من العوائل البكتيرية *Lactococcus spp.* و *Acinetobacter spp.* و *Aeromonas spp.* و *Flavobacterium spp.* و *Pseudomonas spp.* و *Enterobacteriaceae* وبعض أنواع العوائل البكتيرية اللاهوائية اجبارياً مثل *Bacteroides* و *Clostridium* و *Fusobacterium* (Gomez and Balcazar,2008). كما يشير وجود أعداد قليلة من الانواع البكتيرية في القناة المعوية لبعض أنواع الأسماك الى قلة تنوعها (German وآخرون،2010). يبدو أن البكتيريا المتعايشة داخل القناة المعوية للأسماك تختلف بإختلاف تركيب الجهاز الهضمي للأسماك كما أنها تعد تمثيل لتلك الموجودة في البيئة المحيطة أو الموجودة في غذاء الأسماك والتي يمكن أن تعيش وتتكاثر داخل القناة المعوية للأسماك (Cahill,1990) .وتؤثر تلك البكتيريا في تطور الأسماك ودورة حياتها وفيسولوجيا اجسامها ومناعتها فضلاً عن كونها حاجز حيوي ضد المسببات المرضية المختلفة (Yan وآخرون،2016)، كما تؤثر عوامل عدة على تلك البكتيريا كالاختلافات الحاصلة في العوامل الخارجية كالعمر وطبيعة غذاء الأسماك والبيئة التي تعيش فيها (Wang وآخرون،2018). يحصل أستيطان القناة الهضمية بالبكتيريا المتعايشة إما بشكل طبيعي دون أي تدخل من خلال الانتشار الطبيعي لها من البيئة الخارجية الى داخل القناة الهضمية للأسماك أو بشكل محدد والحالة الاولى تكون مسؤولة عن الشكل النهائي للمجتمع المايكروبي في الأمعاء ويحصل تجمع تلك الاحياء بفعل بعض العوامل الانتقائية والتبدد النشط لها وفعاليتها تجاه بعضها البعض داخل القناة المعوية للأسماك (Talwar وآخرون، 2018). ويزداد تنوع الاحياء الدقيقة المتعايشة في القناة الهضمية للأسماك بشكل عام مع تغير عادات التغذية للأسماك من الافتراس الى القارتة ومن القارتة الى العاشبة إذ تسود في المجتمع البكتيري المعوي للأسماك اللاحمة انواع من البكتيريا المنتجة للأنزيمات الهاضمة كاللايبيز والبروتييز والتربسين (Liu وآخرون،2016). كما تتواجد في الاسماك العاشبة كالكارب العشبي أنواع من بكتيريا *Aeromonas sp.* المحللة للسليلوز و*Enterobacter sp.* و*Enterococcus sp.* و *Citrobacter sp.* و*Bacillus sp.* و*Raoultella sp.* و*Klebsiella sp.* و *Hydrotalea sp.* و*Pseudomonas sp.* و *Brevibacillus sp.* (Li وآخرون،2009) وأنواع من بكتيريا *Clostridium sp.* المحللة للسليلوز و*Cellulomonas sp.* و*Bacteroides sp.* مع أنواع من البكتيريا المثبتة للنايتروجين في القناة الهضمية لأسماك البليكو *Panaque nigrolineatus* (Watts وآخرون،2013)، فضلاً عن ذلك تتواجد البكتيريا المنتجة لحامض اللبنيك في القناة

الهضمية للأسماك التي تتغذى على علائق ذات مكونات نباتية فقط بشكل أكبر من الأسماك التي تتغذى على أغذية تحتوي على مسحوق السمك، مما يدل على دورها في المساعدة على هضم الغذاء في الأسماك (Catalan وآخرون،2017). تعيش بعض الاحياء الدقيقة المتعايشة في القناة الهضمية للأسماك بشكل مؤقت وبعضها الآخر يعيش بشكل دائمي (Kim وآخرون،2007). يبدأ أستيطان القناة الهضمية للأسماك بالبكتيريا المتعايشة في مرحلة اليرقات ويستمر هذا الأستيطان نحو تحقيق تجمع معقد من الأحياء الدقيقة المتعايشة في أمعاء الأسماك (Nayak,2010a). ويدل كثرة الشعب البكتيرية المتماثلة بغض النظر عن الموقع التصنيفي لها أو الموقع الجغرافي للأسماك إلى دور الأحياء الدقيقة المتعايشة في وظائف الأسماك كالهضم وامتصاص العناصر الغذائية وتحفيز الاستجابة المناعية (Talwar وآخرون، 2018).

الفصل الثالث

3-المواد و طرائق العمل

3-1-الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة

جدول (1) الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة

ت	الأجهزة والمعدات Apparatus and instruments	النوع
1	Autoclave الموصدة	Lab Tech
2	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	Hettich Zentrifueen
3	Incubator حاضنة	Memmert
4	Laminar flow hood غرفة الزرع	Lab Tech
5	Light microscope مجهر ضوئي	Olympus
6	Sensitive scale ميزان حساس	Denver
7	Magnetic Stirrer خلاط مغناطيسي	Lab Tech
8	Refrigerator ثلاجة	Concord
9	Benson burner مصباح بنسن	-
10	Loop (انشوطة) أداة زرع	-
11	Micropipettes ماصات دقيقة	-
12	Plain tube test أنبوبة اختبار عادية	-
13	Eppendorf tubes أنابيب الطرد المركزي	-
14	Syringe محاقن سعة 3 مل	-
15	Syringe محاقن سعة 5 مل	-
16	Tubes أنابيب سعة 60 مل	-
17	Medical cotton قطن طبي	-
18	Tin paper ورق قصدير	-
19	Petri dish أطباق بتري	-
20	Medical alcohol كحول طبي 70% و 90%	-

3-2-الأوساط والكواشف والمواد المستعملة في الدراسة

جدول (2) الأوساط والكواشف والمواد المستعملة في الدراسة

ت	المادة
1	وسط المرق المغذي Nutrient broth
2	وسط الاكار المغذي Nutrient agar
3	وسط Tryptic soya broth
4	وسط أكار الماكونكي MacConkey agar
5	وسط أكار الدم Blood agar
6	وسط الحركة Motility medium
7	وسط اختبار المثيل الاحمر وفوكوس بروسكار Methyl red-Voges proskauer broth medium
8	وسط أكار النشأ Starch agar medium
9	وسط مرق اختزال النترات Nitrate reduction broth
10	وسط تربتوفان السائل Tryptophan broth medium
11	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium
12	وسط اكار الحديد ثلاثي السكريات Triple sugar iron agar medium
13	وسط الإدامة Maintenance medium
14	وسط اكار اليوريا Urea agar medium
15	كاشف الكاتليز بيروكسيد الهيدروجين Catalase reagent
16	كاشف فوكس بروسكار Voges –proskuer reagent
17	كاشف المثيل الأحمر Methyl Red reagent (MR)
18	كاشف لوكاس Lucas reagent
19	كاشف اختزال النترات Nitrate reduction reagent
20	كاشف كوفاك Kovac's reagent
21	عدة صبغة كرام Gram stain kit
22	ملح دارئ الفوسفات Phosphate buffer saline
23	الصمغ العربي Arabic gum
24	صبغة السفرانين Safranin stain

3-3- إجراءات تحضير المعززات الحيوية مختبرياً

3-3-1-اختيار العزلات البكتيرية

أُستحصلت العزلات البكتيرية من مركز الأمين للتقانات الإحيائية في محافظة النجف الاشرف بشكل معلق بكتيري مضاف إليه 20% من الكيلسرول داخل أنابيب اختبار وحسب الرقم التسلسلي المشار إليه في الجدول (3) والمشخصة وفق الاختبارات الكيموحيوية المختلفة والتي أستعملت في تحضير المعززات الحيوية إذ حفظت تلك العزلات عند درجة حرارة 4 م° لحين الشروع بتحضير المعززات الحيوية.

جدول (3) العزلات البكتيرية المستعملة في التجربة

ت	اسم العزلة البكتيرية	مصدرها
1	*Lactobacillus acidophilus* 44533	مركز الأمين للأبحاث والتقانات الإحيائية المتقدمة
2	*Bifidobacterium bifidum* 5144	
3	*Streptococcus thermophiles* 5935	

3-3-2- الاختبارات الكيموحيوية Biochmecal tests

أُجريت الاختبارات الزرعية والكيموحيوية لتقييم كفاءة العزلات البكتيرية الثلاث وتحضير المعززات الحيوية المستعملة في الدراسة في مختبر الاحياء المجهرية التابع لمركز دراسات البادية وبحيرة ساوة، إذ حضرت الأوساط الزرعية المستعملة في التشخيص حسب تعليمات الشركة المصنعة للوسط وحسب ما أشارت اليه جاسم (2017) وكالأتي :

3-3-2-1- وسط المرق المغذي Nutrient broth

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصعة.

3-3-2-2- وسط الحركة Motility medium

يستعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتيريا على الحركة (Collee وآخرون،1996) وحضر بإذابة 4 غم من مسحوق الوسط المغذي الصلب مع 20 غم من وسط المرق المغذي في 1 لتر من الماء المقطر وبعدها عقم الوسط من خلال إدخاله إلى الموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2 وبعدها وضعت الأنابيب بشكل عمودي لحين تصلب الوسط وإجراء الاختبار.

3-3-2-3- وسط مرق المثيل الاحمر– فوكس بروسكار Methyl Red-Voges Proskauer broth medium

يستعمل هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتيريا على إنتاج الحامض من تخمر سكر الكلوكوز (Godber,1989) وحضر هذا الوسط من إذابة 5 غم من الببتون مع 5 غم من الكلوكوز مع 5 غم من فوسفات البوتاسيوم الأحادية في 900 مل من الماء المقطر ومن ثم أكمل الحجم إلى1 لتر وأجريت معايرة للأس الهيدروجيني إلى 7.5 ومن ثم وزع الوسط في أنابيب اختبار بمقدار 5 مل لكل أنبوب وبعدها عقمت بالموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2.

3-3-2-4- وسط أكار النشأ Starch agar medium

يستعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتيريا على أنتاج أنزيم Amylase الذي يعمل على تحليل النشأ وحضر هذا الوسط عن طريق إذابة 2% من النشأ وأضيف إلى الوسط المغذي الصلب Nutrient agar (الذهب،1998).

3-3-2-5- وسط اختزال النترات السائل Nitrate reduction broth

يستعمل هذا الوسط لأختبار قدرة البكتيريا على اختزال النترات إلى نتريت وبحسب (Collee وآخرون،1996) وحضر من إذابة 0.2 غم من نترات البوتاسيوم و5 غم من الببتون في 1 لتر من الماء المقطر ومن ثم وزع الوسط في أنابيب اختبار بمقدار 5 مل لكل أنبوب وبعدها عقمت بالموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2.

3-3-2-6- وسط التربتوفان السائل Tryptophan broth medium

يستعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتيريا على تكوين حلقة الاندول(Harrigan and McCance,1976) وحضر من إذابة 10 غم من التربتوفان مع 5 غم من كلوريد الصوديوم في 1 لتر من الماء المقطر وأجريت معايرة للأس الهيدروجيني إلى 7.5 ومن ثم وزع الوسط في أنابيب اختبار بمقدار 5 مل لكل أنبوب وبعدها عقمت بالموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2.

3-3-2-7- وسط سترات سايمون Simmon citrate medium

يستعمل هذا الوسط لأختبار قابلية البكتيريا على استهلاك السترات بأعتباره مصدراً وحيداً للكاربون(بلازيفيك وادرر،1983) وحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة.

3-3-2-8- وسط أكار الحديد ثلاثي السكريات Triple sugar iron agar medium

يستعمل هذا الوسط في اختبار قدرة البكتيريا على تخمير كل من سكر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز وإنتاج H_2S وCO_2 (Collee وآخرون،1996) وحضر وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة للوسط (Himedia) وبعدها وزع في أنابيب اختبار بشكل مائل ولقح بالتخطيط والطعن.

3-3-2-9- وسط أكار اليوريا Urea agar

يستعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتيريا على أنتاج إنزيم اليوريز(Collee وآخرون،1996)، حضر هذا الوسط من إذابة 4.6 غم من مسحوق وسط اليوريا الأساس في 195 مل من الماء المقطر بعدها عقم الوسط بالموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2 ثم برد إلى درجة حرارة 50م° وبعدها أضيف 10 مل من محلول اليوريا 4% المعقم بالترشيح في الوسط ثم وزع في أنابيب اختبار معقمة.

3-3-2-10- وسط الإدامة Maintenance medium

يستعمل هذا الوسط لحفظ العزلات البكتيرية (Feltham وآخرون،1978) حضر هذا الوسط من إضافة الكلسيرول بتركيز 15% إلى وسط المرق المغذي Nutrient broth.

3-3-2-11- وسط الماكونكي MacConkey agar

يستعمل هذا الوسط بوصفه وسطا انتخابيا للبكتيريا السالبة لصبغة كرام وللتفريق بين المستعمرات المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز(مكي،2013) وحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة.

3-3-2-12- وسط اكار الدم Blood agar

حضر هذا الوسط بإذابة 5 غم من وسط Blood agar base في95 مل من الماء المقطر، ثم عقم بالموصدة بدرجة 121مْ وضغط 15 باوند/انج^2 ولمدة 15 دقيقة, ومن ثم ترك ليبرد لدرجة 45 مْ ثم اضيف اليه الدم البشري بنسبة 5%، وبعد المزج صب الوسط في اطباق بتري وترك ليتصلب، استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات على انتاج انزيم الهيمولايسين(مكي،2013).

3-3-3- تحضير الكواشف والصبغات

3-3-3-1- كاشف فوكس بروسكار Voges –proskuer reagent

يستعمل هذا الكاشف لأختبار قدرة البكتيريا على تخمير سكر الكلوكوز وبحسب Collee وآخرون (1996) فأن الكاشف يتطلب تحضير محلولين:

محلول A : حضر من إذابة 5 غم من مادة الالفا نفثول في 90 مل من الكحول الاثيلي تركيز 99% ثم يكمل الحجم إلى 100 مل .

محلول B : حضر من إذابة 50 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم يكمل الحجم إلى 100 مل .

3-3-3-2- كاشف المثيل الأحمر Methyl Red (MR) reagent

حضر هذا الكاشف من إذابة 0.1 غم من صبغة احمر المثيل Methyl Red في 300 مل من الكحول الاثيلي ومن ثم يكمل الحجم إلى 500 مل بالماء المقطر المعقم (Collee وآخرون،1996).

3-3-3-3- كاشف لوكاس Lucas reagent

يستعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتيريا على تحليل النشأ (Buxton and Frase,1977) ويحضر من إذابة 2 غم من يوديد البوتاسيوم (KI) في 100 مل من الماء المقطر المعقم مع إذابة 1 غم من اليود ضمن نفس المحلول ومن ثم أكمل الحجم إلى 300 مل من الماء المقطر المعقم.

3-3-3-4- كاشف اختزال النترات Nitrate reduction reagent

يتكون هذا الكاشف بحسب Cowan (1977) من محلولين :

محلول A: حضر من إذابة 8 غم من حامض السلفانلك Sulfanilic acid في1 لتر من حامض الخليك.

محلول B: محلول الالفا نفثول 5% في وحضر من إذابة 5 غم من صبغة الالفا نفثول في 100 مل من حامض الخليك (تركيز 40%) .

3-3-3-5- عدة صبغة كرام Gram stain kit

تتكون هذه العدة بحسب Atlas وآخرون (1995) من البلور البنفسجي Crystal violet ومن الايودين Iodine والايثانول والسفرانين Sofranin.

3-3-4- تشخيص العزلات البكتيرية Diagnosis of bacterial isolates

أُجريت عدة اختبارات زرعية ومجهرية وكيموحيوية من أجل معرفة صفات وشكل المستعمرات البكتيرية والمسار الايضي للعزلات البكتيرية المستعملة في هذه الدراسة واعتمد Black (1965) ومكي (2013) وجاسم (2017) والونداوي وزوين(2020) في تشخيص تلك العزلات وكما يلي:

3-3-4-3-1- الصفات الزرعية Cultural attributes

درست الصفات المظهرية للعزلات البكتيرية النامية على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar كشكل ولون المستعمرات وسطح المستعمرات ووجود الروائح من عدمها ولمعان المستعمرات وشفافية وقوام وشكل حواف تلك المستعمرات (Black,1965).

3-3-4-3-1-1- النمو على وسط الماكونكي MacConkey agar

يستعمل هذا الوسط لتنمية مستعمرات البكتيريا السالبة لصبغة كرام عليه إذ يعد هذا الوسط وسطا تفريقياً لذلك استعمل لدراسة الصفات المظهرية وللتفريق بين المستعمرات البكتيرية المخمرة لسكر اللاكتوز عن غير المخمرة لسكر (مكي،2013).

3-3-4-3-1-2- النمو على وسط أكار الدم Blood agar

يستعمل هذا الوسط في عزل وتنمية البكتيريا وتحديد فعالية تحلل الدم من قبل العزلات البكتيرية إذ ويدل ظهور مناطق شفافة حول نمو المستعمرات البكتيرية على قدرتها على تحلل مكونات كريات الدم الحمر (مكي،2013).

3-3-4-3-2- الفحص المجهري المباشر Direct microscopic examination

فحصت العزلات البكتيرية مجهرياً من خلال أخذ مسحة من المستعمرات البكتيرية وتثبيتها ومن ثم تصبيغها بصبغة كرام من أجل دراسة أشكال المستعمرات البكتيرية وترتيبها وتفاعلها مع الصبغة موجبة كانت أم سالبة.

3-3-4-3-3- الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

3-3-4-3-3-1- اختبار أنتاج إنزيم الكاتاليز Catalase test

جرى هذا الإختبار من خلال إضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين على المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط المغذي الصلب في طبق بتري لكل عزلة بكتيرية على حده، يتم الحكم على نتيجة الاختبار من تحرر أو عدم تحرر الفقاعات هوائية بعد مرور ثواني قليلة جداً من الإضافة (Baron and Fingold,1990).

3-3-4-3-2- اختبار الحركة Motility test

جرى هذا الإختبار من خلال تلقيح أنابيب الاختبار الحاوية على وسط الاكار المغذي شبه الصلب بالعزلات البكتيرية كلاً على حده بطريقة الطعن وبعد تحضينها على درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، يتم الحكم على أيجابية الاختبار من انتشار النمو خارج خط الطعن (Collee وآخرون،1996).

3-3-4-3-3- اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test

جرى هذا الإختبار من خلال تلقيح أنابيب الاختبار الحاوية على وسط النترات السائل بالعزلات البكتيرية كلاً على حده وحضنت لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37 م° ثم أضيف اليها 0.1 مل من كاشف اختزال النترات ويمكن الحكم على ايجابية الاختبار من خلال ظهور اللون الأحمر خلال عدة دقائق من إضافة الكاشف (Collee وآخرون،1996).

3-3-4-3-4- اختبار أنتاج أنزيم اليوريز Urease test

جرت عملية تخطيط لوسط اكار اليوريا المائل بالعزلات البكتيرية المراد تشخيصها كلا على حده وحضنت لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37 م° ،يتم الحكم على أيجابية الاختبار من تحول لون الوسط من اللون الأصفر إلى اللون الوردي الأحمر دلالة على قابلية البكتيريا على أنتاج انزيم اليوريز (Collee وآخرون،1996).

3-3-4-3-5- اختبار المثيل الأحمر Methyl Red test

جرى هذا الإختبار من خلال تلقيح أنابيب اختبار حاوية على وسط Methyl red –Vogas proskauer broth بالعزلات البكتيرية المطلوب تشخيصها كلا على حده وبعدها حضنت الأنابيب الملقحة على درجة حرارة 37 م° ولمدة 24-48 ساعة بعدها أضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر، يتم الحكم على أيجابية الاختبار من تحول لون الوسط إلى اللون الأحمر (Collee وآخرون،1996).

3-3-4-3-6- اختبار فوكس بروسكار Voges Proskauer test

جرى هذا الاختبار من خلال تلقيح أنابيب اختبار حاوية على وسط Methyl red –Vogas Proskauer broth بالعزلات البكتيرية المطلوب تشخيصها كلا على حده وبعدها حضنت الأنابيب الملقحة على درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة بعدها أضيف لها 1 مل من كاشف فوكس بروسكار وأن ظهور اللون الأحمر لتلك العزلات دلالة على نتيجة موجبة لهذا الاختبار(Collee وآخرون،1996).

3-3-4-3-7- اختبار الاندول Indol test

جرى هذا الإختبار من خلال توزيع وسط التربتوفان السائل Tryptophan broth وتلقيحه بالعزلات البكتيرية المراد اختبارها كلا على حده وبعدها حضنت الأوساط الملقحة على درجة حرارة 30 م° ولمدة 48 ساعة وبعدها أضيف لكل أنبوبة اختبار عدة قطرات من كاشف كوفاك ويدل ظهور حلقة حمراء على سطح أنابيب الاختبار على نتيجة موجبة للأختبار(Harrigan and McCance,1976).

3-3-4-3-8- اختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test

جرى هذا الاختبار من خلال تحضير أكار النشأ في ثلاث أطباق بتري وبعدها نشر 0.1 من العالق البكتيري لكل عزلة بكتيرية على حده على سطح أكار النشأ ومن ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وبعد التحضين لوحظ تكون مستعمرات بكتيرية محاطة بهالة شفافة وعندها أضيف أليها 1 مل من محلول Lucas Iodine reagent وان تلون الوسط باللون الأزرق أو الاسود عدا المنطقة الشفافة المحيطة بالمستعمرات يعني أن النتيجة موجبة أي أن البكتيريا محللة للنشأ (Baron and Fingold,1990).

3-3-4-3-9- اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

جرى هذا الاختبار من خلال تلقيح أنابيب اختبار حاوية على وسط أكار سترات سايمون Simmon Citrate agar بمستعمرات بعمر 24 ساعة من العزلات البكتيرية، بعدها حضنت على 37 م° ولمدة 24 ساعة وبعد التحضين لوحظ تحول اللون من الأخضر إلى الأزرق دلالة على نتيجة موجبة لهذا الاختبار(Collee وآخرون،1996).

3-3-4-3-10- اختبار النمو على وسط أكار الحديد ثلاثي السكريات Triple sugar iron agar

جرى هذا الاختبار من خلال تلقيح أنابيب إختبار حاوية على وسط أكار الحديد ثلاثي السكريات المائل بالعزلات البكتيرية الثلاث بشكل منفرد بطريقة التخطيط على سطح الوسط في أنابيب الاختبار والطعن عند قعر تلك الأنابيب. وبعدها حضنت على درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ويشير تغير لون الوسط إلى اللون الأصفر إلى النتيجة الموجبة فضلاً عن تكون راسب اسود من كبريتيد الحديدوز FeS دلالة على النتيجة الموجبة (جاسم،2017).

3-3-5- اختبار التضاد الحيوي بين العزلات البكتيرية Antagonistic test

يستعمل هذا الاختبار للتأكد من مدى ملائمة أو ألفة العزلات البكتيرية لبعضها البعض إذ تتطلب الدراسة عمل توليفات مزدوجة وثلاثية من العزلات البكتيرية الثلاثة في تحضير المعززات الحيوية الأمر الذي يتطلب التأكد من إنتاج بعض العزلات لمواد مثبطة لنمو العزلات الأخرى كالمضادات الحيوية والبكتريوسينات، أُجري هذا الاختبار بأستعمال طريقة الخطوط المتعامدة Cross streaks إذ زرعت العزلات البكتيرية بشكل ثلاث خطوط مستقيمة متقاطعة بشكل علامة (X) على طبق يحتوي على الاكار المغذي وبعدها حضنت الأطباق على درجة حرارة 30 م° ولمدة 48 ساعة (جاسم،2017).

3-3-6- اختبار قدرة العزلات البكتيرية الثلاث على تكوين الاغشية الحيوية Biofilms

نميت العزلات البكتيرية الثلاث في أنابيب اختبار تحتوي على 10 مل من وسط Tryptic soya broth والذي حضر حسب تعليمات الشركة المنتجة Oxoid من إذابة 30 غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر وبعدها عقم الوسط من خلال إدخاله إلى الموصدة على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2 ولمدة 20 دقيقة ومن ثم أضيف له سكر الكلوكوز بتركيز 1%، كما نميت نفس العزلات في أنابيب تحتوي على وسط Nutrient broth المحضر بنفس الطريقة المذكورة سالفاً وبواقع 3 أنابيب لكل عزلة بعدها حضنت تلك الأنابيب على درجة حرارة 37م° ولمدة 72 ساعة وبعد إنتهاء التحضين سكبت محتويات الأنابيب وأضيف لها 10 مل من صبغة السفرانين تركيز 0.1% وبعدها تركت لمدة دقيقة واحدة ومن ثم سكبت الصبغة ومن ثم تركت الأنابيب لتجف لملاحظة تكوين الأغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر أنابيب الاختبار إذ أن ظهور الحلقة الحمراء دلالة على تكوين الغشاء الحيوي (Christesen وآخرون،1982 ؛ جاسم،2017).

3-3-7- اختبار حيوية بكتيريا المعززات الحيوية بعد خزنها على درجة حرارة 4 م°

جرى هذا الاختبار لتقييم حيوية المستعمرات البكتيرية للعزلات البكتيرية الثلاثة بإعتماد الطريقة الموصوفة من قبل Trisnawita وآخرون (2018) إذ خزنت المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المفردة الاول والثاني والثالث المحضرة مختبرياً بالتخفيف 10^{-6} في الثلاجة على درجة حرارة (4) م° بعد أن تم تقدير عدد المستعمرات البكتيرية لكل معزز حيوي في بداية التحضير (CFU/ml) وبعد مضي مدة 15 و30 يوم من التخزين، أُجريت سلسلة من التخافيف العشرية ولحين الوصول إلى التخفيف 10^{-6} (CFU/ml) وبعدها حضرت أطباق بتري حاوية على وسط الاكار المغذي الصلب بمعدل 3 أطباق لكل معززات حيوي ولقحت بلقاح من التخفيف المذكور وحضنت الأطباق على درجة

حرارة 30 م° ولمدة 5 أيام، وبعد انتهاء مدة التحضين أُجري عد للبكتيريا الفعالة واعتمد التخفيف المطلوب مع عدد المستعمرات البكتيرية المعدودة في الأطباق ضمن المدى (30–300) مستعمرة بكتيرية في حساب وحدة تكوين المستعمرات لكل معزز حيوي (Abbas ; Carollina,2015 وآخرون،2016). ولتقدير عدد الأعداد البكتيرية في العينة الواحدة أستعملت المعادلة المشار إليها من قبل الدليمي (1988):

$$\text{عدد البكتيريا في العينة} = \frac{\text{معدل عدد المستعمرات} \times \text{مقلوب التخفيف}}{\text{حجم أو وزن العينة}}$$

3-3-8- خطوات تحضير المعززات الحيوية

3-3-8-1- تحضير المعززات الحيوية

حضرت المعززات الحيوية وفق الطريقة المعتمدة من قبل Mohapatra وآخرون (2014) مع بعض التعديلات، إذ نميت العزلات البكتيرية على وسط المرق المغذي Nutrient broth وحضنت على درجة حرارة 28 م° ولمدة 48 ساعة، وبعد اكتمال عملية التحضين أجريت عملية طرد مركزي للأنابيب الملقحة بالعزلات البكتيرية على سرعة 6000 rpm ولمدة 20 دقيقة بعدها تم التخلص من الراشح والاحتفاظ بالدقائق البكتيرية والتي تكون بشكل راسب ابيض في أسفل كل أنبوبة اختبار وبعدها أجريت عملية غسل للمستعمرات البكتيرية المترسبة وذلك بإستعمال محلول ملح دارئ الفوسفات Phosphate Buffer Saline (PBS) ذو الأس الهيدروجيني 7.2، بعد ذلك أُجريت عملية التخافيف العشرية للوصول إلى التخافيف المطلوبة 10^{-6} و10^{-7} وبعدها تم عد وحدة تكوين المستعمرات CFU لكل معزز حيوي بطريقة صب الإطباق على وسط Nutrient agar وبعد مرور 48 ساعة على تحضينها على درجة حرارة 30 م° وعدت المستعمرات البكتيرية بشكل يدوي ضمن المدى 30–300 مستعمرة بكتيرية (الدليمي،1988). بعد ذلك شكلت المعززات الحيوية بالتوليفات المشار أليها في الجدول (4) وبنسب متساوية 1 للمعزز الأول بتخفيف $2.30*10^{-6}$ و$0.91*10^{-7}$ والثاني بتخفيف $2.55*10^{-6}$ و$0.98*10^{-7}$ والثالث بتخفيف $2.57*10^{-6}$ و$1.05*10^{-7}$ و1:1 للرابع والخامس والسادس و1:1:1 للمعزز السابع.

جدول (4) التوليفات البكتيرية للمعززات الحيوية

المعززات الحيوية	العزلات البكتيرية		
	L. acidophilus 4453	*B. Bifidum* 5144	*S. thermophilus* 5935
المعزز الحيوي 1	✓	–	–
المعزز الحيوي 2	–	✓	–
المعزز الحيوي 3	–	–	✓
المعزز الحيوي 4	✓	✓	–
المعزز الحيوي 5	✓	–	✓
المعزز الحيوي 6	–	✓	✓
المعزز الحيوي 7	✓	✓	✓

جدول (5) المعاملات التجريبية والتخافيف

التخفيف	المعززات الحيوية						
	المعزز الحيوي 1	المعزز الحيوي 2	المعزز الحيوي 3	المعزز الحيوي 4	المعزز الحيوي 5	المعزز الحيوي 6	المعزز الحيوي 7
C_A بدون أي إضافة	C_0						
C_B الصمغ العربي + ملح دارئ الفوسفات	20% الصمغ العربي + ملح دارئ الفوسفات						
$C_1(1*10^6$ CFU\ml)	$C_1 P_1$	$C_1 P_2$	$C_1 P_3$	$C_1 P_4$	$C_1 P_5$	$C_1 P_6$	$C_1 P_7$
$C_2 (1*10^7$ CFU\ml)	$C_2 P_1$	$C_2 P_2$	$C_2 P_3$	$C_2 P_4$	$C_2 P_5$	$C_2 P_6$	$C_2 P_7$

3-3-8-2- تحضير العليقة التجريبية

جهزت مواد العليقة التجريبية المبيّنة في جدول (6) من الأسواق المحلية إذ طحنت تلك المواد بشكل جيد بعد معرفة تركيبها الكيميائي وحسب ما ذكر في جدول (7) ، وبعدها حضرت توليفة علفية ذات محتوى متساوي من البروتين والطاقة ومن ثم مزجت بشكل جيد لضمان تجانسها، بعدها كبس الخليط في معمل أعلاف الديوانية الواقع في جنوب محافظة الديوانية ذا القدرة 4 طن/ ساعة إلى أقراص علفية ذات قطر 3 ملم ومن ثم تركت لتجف هوائياً خارج المعمل، و بعد جفافها عبأت في أكياس بلاستيكية سعة 50 كغم لحين الاستعمال، وأخذت عينة منها للتحليل ومعرفة التركيب الكيميائي لها كما مبّين في جدول (6).

جدول (6) مكونات العليقة التجريبية

ت	المكونات	نسبتها في العليقة
1	كسبة فول الصويا*	% 40
2	مركز بروتيني الوافي**	% 20
3	نخالة الحنطة	% 15
4	ذرة صفراء	% 15
5	شعير	% 5
6	طحين الحنطة	% 3
7	بريمكس ***	%1
8	زيت طعام	%1

التركيب الكيميائي للعليقة	
العنصر	**النتيجة (%)**
الرطوبة	5.03
المادة الجافة	94.97
البروتين الخام	29.14
الدهن	1.74
الالياف الخام	4.48
المستخلص الخالي من النتروجين	56.13
الرماد	8.51
الطاقة الكلية (Kcal/g) ****	417.95
الطاقة المهضومة (Kcal/g) *****	313.46
الطاقة الممثلة (Kcal/g) ******	341.26
نسبة البروتين : الطاقة *******	92.96

***كسبة فول الصويا** نوع Eagle أرجينية المنشأ

****مركز بروتيني الوافي** هولندي المنشأ ذو تركيب كيماوي : بروتين خام (40%) ودهن خام (5%) وألياف خام (2.81%) ورطوبة (8.76%) ورماد (23.45%) والكالسيوم (3.14%) والفسفور (2.65%) والفسفور المتاح (5.38%) واللايسين (3.85%) واللايسين المهضوم (4.14%) والميثيونين (3.70%) والميثيونين المهضوم (3.67%) وميثيونين+ سيستين (4.12%) وميثيونين مهضوم + سيستين (4.52%) وتربتوفان (0.42%) وتربتوفان مهضوم (0.45%) وثريونين (1.80%) وثريونين مهضوم (2.16%) وايزوليوسين (1.45%) وايزوليوسين مهضوم (1.88%) وفالين (1.69%) وفالين مهضوم (2.09%) والارجنين (2.48%) والارجنين المهضوم (2.57%) وفيتامين A (200000.29 وحدة دولية/كغم) وفيتامين D_3 (80000.11 وحدة دولية/كغم) وفيتامين E (500.00 ملغم/كغم) وفيتامين B1 (60.00 ملغم/كغم) وفيتامين B2 (140.00 ملغم/كغم) وفيتامين B6 (80.00 ملغم/كغم) وفيتامين B12 (700.00 مايكروغرام/كغم) والبايوتين (2 ملغم/كغم) والنياسين (800.00 ملغم/كغم) وحامض الفوليك (20.00 ملغم/كغم) وفيتامين K_3 (50.00 ملغم/كغم) و Calcium D-pantothenae (300.00 ملغم/كغم) وكلوريد الكولين (7.000.00 ملغم/كغم) والكولين (6.073.20 ملغم/كغم) والحديد (1000.00 ملغم/كغم) والنحاس (200.00 ملغم/كغم) والمنغنيز (1600.00 ملغم/كغم) والزنك (1200.00

ملغم/كغم) واليود (20.00 ملغم/كغم) والسيلينيوم (500 ملغم/كغم) وأنزيم 6-Phytase EC 3.1.3.26 (20.000.00 fyt/ كغم) و B.H.T (33.50 ملغم/كغم) و Propyl Gallate (2.80 ملغم/كغم) وحامض الستريك (5.00 ملغم/كغم).

*** **بريمكس mfkvitamin** تركي المنشأ يحتوي 1 كغم منه على فيتامين A (500000 وحدة دولية) ، فيتامين D3 (100000 وحدة دولية) فيتامين E (250 ملغم) ، فيتامين B1 (11 ملغم) ، B2 (18537 ملغم) ، B3 (1200 ملغم) ، B6 (9.8 ملغم) ، B12 (1 ملغم) ، K3 (11 ملغم) ، فيتامين C (12 ملغم) ، الحديد (5000 ملغم) ، النحاس (1000 ملغم) ، الزنك (5000 ملغم) ، المنغنيز (5000 ملغم) ، المغنيسيوم (15000 ملغم) ، اليود (80 ملغم) ، الكوبلت (10 ملغم) ، السلينيوم (10 ملغم) ، الفسفور (2700 ملغم) ، الكالسيوم (5400 ملغم) ، الصوديوم (35000 ملغم) ، مضاد أكسدة (BHT) (100 ملغم).

**** **الطاقة الكلية (Kcal/g)** : حسبت بأستعمال القيم (البروتين×5.65) + (الدهن× 9.4) +المستخلص الخالي من النتروجين×4.22) حسب NRC (1993).

***** **الطاقة المهضومة (Kcal/g)** : حسبت بضرب المعامل 0.75 في الطاقة الكلية لتحويلها الى الطاقة المهضومة حسب Hepher وآخرون (1983) .

****** **الطاقة الممثلة (Kcal/g)** : حسبت بأستعمال القيم (4.5× البروتين) + (8.51× الدهن) + (3.48× المستخلص الخالي من النتروجين) حسب Jauncey و Ross (1982).

******* **نسبة البروتين : الطاقة** : البروتين الخام×1000/ الطاقة المهضومة، حسب Hepher وآخرون (1983).

جدول (7) التحليل الكيميائي للمواد الداخلة في تكوين العليقة التجريبية

المادة العلفية	التركيب الكيميائي				
	البروتين %	مستخلص الايثر %	الرماد %	الألياف %	المستخلص الخالي من النايتروجين %
مركز بروتيني الوافي*	40.0	5.0	23.45	2.81	15.14
كسبة فول الصويا*	43.8	2.72	7.21	6.9	39.37
الذرة الصفراء**	9.68	5.04	2.09	2.72	80.27
الشعير **	11.83	1.53	4.11	7.0	75.81
نخالة الحنطة **	15.72	4.47	5.52	11.8	62.49
طحين الحنطة**	10.5	1.5	0.44	0.5	76.0

*حسب البطاقة المثبتة على المنتوج من قبل الشركة المصنعة .

**حسب AOAC (1980)

3-3-8-3- إضافة المعززات الحيوية إلى معلق الصمغ العربي

أُستعمل معلق الصمغ العربي مع ملح دارئ الفوسفات 20% كمادة مغلفة ورابطة للخلايا البكتيرية لزيادة ثباتيتها وبقاءها على دقائق العلف (Fazilah وآخرون،2019)، إذ حضر المعلق من خلال إذابة 20 غم من مسحوق الصمغ العربي في 100 مل من محلول ملح دارئ الفوسفات ومن ثم أضيف 10 مل منه إلى أنبوبة اختبار سعة 60 مل ومن ثم أضيفت أليه المعززات الحيوية بالتوليفات المشار إليها في الجدول (4) ولكلا التخفيفين (10^{-6} CFU\ml ، 10^{-7} CFU\ml) لأضافتها بعد ذلك إلى العليقة التجريبية.

3-3-8-4- إضافة المعززات الحيوية إلى العليقة التجريبية

أُضيفت المعززات الحيوية بمعدل 10 مل لكل 100غم من العليقة التجريبية بإعتبارها مادة حاملة للمعززات الحيوية المخصصة لمدة (15) يوم ولكلا التخفيفين وحسب التوليفات المشار أليها في الجدول (4) ومزجت المعززات الحيوية مع الكميات المخصصة من العليقة التجريبية لكل منها بأعتماد طريقة Wanka وآخرون (2018) وتركت العلائق التجريبية لتجف على درجة حرارة 25 م° وبعد ذلك حفظت المعززات الحيوية بدرجة 4 م° وغذيت عليها الأسماك بشكل يومي وبمستوى تغذية 5% من الكتلة الحية ، وبحسب نتائج حيوية بكتيريا المعززات الحيوية في الجدول (10) حضرت المعززات الحيوية كل 30 يوم مع حيوية مقبولة للعزلات البكترية الثلاث.

3-3-9- أسماك التجربة

جلبت 500 سمكة من أصبعيات الكارب الشائع من أحد المفاقس الأهلية في قضاء المحاويل في محافظة بابل بمعدل وزن (44±0.69) غم وفور وصول الأسماك إلى موقع التجربة أُقلمت حرارياً وبصورة تدريجية ثم وضعت أسماك التجربة في حمام ملحي بتركيز 0.3% لمدة 5 دقائق لغرض التخلص من المسببات المرضية إن وُجدت والتي تؤثر في مسار التجربة بعدها وضعت في قفص الخزن لحين توزيعها على الحاويات التجريبية.

3-3-10- مدة الأقلمة

اختيرت 288 سمكة وزّعت عشوائياً وبالتساوي على الحاويات التجريبية، إذ وضع في كل حاوية بلاستيكية 6 أسماك لغرض الأقلمة عليها واستمرت مدة الأقلمة 14 يوماً جوعت الأسماك لمدة ثلاثة أيام وبعدها قدم لها الغذاء بنسبة 1% من وزن الكتلة الحية في كل حوض وبمعدل وجبتين لليوم الواحد.

3-3-11-مكان التجربة

أُجريت تجربة النمو في محطة الأبحاث والتجارب الزراعية الأولى التابعة لكلية الزراعة/جامعة المثنى في منطقة أم العكف في محافظة المثنى لمدة 12 أسبوع من تاريخ 2022/3/3 إلى

2022/6/3 في حوض ترابي بطول 45 م وعرض 35م وعمق 1.5م يبعد عن نهر العطشان حوالي 570م وحسب الإحداثيات E 31.32139445.189309, N في الشكل (1) ويجهز بالمياه عن طريق مضخة كهربائية بقدرة 40 حصان منصوبة على جانب النهر عن طريق أنبوب ذا قطر 8 أنج وذا فوهة محكمة بحاجز مشبك بلاستيكي لمنع دخول الأحياء المائية والأجسام الغريبة القادمة من النهر إلى الحوض وتفرغ مياه الحوض بشكل جزئي ومستمر، كما نصب على الحوض جسر حديدي مرصوف بالخشب بطول 24م وعرض 60 سم على شكل حرف (T) لتسهيل عملية تغذية الأسماك ووزنها وأخذ عينات المياه لغرض إجراء القياسات البيئية، زود الجسر بحلقات حديدية لتثبيت الحاويات التجريبية العائمة. جهزت حاويات بلاستيكية دائرية الشكل بعدد 48 حاوية وكانت أبعاد الحاوية الواحدة (قطر50 سم وعمق 65 سم) وبحجم 0.127 م^3 ، أما هيكل الطفو فقد أستعملت أنابيب بلاستيكية بقطر10 سم بشكل مستطيل لعمل أطار بلاستيكي بأبعاد 2.5م × 1.250م وقد ثبت على الإطار البلاستكي لوحة خشبية مستطيلة الشكل بأبعاد 2.5 م × 1.250 م كما عملت فتحات على تلك اللوحة بقطر 53 سم لإدخال الحاويات منها واستقرارها في المياه وعملت أغطية للحاويات من أطار حديدي بقطر 50 سم وثبتت عليه شباك ذا فتحات بقطر 0.5 سم لحمايتها من الطيور وبنفس الوقت تسمح بتقديم الغذاء من خلالها كما ثبت هيكل الطفو بأشرطة حديدية بالجسر الحديدي لتثبيتها خلال ضخ المياه وحركة الرياح. كما زود الحوض بقفص بلاستيكي بطول 2م وعرض 1م وارتفاع 1م مغطى بشباك بلاستيكية ذات فتحات بقطر0.5 سم للأحتفاظ بالأسماك قبل الشروع بتوزيعها على الحاويات العائمة التجريبية وللإحتفاظ بما يتبقى منها. أُجريت فحوصات دورية لتقييم نوعية المياه وبيان مدى صلاحيته لإستزراع الأسماك من حيث كمية الأوكسجين المذاب في الماء والأُس الهيدروجيني والملوحة مع قياس درجة حرارة الماء بشكل يومي.

صورة (1) خارطة موقع محطة الأبحاث والتجارب الزراعية الأولى موقع إجراء التجربة بإستعمال برنامج الخرائط Google map وحسب الإحداثيات (N ,31.32139445.189309 E)

3-3-12- المعايير المدروسة

3-3-12-1- الزيادة الوزنية الكلية Weight Gain

تحسب من طرح الوزن الابتدائي من الوزن النهائي وكما يأتي :

الزيادة الوزنية = الوزن النهائي- الوزن الابتدائي

3-3-12-2- معدل النمو اليومي Daily Growth Rate

هو أحد المعايير الشائعة لمعدل الزيادة الوزنية خلال مدة محددة، وحسب المعادلة التي ذكرها Schmalhousen (1926).

معدل النمو اليومي = (الوزن النهائي- الوزن الابتدائي)/المدة الزمنية للتجربة

3-3-12-3- معدل النمو النسبي Relative Growth Rate

ويحسب وفق المعادلة التي ذكرها Uten (1978) ويعبر عنه بنسبة مئوية (%)

معدل النمو النسبي = (الوزن النهائي- الوزن الابتدائي/ الوزن الابتدائي)×100

3-3-12-4- معدل النمو النوعي Specific growth rate

ويعبر عن الزيادة الوزنية اليومية بالنسبة المئوية ويقدر حسب الطريقة التي ذكرها Brown (1957) و يعبر عنه (%/يوم).

معدل النمو النوعي= اللوغارتم الطبيعي للوزن النهائي- اللوغارتم الطبيعي للوزن الابتدائي/المدة الزمنية للتجربة ×100

3-3-12-5- معامل النمو الحراري Thermal growth coefficient

ويقدر حسب المعادلة التي ذكرها Cho (1992):

$$\text{معامل النمو الحراري} = \frac{(\text{الوزن النهائي})^{0.3333} - (\text{الوزن الابتدائي})^{0.3333}}{\text{مدة التجربة} \times \text{درجة الحرارة}} \times 100$$

3-3-12-6- معدل النمو الايضي Metabolic growth rate

ويحسب على أساس كتلة الجسم الكلية لكل كتلة جسم أيضية في اليوم ويقدر حسب المعادلة التي ذكرها Dabrowski وآخرون (1986):

معدل النمو الايضي = الزيادة الوزنية (غم)/[{(الوزن الابتدائي/1000)$^{0.8}$ + الوزن النهائي/ 1000)$^{0.8}$}/ 2]/مدة الدراسة

3-3-12-7- معدل التحويل الغذائي Feed conversation rate

ويحسب بالمعادلة التي ذكرها Uten (1978) وكما يأتي:

معدل التحويل الغذائي= وزن الغذاء المقدم/الزيادة الوزنية للأسماك

3-3-12-8- كفاءة التحويل الغذائي Feed Conversion Efficiency

يعبر عنها بالنسبة المئوية وتقدر كفاءة التحويل الغذائي حسب المعادلة التي ذكرها Uten (1978):

كفاءة التحويل الغذائي = الزيادة الوزنية للأسماك/وزن الغذاء المقدم × 100

3-3-12-9-البروتين المتناول Protein intake

ويقدر حسب المعادلة التي ذكرها Gerking (1971) :

البروتين المتناول= نسبة البروتين في العلف× كمية العلف المتناول

3-3-12-10- نسبة كفاءة البروتين Protein Efficiency ratio

هو أحد المؤشرات المستخدمة لتقدير الزيادة الوزنية لكل وحدة من البروتين المتناول في العليقة وتقدر حسب المعادلة التي ذكرها Gerking (1971).

نسبة كفاءة البروتين= الزيادة الوزنية الكلية/ البروتين المتناول

3-3-12-11- القياسات الفيزيائية والكيميائية للمياه

أُخذت عينة من مياه الحوض الطيني الموجودة فيه الحاويات التجريبية صباحاً مرتين شهرياً لقياس بعض المعايير الفيزيائية والكيميائية للمياة في مختبرات مديرية البيئة في محافظة المثنى كدرجة الحرارة والاوكسجين المذاب في الماء والاس الهيدروجيني والملوحة والمواد الصلبة الكلية التي تؤثر على أسماك التجربة.

3-3-12-12- فحوصات الدم

بعد انتهاء التجربة أخذت 2 سمكة من كل معاملة وسحب منها الدم من الوريد الذنبي بواسطة محقنة بلاستيكية سعة 3 مل وسحب منها الدم بكمية تراوحت ما بين(1-2) مل ووضعت عينة الدم داخل أنابيب تحتوي على مادة مانعة للتخثر EDTA وأجريت فحوصات الدم في مختبر الركابي للتحليلات المرضية في محافظة المثنى كتقدير خلايا الدم الحمر وخلايا الدم البيض وأنواعها وتركيز هيموغلوبين الدم ومكداس الدم بأستعمال جهاز Coboc C411 ذا منشأ أمريكي، كما وضعت عينات دم أخرى من نفس الأسماك داخل أنابيب اختبار حاوية على هلام تدعى Vacuum tube gel لا تحتوي على أي موانع تجلط بل تحتوي على مادة الهلام التي تساعد في فصل مصل الدم عن خلايا

الدم لتقدير بعض مكونات الدم كالغلوبيولين المناعي IgM والبروتين الكلي لبلازما الدم والهرمون المحفز للغدة الدرقية TSH وهرمون الثايروكسين T3 وهرمون الثايرونين T4 والانزيم الناقل لأمين الالانين ALT والانزيم الناقل لأمين الاسبارتيت AST وانزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP بأستعمال الجهاز Genrui PA54 ألماني المنشأ.

3-3-12-13- أداء الدم لأسماك التجربة

هو أحد المؤشرات المستخدمة لتقدير نمو ومناعة الأسماك ويحسب وفق المعادلة التي ذكرها Esmaeili (2021):

Blood Performance = Ln Hb+ Ln Ht + Ln RBC + Ln WBC + Ln TP

إذ أن :

BP : أداء الدم

Ln Hb : اللوغارتيم الطبيعي للهيموغلوبين غم/ ديسيلتر

Ln Ht : اللوغارتيم الطبيعي لمكداس الدم (%)

Ln RBC : اللوغارتيم الطبيعي لخلايا الدم الحمر $10^6/mm^3$

Ln WBC : اللوغارتيم الطبيعي لخلايا الدم البيض $10^3/mm^3$

Ln TP : اللوغارتيم الطبيعي لبروتينات الدم الكلية غم/لتر

3-3-12-14- تحضير وفحص المقاطع النسيجية

أجريت الدراسة النسيجية في نهاية تجربة النمو إذ أختيرت عشوائياً عينتين من الأسماك لكل معاملة ونقلت الى مختبر الفسلجة في كلية الزراعة/ جامعة المثنى، شُرحت الأسماك من الجهة البطنية بإستعمال أدوات تشريح خاصة وأخذت قطعة من الامعاء الوسطى بطول 1 سم ووضعت في أوعية بلاستيكية صغيرة محكمة الأغلاق مرقمة حسب المعاملات وبسعة 100مل تحوي على الفورمالين بتركيز 10% ، حضرت الدراسة النسيجية بإخراج العينات وغسلها بالماء الجاري ثم ثبتت في الفورمالين بتركيز 10% لمدة 24 ساعة ومن ثم نقلت الى الكحول الأثيلي بتركيز 70% لغرض التخلص من الفورمالين المتبقي في العينات وجرت عملية سحب الماء من العينات النسيجية والتخلص من كل الماء الموجود في عينة النسيج من خلال إستعمال سلسلة تصاعدية التركيز 70%، 80%، 90%، 100% من الكحول الأثيلي المطلق ولمدة ساعتين لكل تركيز ومن بعدها أُجريت عملية ترويق العينات Clearing بإستعمال مذيب الزايلين Xyelen للتخلص من الكحول المتبقي في النسيج بعد العملية

السابقة وعملية التشريب والطمر Embedding and Infilitration ، إذ أستعمل شمع البرافين الذائب في حوض درجة حرارته 57° لمدة 4 ساعات لغرض تشبع النسيج بالشمع تماماً وملئ الفراغات الموجودة فيه ثم تلتها عملية صب العينات في قوالب تقطيع نحاسية وبعد جفافها قطعت قوالب العينات بإستعمال المشرح الدوار Rotary microtome لتحضير عدة شرائح نسيجية رقيقة جداً بسمك 5 مايكرون مع جزء من النسيج المراد فحصة كما إستُعمل لاصق Mayers albumin لتثبيت عينات المقاطع النسيجية على الشرائح الزجاجية وتلتها عملية صبغ عينات الأنسجة المثبتة على الشرائح الزجاجية بإستعمال صبغة Hematoxylen –Eosin Stain للتعرف على التركيب العام للنسيج وحسب طريقة (Bancroft and Gamble,2008 ؛ Luna,1968). بعدها فحصت وصورت المقاطع النسيجية المحضرة بإستعمال المجهر المركب Compound Microscope نوع Leica Karl Kolb ذو منشأ ألماني وبعدسة عينية بقوة تكبير 100X ومزود بكاميرا رقمية متصلة مع شاشة حاسوب، إذ ثُبتت الشرائح الزجاجية الحاملة للمقاطع النسيجية على المشرح Stage Micrometer، تمت معايرة العدسة وتحريكها للحصول على الجزء المطلوب كسمك الطبقات المخاطية وتحت المخاطية والعضلية والمصلية وعدد الخلايا الكأسية وعدد الزغابات وطول الزغابات وسمك الزغابات إذ أُلتقطت صورة رقمية وحفظت لقراءتها وتأشيرها فيما بعد.

3-3-12-15- التحليلات الكيمياوية للعليقة التجريبية والأسماك

أُجري التحليل الكيميائي لعينات العليقة لمعرفة التركيب الكيميائي لها في مكتب الغدير للخدمات البيطرية في محافظة بابل باستعمال جهاز التحليل الطيفي Rapid content analyzer (NIR) سويدي المنشأ الذي يعمل وفق مبدأ التفاعل ما بين مكونات المادة المراد معرفة تركيبها الكيمياوي والشعاع الكهرومغناطيسي إذ يولد الجهاز الاشعة تحت الحمراء من خلال مصباح نرنست Nernst وهو سلك مكون من اكاسيد الزركونيوم والسيريوم والثوريوم إذ يسخن كهربائياً الى 1000–1800 م° أو من خلال مصباح غلوبر Globar وهو سلك من كاربيد السيليكون والذي يسخن كهربائياً لنفس الدرجة المذكورة سابقاً وبعدها تسلط تلك الاشعة الى حامل العينة الذي يعتبر الكاشف في الجهاز ويعتمد الجهاز في عمله على ما يُعرف بالطول الموجي للتعرف على المواد والمركبات الداخلة في تكوين العينة إذ أن كل مادة عضوية تمتص طولاً خاصاً من الموجات وبالتالي فأن طيفها يعتبر البصمة الخاصة بتلك المادة حصراً، كما يحتوي الجهاز على ذاكرة حاسب آلي تمكنه من تحليل وترجمة الموجات المتجمعة على الكاشف وتحويلها حاسوبياً لرسم الطيف الناتج عن الامتصاص وترجمتها الى نسب

وأرقام بعد مقارنتها مع النسب والأرقام القياسية المخزونة في بيانات الجهاز والتي يتم تحديثها سنوياً من خلال أخذ القيم المثالية للمواد الغذائية من جميع بلدان العالم واستخراج المعدل القياسي والنموذجي لكل مادة علفية الذي سيعتمد عليها الجهاز، وبحسب James (1996) قدرت النسبة المؤية للمستخلص الخالي من النايتروجين للعليقة وأسماك التجربة رياضياً من المعادلة التالية :

المستخلص الخالي من النتروجين%= 100– (البروتين%+ الدهن%+ الرماد%+ الألياف%).

3-3-12-16- العد المايكروبي الكلي للقناة الهضمية للأسماك

جرىٰ العد الكلي لإحياء القناة الهضمية لأسماك التجربة وفق الطريقة المشار أليها من قبل Faeed وآخرون (2020) إذ بعد مضي 84 يوم من تجربة تغذية أصبعيات أسماك الكارب الشائع على عليقتي السيطرة والعلائق الحاوية على المعززات الحيوية بالتوليفات البكتيرية والتخافيف المشار إليها في الجدولين (4) و(5) إذ اختيرت 4 أسماك من كل معاملة (سمكتان لكل تخفيف) وبعدها قطعت المنطقة البطنية ضمن ظروف معقمة ومن ثم استخرجت القناة الهضمية وأُفرغ محتواها من الغذاء وأضيف إليها محلول ملح دارئ الفوسفات وبعدها تم مجانستهما معاً ومن ثم أُجريت سلسلة من التخافيف العشرية من (10^{-1} 10^{-10}) CFU/ml وبعد ذلك لقحت أنابيب إختبار حاوية على وسط المرق المغذي السائل بكمية 1 مل من التخافيف العشرية لكل معاملة وتخفيف على حده وبمعدل 3 أنابيب بعدها حضنت تلك الأنابيب على درجة حرارة 30 م° ولمدة 5 أيام وبعد انتهاء مدة التحضين تم تقدير العد الكلي للبكتيريا بطريقة العدد الأكثر احتمالاً Most probable number (MPN) (Oblinger and Koburger,1975).

3-3-13-الفرضيات الإحصائية Statistical hypotheses

أ- الفرضية الصفرية Null hypothesis

افترض البحث عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية التي احتوت على عزلات بكتيرية مع معاملة المقارنة التي لا تحتوي على أي عزلة بكتيرية كمعززات حيوية وكذلك عدم وجود فروق معنوية بين مستويات التخفيف

$$\bar{x}T0= \bar{x}T1= \bar{x}T2= \bar{x}T3= \bar{x}T4= \bar{x}T5= \bar{x}T6= \bar{x}T7$$

ب- الفرضية البديلة Alternative hypothesis

أفترض البحث وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية التي احتوت على عزلات بكتيرية مع معاملة المقارنة التي لا تحتوي على أي عزلة بكتيرية كمعززات حيوية وكذلك وجود فروق معنوية بين مستويات التخفيف للمعاملات المذكورة مع تساوي واحدة او اكثر من المعاملات مع معاملة المقارنة

$$\bar{x}T0 \neq \bar{x}T1 \neq \bar{x}T2 \neq \bar{x}T3 \neq \bar{x}T4 \neq \bar{x}T5 \neq \bar{x}T6 \neq \bar{x}T7 = \bar{x}T? = \bar{x}T?$$

3-3-14- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

استعمل البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS النسخة (26) في تحليل البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design(CRD) بسبعة عوامل للتخفيف 10^{-6} وبسبعة عوامل أخرى للتخفيف 10^{-7} مع وجود معاملتي مقارنة A و B ولكل عامل 3 مكررات وأختبرت الفروق بين المتوسطات وفق اختبار (Duncan,1955) وحسب النموذج الرياضي التالي :

$$Yijk = \mu + Ai + Bj + eijk$$

إذ إن

Yijk: قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملة i

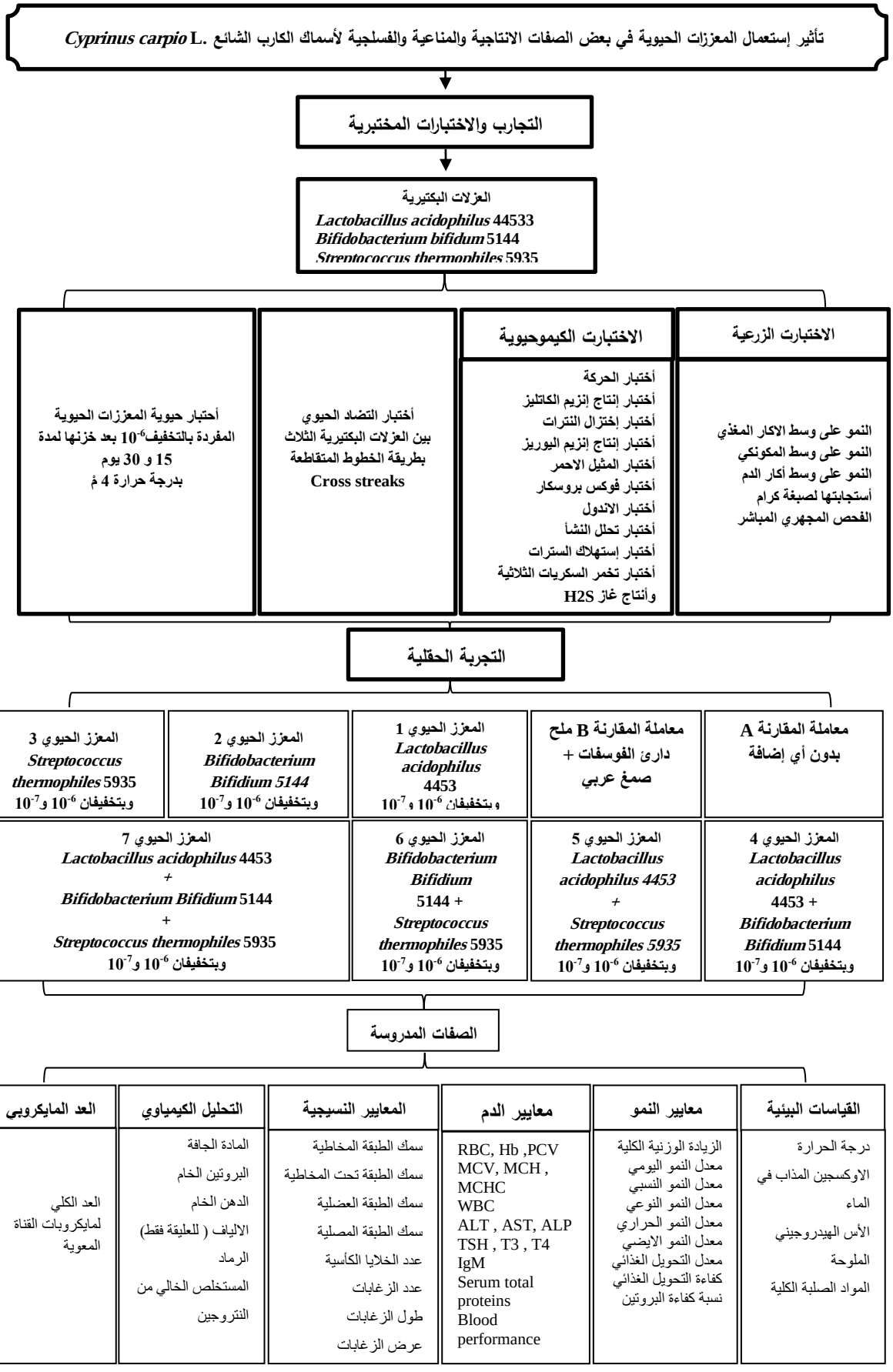
μ: المتوسط العام للصفة المدروسة

Ai: تأثير العامل الأول

Bj: تأثير العامل الثاني

eijk: الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدرة e^2.

مخطط التجربة



الفصل الرابع

4-النتائج والمناقشة

4-1- نتائج أختبارات العزلات البكتيرية

4-1-1- الصفات الزرعية والمجهرية

يلاحظ من الجدول (8) بعض الصفات الزرعية والمجهرية للعزلات البكتيرية الثلاث المزروعة على وسط الاكار المغذي ووسط اكار الماكونكي ووسط أكار الدم، إذ وجد أن أحجام مستعمرات العزلات البكتيرية الثلاثة متباينة ما بين الصغيرة والمتوسطة والكبيرة، أما ألوانها فكانت ما بين اللون الأبيض إلى الأبيض الكريمي عند زراعتها على وسط الاكار المغذي وما بين اللون الوردي الفاتح والوردي الغامق عند زراعتها على وسط أكار الماكونكي واللون الكريمي الفاتح والكريمي الغامق عند زراعتها على وسط أكار الدم، وكانت أشكالها ما بين الشكل الكروي والدائري ولها نفس القوام المخاطي ومراكز تلك المستعمرات كانت محدبة إلى محدبة ومحببة ولها حواف منتظمة وغير منتظمة ومسطحة متعرجة على الأوساط الزرعية الثلاث، وقد بينت نتائج الفحص المجهري للعزلات البكتيرية الثلاثة أن الشرائح المصبوغة بصبغة كرام أن خلاياها كانت عصوية وعصوية على شكل حرف Y وموجبة لصبغة كرام، وبناءً على تلك النتائج يوجد هنالك تطابق كبير فيما بينها على الأوساط الزرعية الثلاث وفي الفحص المجهري كذلك وهذا ما تتصف به عائلة بكتيريا حامض اللبنيك التي تتشابه في الشكل العام والفعاليات الفيسيولوجية والايضية كما أنها ترتبط ارتباطًا وثيقًا فيما بينها من حيث الأساس الوراثي (Hati وآخرون،2013).

جدول (8) الصفات الزرعية والمجهرية للعزلات البكتيرية على أوساط زرعية مختلفة

ت	العزلة البكتيرية	الوصف الزرعي والمجهري للعزلات البكتيرية		
		وسط الاكار المغذي	وسط آكار الماكونكي	وسط آكار الدم
1	*Lactobacillus acidophilus* 4453	مستعمرات كروية الشكل ذات لون ابيض كريمي ومخاطية القوام وصغيرة الحجم ومنتظمة الحواف ومركزها محدب وخلاياها عصوية الشكل وموجبة لصبغة كرام	مستعمرات كروية الشكل ذات لون وردي ومخاطية القوام وصغيرة الحجم ذات حواف دائرية منتظمة ومركزها محدب وخلاياها عصوية الشكل	مستعمرات كروية الشكل ذات لون كريمي فاتح ومخاطية القوام وصغيرة الحجم ذات حواف دائرية منتظمة ومركزها محدب وخلاياها عصوية الشكل
2	*Bifidobacterium bifidum* 5144	مستعمرات دائرية الشكل ذات لون ابيض كريمي ومخاطية القوام وكبيرة الحجم ذات مركز محدب ومحبب وحوافها مسطحة وخلاياها عصوية الشكل على شكل حرف (Y) وموجبة لصبغة كرام	مستعمرات دائرية الشكل ذات لون وردي غامق ومخاطية القوام وكبيرة الحجم ذات مركز محدب ومحبب وحوافها مسطحة وخلاياها عصوية الشكل على شكل حرف (Y)	مستعمرات دائرية الشكل ذات لون كريمي ومخاطية القوام كبيرة الحجم ذات مركز محدب ومحبب وحوافها مسطحة وخلاياها عصوية الشكل على شكل حرف (Y)
3	*Streptococcus thermophilus* 5935	مستعمرات دائرية الشكل ذات لون ابيض وذات قوام مخاطي ومتوسطة الحجم وذات حواف غير منتظمة ومركزها محدب وخلاياها عصوية طويلة بشكل المسبحة وموجبة لصبغة كرام	مستعمرات دائرية الشكل ذات لون وردي فاتح ومخاطية القوام ومتوسطة الحجم وتكون ذات حواف متعرجة ومركزها محدب وذات حواف مسطحة وخلاياها عصوية طويلة بشكل المسبحة	مستعمرات دائرية الشكل ذات لون كريمي معتم ومخاطية القوام ومتوسطة الحجم تكون ذات حواف مسطحة ومتعرجة ومركزها محدب وخلاياها عصوية طويلة بشكل المسبحة

4-1-2- الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية الثلاث

أُجريت بعض الاختبارات الكيموحيوية لغرض تشخيص العزلات البكتيرية الثلاث وبحسب الجدول (9) اظهر الفحص المجهري لها بإستعمال العدسة الزيتية بكونها موجبة لصبغة كرام، كما أن فحص الحركة بين أنها تمتلك القدرة على الحركة وأعطت جميع العزلات البكتيرية نتيجة سالبة لفحص فوكس-بروسكار كما امتلكت كل من *Lactobacillus acidophilus* 4453 و *Bifidobacterium bifidum* 5144 المقدرة على تحلل النشأ من خلال تسجيلها نتيجة موجبة لهذا الاختبار بينما أعطت بكتيريا *Streptococcus thermophilus* 5935 نتيجة سالبة لهذا الاختبار دلالة على عدم قدرتها على تحلل النشأ كما سجلت جميعها نتيجة سالبة لإختبار اختزال النترات ولأختبار الاندول على التوالي في حين أعطت نتيجة موجبة لإختبار أنتاج أنزيم الكاتليز واليوريز على التوالي، وسجلت العزلة البكتيرية *Lactobacillus acidophilus* 4453 نتيجة سالبة لأختبار المثيل الاحمر على عكس العزلات البكتيرية الأخرى اللواتي أعطت نتيجة موجبة لهذا الاختبار، كما وجد أن كل من *Lactobacillus acidophilus* 4453 و *Bifidobacterium bifidum* 5144 تمتلك القابلية على استهلاك السترات من خلال تسجيلها نتيجة موجبة لهذا الاختبار على عكس العزلة البكتيرية *Streptococcus thermophilus* 5935 التي أظهرت نتيجة سالبة لهذا الاختبار لعدم قدرتها على استهلاك السترات، كما سجلت نتيجة سالبة لأختبار تخمر السكريات الثلاثية لجميع العزلات واتصفت العزلة البكتيرية *Lactobacillus acidophilus* 4453 بعدم إنتاجها لغاز كبريتيد الهيدروجين بتسجيلها نتيجة سالبة لهذا الاختبار على عكس العزلات الأخرى اللواتي سجلن نتيجة موجبة للإختبار المذكور.

جدول (9) الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية

ت	الاختبارات	النتيجة		
		L. acidophilus **4453**	***B. bifidum*** **5144**	***S. thermophilus*** **5935**
1	استجابة الخلايا لصبغة كرام	+	+	+
2	فحص الحركة	+	+	+
3	اختبار فوكس- بروسكار	−	−	−
4	التحلل المائي للنشأ	+	+	−
5	اختبار اختزال النترات	−	−	−
6	اختبار الاندول	−	−	−
7	اختبار أنزيم الكتاليز	+	+	+
8	اختبار أنزيم اليوريز	+	+	+
9	اختبار المثيل الاحمر	−	+	+
10	اختبار استهلاك السترات	+	+	−
11	اختبار الحديد ثلاثي السكريات	−	−	−
12	اختبار تكون غاز H_2S	−	+	+

4-2- إختبار التضاد الحيوي بين العزلات البكتيرية

إن العزلات البكتيرية الثلاث لم تظهر أي تضاد أو تثبيط فيما بينها بعد مرور 48 ساعة من تحضينها في نفس الطبق على وسط الاكار المغذي الصلب بالرغم من قابلية مجموعة بكتيريا حامض اللبنيك على إنتاج البكتريوسينات والتي هي ببتيدات تثبط نمو البكتيريا الاخرى والفطريات والطفيليات والفايروسات (Hernandez-Gonzalez وآخرون،2021). أن عدم وجود تضاد أو تثبيط بين العزلات المشار إليها آنفاً هو دليل مهم يعتمد عليه في تحضير التوليفات المزدوجة والثلاثية للمعززات الحيوية في هذه الدراسة .

4-3- إختبار قدرة العزلات البكتيرية الثلاث على تكوين الأغشية الحيوية

بينت نتائج اختبار التحري عن قدرة العزلات البكتيرية الثلاث على تكوين الأغشية الحيوية بأستعمال الأنابيب (Christensen وآخرون،1982) امتلاك جميع العزلات البكتيرية القدرة على تكوين الأغشية الحيوية Biofilms على شكل طبقة سميكة في الجزء العلوي من أنابيب الاختبار على وسط

Tryptic soya broth وقد كُشف عن ذلك من خلال إضافة صبغة السفرانين بعد سكب محتويات الأنابيب إذ تفاوتت كمية المواد خارج الخلوية المنتجة من جميع العزلات بشكل حلقات حمراء اللون على جدار وقعر أنابيب الاختبار وهذه الخاصية من صفات بكتيريا *Lactobacillus spp.* (Terraf وآخرون،2012) وبكتيريا *Bifidobacterium bifidum* (Liu وآخرون،2021) وبكتيريا *streptococcal spp.* (Marks وآخرون،2014)، وهذه الخاصية يمكن أن تعزز أستيطان العزلات البكتيرية في تركيبة المعززات الحيوية في الغشاء المخاطي للقناة الهضمية للمضيف لمدة طويلة وتمنع أستيطان البكتيريا المسببة للأمراض (Terraf وآخرون،2012).

4-4-اختبار حيوية بكتيريا المعززات الحيوية المفردة بعد خزنها على درجة حرارة 4 م°

يلاحظ من الجدول (10) عدم تسجيل أية فروق معنوية بين المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المفردة عند بداية تحضيرها على درجة حرارة 30 م° إذ سجل المعزز الحيوي1 قيمة بلغت 2.31±0.015 CFU/ml وسجل المعزز الحيوي 2 قيمة بلغت 2.56±0.01 CFU/ml وسجل المعزز الحيوي3 قيمة بلغت 2.58±0.01 CFU/ml ، كما يلاحظ عدم تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين المعززات الحيوية الثلاث لمدة الخزن 15 يوم على درجة حرارة 4 م° إذ سجل المعزز الحيوي1 قيمة بلغت 1.82±0.025 CFU/ml وسجل المعزز الحيوي2 قيمة بلغت 2.07±0.01 CFU/ml وسجل المعزز الحيوي3 قيمة بلغت 2.22±0.02 CFU/ml، بينما يلاحظ تسجيل فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعززات الحيوية الثلاث لمدة الخزن 30 يوم على درجة حرارة 4 م° إذ تفوق المعزز الحيوي2 معنوياً على باقي المعززات الحيوية بتسجيله أعلى قيمة بلغت 2.03±0.17 CFU/ml وافترق عنه المعزز الحيوي1 والمعزز الحيوي3 دون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بينهما إذ سجل المعزز الحيوي1 قيمة بلغت 1.58±0.01 CFU/ml وسجل المعزز الحيوي 3 قيمة بلغت 1.97±0.005 CFU/ml. وربما يعزى سبب التفاوت في قيم حيوية المعززات الحيوية ذات العزلات المفردة لمدة خزن 30 يوم إلى تأثر حيوية بكتيريا المعزز الحيوي ببعض العوامل كالعوامل الفسيولوجية والمواد السامة والأس الهيدروجيني والأوكسجين الجوي والنشاط المائي والتغذية ودرجة الحرارة ووقت التخزين ومما تجدر الإشارة إليه أن أغلب المعززات الحيوية تكون ذات عمر قصير حتى وإن خزنت في درجات حرارة منخفضة وغالباً ما يسبب هذا الأمر مشكلة لعمل بكتيريا المعززات الحيوية لأن من الإعتبارات المهمة في استعمال بكتيريا المعززات الحيوية هي أن تؤخذ بأعداد مناسبة (Utami,2013). أو ربما يعزى التفاوت الحاصل في قيم الأس الهيدروجيني وبعض المركبات المثبطة

التي تزداد بتقدم مدة الخزن فضلاً عن السلالة البكتيرية (Sadaghdar وآخرون،2012)، أو ربما يعزى سبب الانخفاض في عدد مستعمرات المعززات الحيوية الثلاث التي هي من مجموعة بكتيريا حامض اللبنيك إلى عوامل مختلفة كالنشاط المائي والتغذية ودرجة الحرارة (Begum وآخرون،2015).

جدول (10) حيوية المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المفردة للتخفيف 10^{-6}

عدد المستعمرات (CFU/ml)	المعزز الحيوي 1	المعزز الحيوي 2	المعزز الحيوي 3
بداية تحضير المعززات الحيوية	0.015±2.31 a	0.01±2.56 a	0.01±2.58 a
مدة خزن 15 يوم بدرجة حرارة 4 م°	0.025±1.82 b	0.01±2.07 b	0.02±2.22 b
مدة خزن 30 يوم بدرجة حرارة 4 م°	0.01±1.58 c	0.17±2.03 b	0.005±1.97 c
مستوى المعنوية	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

4-5- القياسات البيئية للمياه في أحواض التربية

يوضح الجدول (11) قياسات بعض العوامل البيئية للمياة في الحوض الموجود فيه الحاويات العائمة التجريبية للمدة من 2021/3/3 إلى 2021/6/3 إذ كانت درجة حرارة الماء بين 16.5-30 م°، بينما تراوحت قيم الأوكسجين المذاب في الماء ما بين 7.2-7.8 ملغم/ لتر، كما سجل الأس الهيدروجيني قيماً ضمن المدى 7-8.1 وتراوحت قيم الملوحة ما بين 4.981-6.730 غم/لتر، وتراوحت قيم المواد الذائبة الكلية ما بين 3015-4105 ملغم/ لتر وتعد قيم العوامل البيئية المسجلة خلال مدة الدراسة ملائمة لنمو أسماك الكارب الشائع فبحسب Froese and Pauly (2011) إن أسماك الكارب الشائع تستطيع أن تتحمل مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح ما بين 3-35 م°، ووفقاً للسلمان (2000) فإن الحد الأدنى من الأوكسجين المذاب في المياه للشبوطيات لا يقل عن 3 ملغم/لتر، كما ذكرت FAO (2009) أن سمكة الكارب الشائع تتصف بقدرتها على العيش ضمن مدى من الأس الهيدروجيني يتراوح ما بين 6.5-9، وأشار الجبوري (2017) إلى نجاح تربية أسماك الكارب الشائع في مياه الابار ضمن المدى 5.59-7.46، ولابد من الإشارة إلى أن التركيز الملحي المسجل خلال شهر حزيران التي بلغت 6.730 غم/لتر كانت من جراء قلة الاطلاقات المائية من قبل كوادر مديرية الموارد المائية في نهر العطشان المزود للأحواض الترابية داخل محطة الأبحاث الزراعية وانخفاض منسوب المياه في عمود النهر بسبب إجراءات لجنة الأمر الديواني 73 المتعلقة بمعالجة الملوحة في نهر الفرات في محافظتي المثنى وذي قار الأمر الذي أدى إلى ارتفاع محتواه الملحي خلال هذا الشهر، أما بالنسبة لقيم المواد الذائبة الكلية المسجلة خلال مدة التجربة فتعتبر ضمن الحدود الطبيعية لتربية الأسماك إذ أن

أسماك الكارب الشائع تستطيع مقاومة تراكيز عالية منها تصل إلى 20000 ملغم/لتر (السلمان،2000).

جدول (11) بعض القياسات البيئية للمياه في حوض التربية

المدة	القياسات البيئية				
	درجة الحرارة (م°)	الأوكسجين المذاب في الماء (ملغم/لتر)	الأس الهيدروجيني	الملوحة (غم / لتر)	المواد الذائبة الكلية (ملغم/لتر)
2022/3/16 -/3/3	16.5	7.8	8.1	4.981	3015
2022/3/30 – 3/17	18.00	7.5	7.8	5.380	3022
2022/4/12 - 3/30	22.7	7.5	7.5	5.370	3334
2022/4/25 – /4/12	24.3	7.4	7.3	5.501	3411
2022/5/8 – 4/25	25.00	7.5	7.2	5.622	3590
2022/5/21 – 5/8	28.2	7.3	7.00	5.850	3701
2022/6/3 – 5/21	30.00	7.2	7.00	6.730	4105

4-6- معايير النمو المدروسة

4-6-1- الزيادة الوزنية Weight gain

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (12) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) لمعيار الزيادة الوزنية لصالح معاملة المعزز الحيوي السابعة إذ تصدرت جميع معاملات المعزز الحيوي وسجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} أعلى متوسطين بلغا 196.34±2.63 و189.82±0.31 غم، كما جاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ سجلت متوسطين بلغا 190.59±0.50 و188.40±0.38 غم، وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت متوسطين بلغا 188.86±0.64 و179.31±2.6 غم والثانية التي سجلت متوسطين بلغا 181.59±0.71 و179.81±1.78 غم والثالثة بتسجيلها متوسطين بلغا 198.73±2.42 و168.84±1.99غم والرابعة بتسجيلها متوسطين بلغا 186.09±0.53 و177.48±1.31 غم والخامسة التي سجلت متوسطين بلغا 181.62±1.30 و180.21±2.06 غم على التوالي ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} في حين لم تسجل أية فروق معنوية بين تلك المعاملات،أما معاملتي المقارنة A وB فسجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار بلغا 137.15±0.42 غم و 136.85±0.77 غم على التوالي دون تسجيل أي

فارق معنوي بينهما لمعيار الزيادة الوزنية، ويبين الشكلين (3) و (4) الزيادة الوزنية التراكمية لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

4-6-2- معدل النمو اليومي Daily growth rate

أظهر معدل النمو اليومي في الجدول (12) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات التجربة فكانت أعلى قيمة مسجلة تعود إلى معاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} أعلى متوسطين بلغا 2.33±0.03 و2.25±0.003 غم/يوم وتلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ افترقت عنها وسجلت متوسطين بلغا 2.26±0.006 و2.24±0.004 غم/يوم، جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى بتسجيلها متوسطين بلغا 2.24±0.007 و2.13±0.03 غم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 2.16±0.008 و2.14±0.02 غم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة سجلت متوسطين بلغا 2.36±0.02 و2.01±0.02 غم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها متوسطين بلغا 2.21±0.006 و2.11±0.01غم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت متوسطين بلغا 2.16±0.01 و2.14±0.02 غم/يوم ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} ولم تسجل اية فروق معنوية بين تلك المعاملات، أما معاملتي المقارنة A وB فسجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار بلغا 1.63±0.005 غم/يوم و1.62±0.009 غم/يوم ولم تسجل أية فروق معنوية بينهما لمعيار معدل النمو اليومي، ويبين الشكلين (5) و(6) معدل النمو اليومي التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

4-6-3- معدل النمو النسبي Relative growth rate

يتبيّن من الجدول (12) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية إذ جاءت بالمرتبة الأولى معاملة المعزز الحيوي السابعة بتسجيلها أعلى متوسطين بلغا 448.98±8.29 و426.92±2.60% ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت متوسطين بلغا 432.31±3.12 و426.02±3.69% ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما، تلتها في ذلك معاملة المعزز الحيوي الأولى بتسجيلها متوسطين بلغا 427.25±4.11 و408.40±5.82% ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 416.17±2.99 و411.02±6.35% ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت متوسطين بلغا 446.88±6.25 و379.35±7.52%، ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت متوسطين بلغا 422.57±1.23 و403.73±2.31% ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت متوسطين بلغا 412.22±5.94

و412.92±2.84%ولم تسجل أية فروق معنوية بين تلك المعاملات، أما معاملتي المقارنة A وB فسجلتا أدنى متوسطين بلغا 314.25±1.38% و309.26±4.80% على التوالي دون تسجل أية فروق معنوية بينهما لهذا المعيار، ويبين الشكلين (7) و (8) معدل النمو النسبي التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين10^{-6} و10^{-7}.

4-6-4- معدل النمو النوعي Specific growth rate

يتضح من الجدول (12) تفوق معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة معنوياً ($p\leq0.05$) على باقي المعاملات التجريبية إذ سجلتا أعلى متوسطين لهذا المعيار إذ بلغا لمعاملة المعزز الحيوي السابعة 2.02±0.01 و1.97±0.005%/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي السادسة 1.99±0.007 و1.97±0.008%/يوم للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما لهذا المعيار، كما افترقت عنهما معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت متوسطين بلغا 1.97±0.009 و1.93±0.01 %/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 1.95±0.006 و1.94±0.01%/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت متوسطين بلغا 2.02±0.01 و1.86±0.01 %/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت متوسطين بلغا 1.96±0.002 و1.92±0.005 %/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت متوسطين بلغا 1.94±0.01 و1.94±0.006 %/يوم على التوالي ولكلا التخفيفين المذكورين دون تسجيل اية فروق معنوية بينها، أما معاملتي المقارنة A وB فسجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار إذ بلغ لمعاملة المقارنة A 1.69±0.003 %/يوم ولمعاملة المقارنة B 1.67±0.01 %/يوم ولم تسجل أية فروق معنوية بينهما، ويبين الشكلين (9) و(10) معدل النمو النوعي التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

يتبين من استعراض النتائج المذكورة سابقاً تفوق معاملة المعزز الحيوي السابعة لمعيار الزيادة الوزنية ومعامل النمو اليومي تلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة ومن بعدها معاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية والثالثة والرابعة والخامسة ولكلا التخفيفين (10^{-6}) و(10^{-7}) ولم تسجل أية فروق معنوية بين المعاملات الأخيرة وبدورها تفوقت تلك المعاملات على معاملتي المقارنة A وB ، أما بالنسبة لمعامل النمو النسبي والنوعي فقد تفوقت معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة وتلتها معاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية والثالثة والرابعة والخامسة ولكلا التخفيفان (10^{-6}) و(10^{-7}) ولم تسجل أية فروق معنوية بين المعاملات الأخيرة وبدورها تفوقت تلك المعاملات على معاملتي المقارنة A وB

وربما يعزى سبب تفوق معاملات المعزز الحيوي بشكل عام إلى الدور الذي تؤديه بكتيريا حامض اللبنيك في الاستزراع السمكي في تعزيز نمو الأسماك وتنظيم التوازن المايكروبي داخل القناة الهضمية وتثبيط المايكروبات الممرضة (Zuo وآخرون،2018 ; Hoseinifar وآخرون،2019)، وربما يعزى تفوق معاملة المعزز الحيوي السابعة للمعايير المذكورة على معاملات المعزز الحيوي ومعاملتي المقارنة A وB ولكلا التخفيفان (10^{-6}) و(10^{-7}) إلى أن استعمال معززات حيوية ذات سلالات مختلفة من أنواع مختلفة يؤدي إلى تحقيق تنوع أكبر يمكن أن ينعكس عنه فعالية أوسع بفعل التأثير التآزري أو الإضافي لسلالات تلك الأنواع أو ربما لطبيعة العلاقة المتبادلة بين الأنواع البكتيرية المذكورة نتج عنها خلق حالة من التعايش بينها والتي تحدد وظيفة المعزز الحيوي للمعاملة السابعة والذي بدوره ينعكس على أداء الأسماك (Timmerman وآخرون،2004)، وهذا ما أشار أليه Asadian وآخرون (2015) عند أستعماله في دراسته المعزز الحيوي التجاري PTX المكون من سلالات عدة من أجناس من بينها *Lactobacillus* و*Bifidobacterium* و*Streptococcus* وغيرها من الأحياء المجهرية الأخرى على أسماك الكارب الشائع والذي حقق أداء نمو أفضل مع تحقيق أعلى زيادة في متوسط وزن الجسم مقارنة بمعاملة المقارنة. كما يعلل سبب تفوق معاملة المعزز الحيوي السادسة لمعدل النمو النسبي والنوعي والتي لم تفترق معنوياً عن معاملة المعزز الحيوي السابعة لهذين المعيارين إضافة إلى تفوقها معنوياً لمعياري الزيادة الوزنية ومعدل النمو اليومي إلى التوليفة الثنائية للعزلتين البكتريتين *Streptococcus thermophilus* 5935 و*Bifidobacterium bifidum* 5144 والتي خلقت حالة من التعايش بينهما التي حققت تأثيراً تأزرياً نتج عنه أداء أفضل للأسماك للمعايير المذكورة، وبحسب Nopchinda وآخرون (2002) يمكن تحقيق أفضل أداء لبكتيريا *Streptococcus thermophilus* 5935 مع احد الأنواع البكتيرية الأخرى *Bifidobacterium bifidum* أو *Lactobacillus plantarum* أو *Lactobacillus paracasei* في توليفة المعززات الحيوية وهذا الكلام ينطبق على معاملات المعزز الحيوي الرابعة والخامسة بالرغم من كونها جاءت من بعد معاملات المعزز الحيوي السابعة والسادسة إلا أنها تفوقن على معاملتي المقارنة A وB للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} ويعزز ذلك ما أشارت أليه الدراسات أن الجمع بين سلالتين أو ثلاثة سلالات من بكتيريا المعزز الحيوي نتج عنه زيادة كبيرة في بعض معايير النمو كالزيادة الوزنية ومعدل النمو النوعي في أسماك الدنيس (Avella وآخرون،2010) وأسماك البلطي النيلي(Iwashita وآخرون،2015) وأسماك كارب الروهو (Saravanan وآخرون،2021).

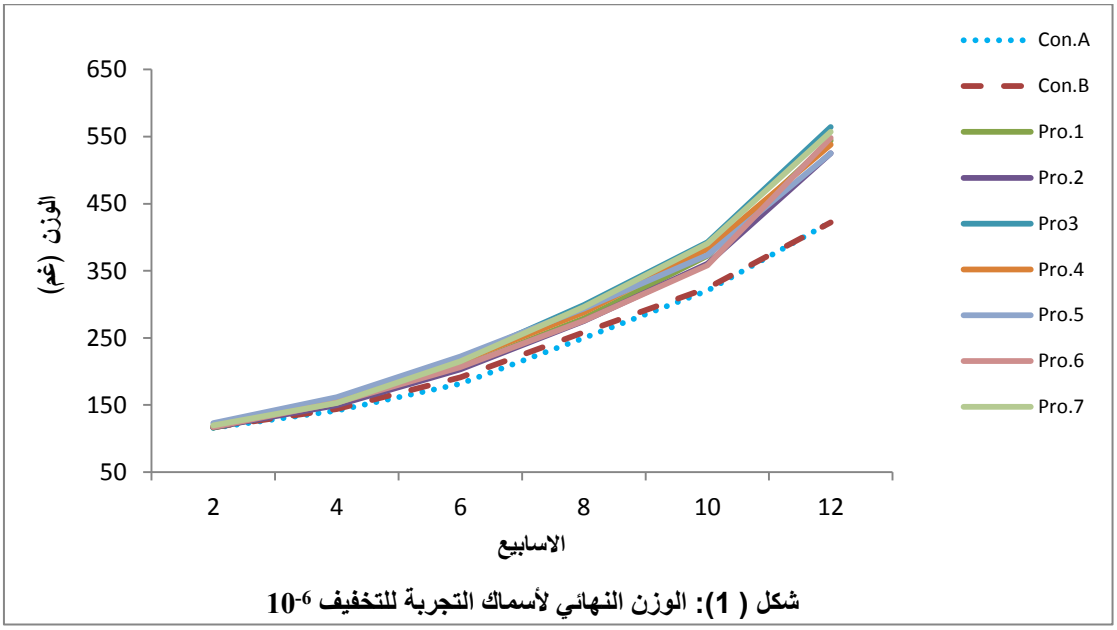
أما بخصوص معاملات المعزز الحيوي ذات الأنواع البكتيرية المفردة الأولى والثانية والثالثة فأنها لم تفترق فيما بينها معنوياً ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} إلا أنهن تفوقن معنوياً على معاملتي المقارنة A وB وربما يعزى السبب إلى قابلية بكتيريا حامض اللبنيك ومن ضمنها *Lactobacillus acidophilus* 4453 و*Bifidobacterium bifidum* 5144 و*Streptococcus thermophilus* 5935 على إنتاج مجموعة من الفيتامينات الضرورية للعديد من العمليات الحيوية التي تحدث في جميع الكائنات الحية والتي تتضمن مجموعتين الأولى مجموعة الفيتامينات الذائبة في الدهون وتشمل فيتامين A وD وE وK، والثانية مجموعة الفيتامينات الذائبة في الماء وتشمل فيتامين C ومجموعة فيتامينات B مثل الثايمين والرايبوفلافين والنياسين وحامض البانتوثنيك والبايرودوكسين والبايوتين وحامض الفوليك والكوبالامين (Leblanc وآخرون،2013) والتي أدت إلى تحسين أداء الأسماك خلال مدة التجربة ويعزز ذلك ما وجده Hoseinifar وآخرون (2014) بأن إضافة بكتيريا المعزز الحيوي *Lactobacillus acidophilus* بمستويات مختلفة أدت إلى تحقيق أعلى قيم للزيادة الوزنية ومعدل النمو النوعي ومعامل التحويل الغذائي مقارنة مع معاملة المقارنة لأسماك الذيل السيفي، وكذلك ما أشار أليه Sahandi وآخرون (2018) بأن أغذية صغار أسماك التراوت القزحي التي تحتوي على أقل تركيز من السلالتين *Bifidobacterium animalis* PTCC-1631 المعزولة من فضلات الأسماك و*Bifidobacterium lactis* PTCC-1736 المعزولة من الزبادي بتخفيف ($1*10^{-7}$ CFU g^{-1}) حققت أعلى معدل للنمو والاستفادة من الغذاء ، فضلاً عن ما ذكره Ayyat وآخرون (2014) تحقيق أعلى معدلات النمو لأصبعيات أسماك البلطي النيلي المغذاة على علائق تحتوي على *Streptococcus thermophilus* و*Bifidobacterium bifidum* وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* بشكل معززات حيوية مفردة مقارنة مع معاملة المقارنة فضلاً عن تحقيق مزيجهم أعلى معدلات النمو واستهلاك الغذاء وتحويله.

جدول (12) بعض معايير النمو المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

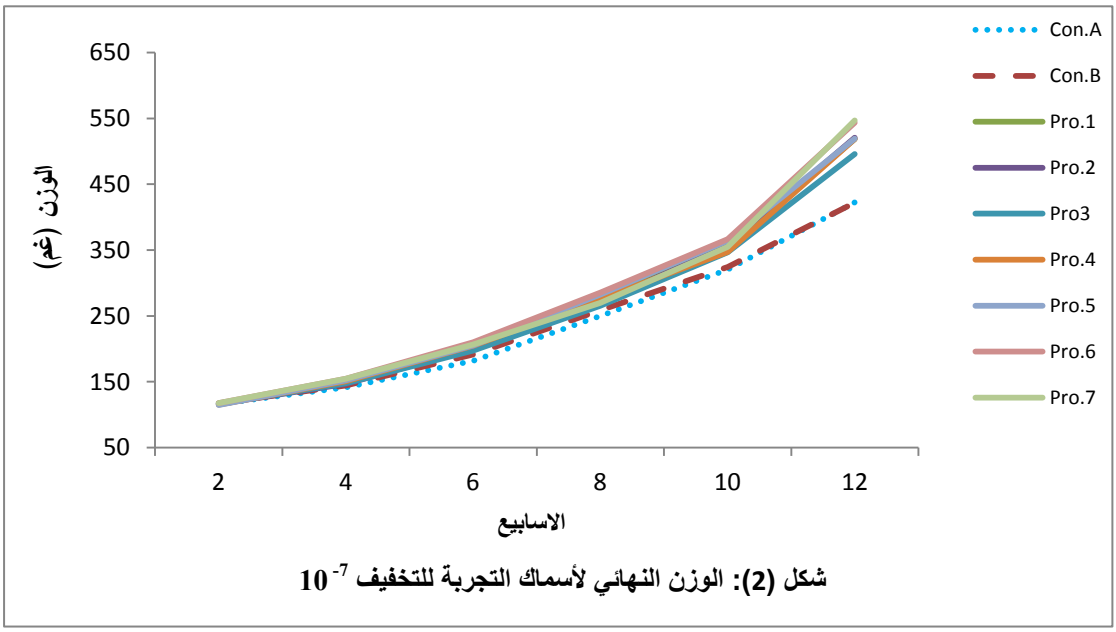
المعاملات		الوزن الابتدائي (غم)	الوزن النهائي (غم)	الزيادة الوزنية (غم)	معدل النمو اليومي (غم / يوم)	معدل النمو النسبي (%)	معدل النمو النوعي (%/ يوم)
معاملة السيطرة A		0.24±43.64	0.06±180.80 e	0.42±137.15 d	0.005±1.63 d	1.38±314.25 c	0.003±1.69 c
معاملة السيطرة B		0.43±44.26	0.34±181.12 e	0.77±136.85 d	0.009±1.62 d	4.80±309.26 c	0.01±1.67 c
المعزز الحيوي1	10^{-6}	0.28±44.21	0.39±233.07* 2.70±223.22 c	0.64±188.86* 2.6±179.31 c	0.007±2.24* 0.03±2.13 c	4.11±427.25* 5.82±408.40 b	0.009±1.97* 0.01±1.93 b
	10^{-7}	0.14±43.90					
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.15±43.63	0.57±225.23 1.53±223.56 d	0.71±181.59 1.78±179.81 c	0.008±2.16 0.02±2.14 c	2.99±416.17 6.35±411.02 b	0.006±1.95 0.01±1.94 b
	10^{-7}	0.24±43.75					
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.12±44.47	2.35±243.20* 1.67±213.36 c	2.42±198.73* 1.99±168.84 c	0.02±2.36* 0.02±2.01 c	6.25±446.88* 7.52±379.35 b	0.01±2.02* 0.01±1.86 b
	10^{-7}	0.37±44.52					
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.24±44.04	0.76±230.13* 1.3±221.44 cd	0.53±186.09* 1.31±177.48 c	0.006±2.21* 0.01±2.11 c	1.23±422.57* 2.31±403.73 b	0.002±1.96* 0.005±1.92 b
	10^{-7}	0.07±43.95					
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.33±44.06	1.00±225.69 2.27±223.85 cd	1.30±181.62 2.06±180.21 c	0.01±2.16 0.02±2.14 c	5.94±412.22 2.84±412.92 b	0.01±1.94 0.006±1.94 b
	10^{-7}	0.22±43.64					
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.35±44.23	0.46±234.68* 0.46±232.63 b	0.50±190.59* 0.38±188.40 b	0.006±2.26* 0.004±2.24 b	3.12±432.31 3.69±426.02 a	0.007±1.99 0.008±1.97 a
	10^{-7}	0.25±44.09					
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.22±43.73	2.41±240.08* 0.45±234.29 a	2.63±196.34* 0.31±189.82 a	0.03±2.33* 0.003±2.25 a	8.29±448.98* 2.60±426.92 a	0.01±2.02* 0.005±1.97 a
	10^{-7}	0.27±44.46					
مستوى المعنوية		N.S	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

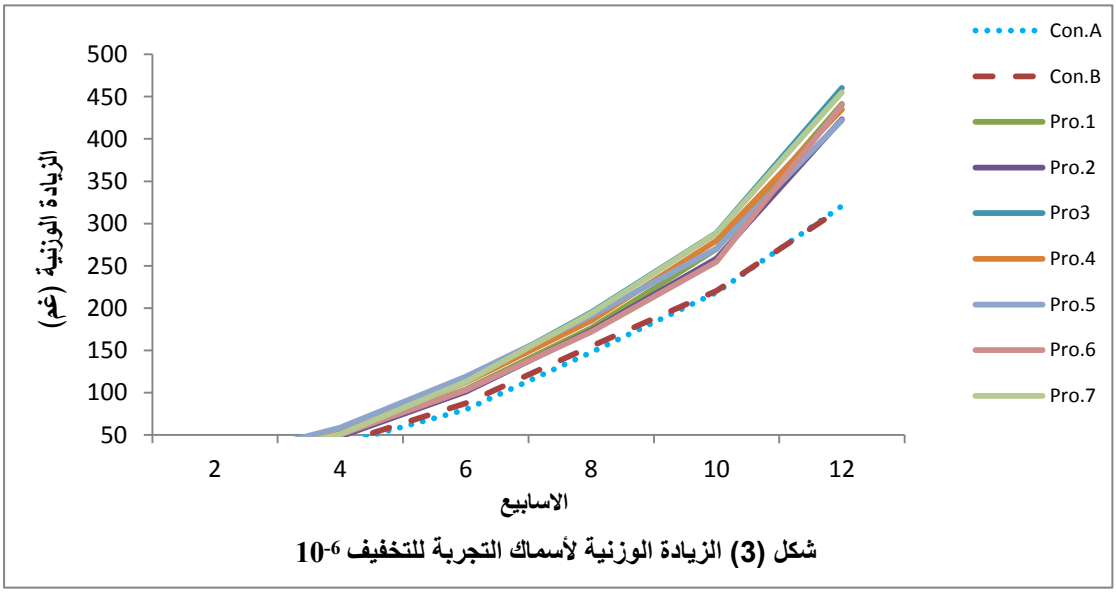
* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)



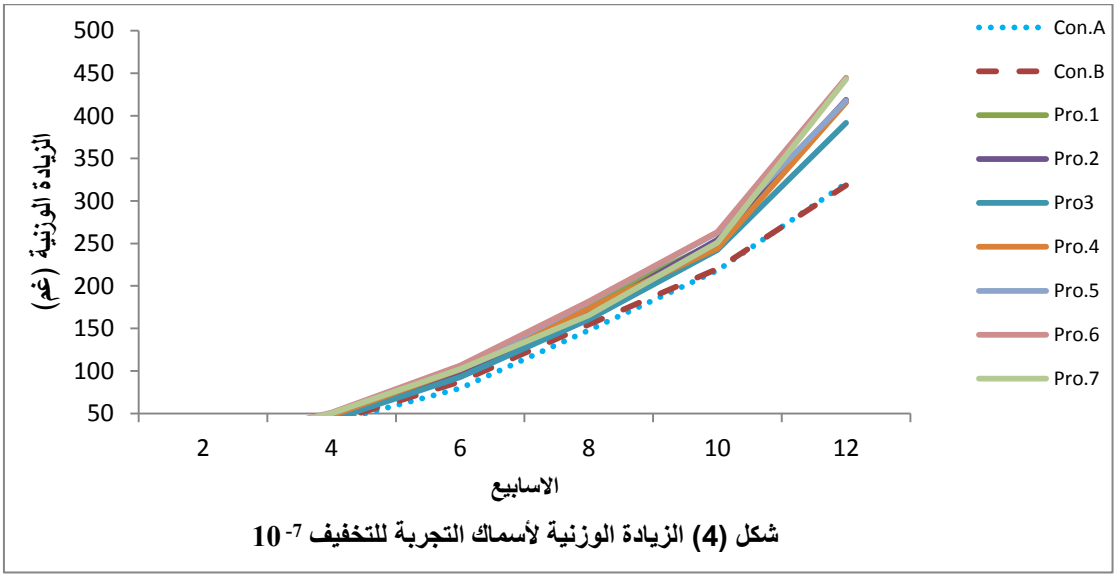
شكل (1): الوزن النهائي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-6}



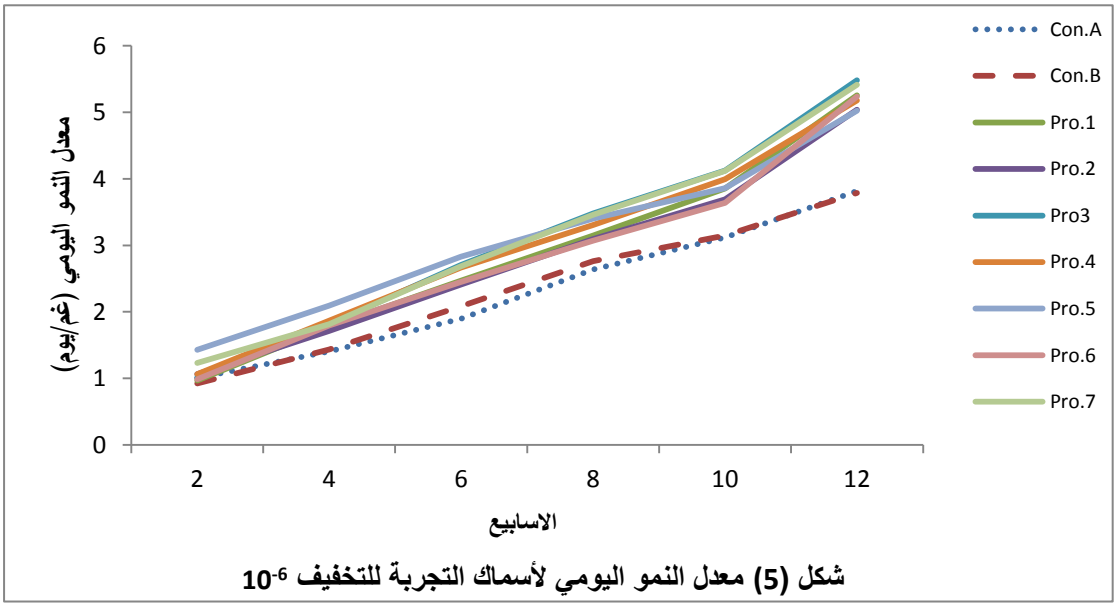
شكل (2): الوزن النهائي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-7}



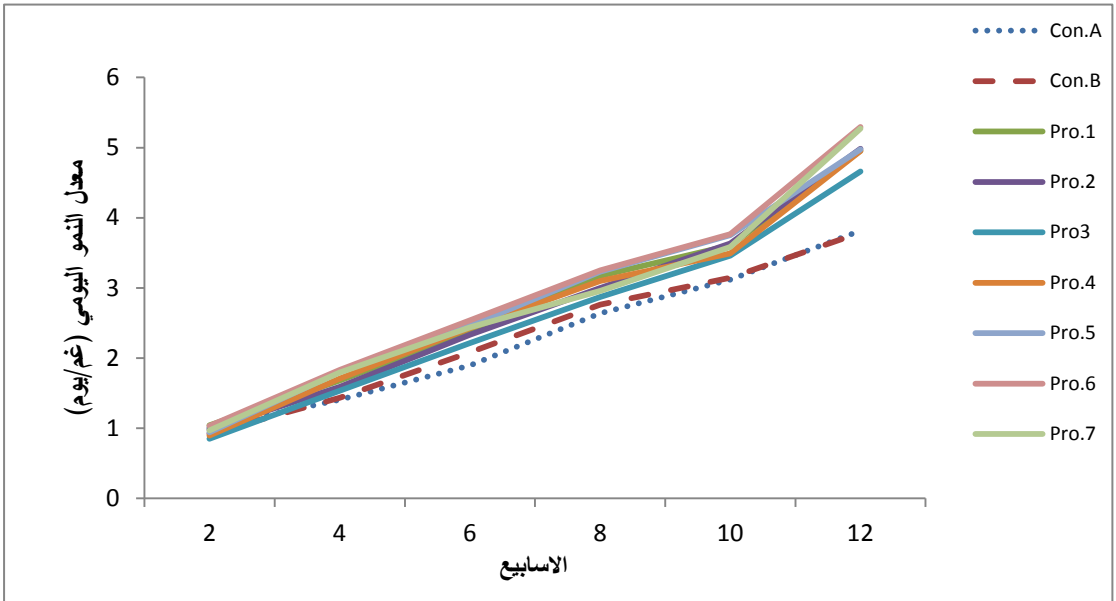
شكل (3) الزيادة الوزنية لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-6}



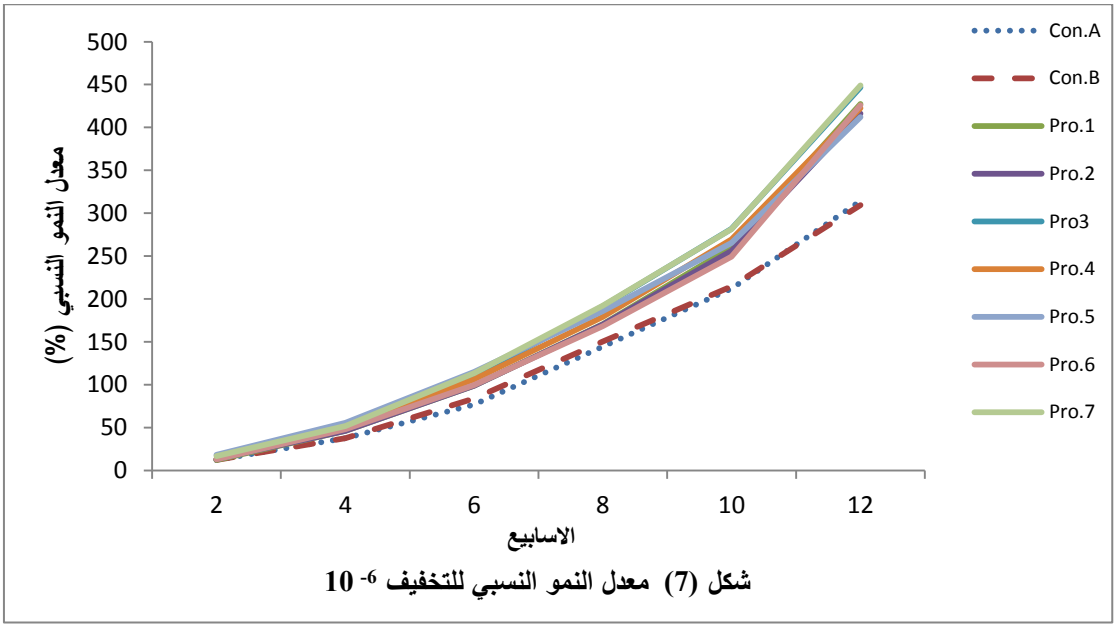
شكل (4) الزيادة الوزنية لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-7}



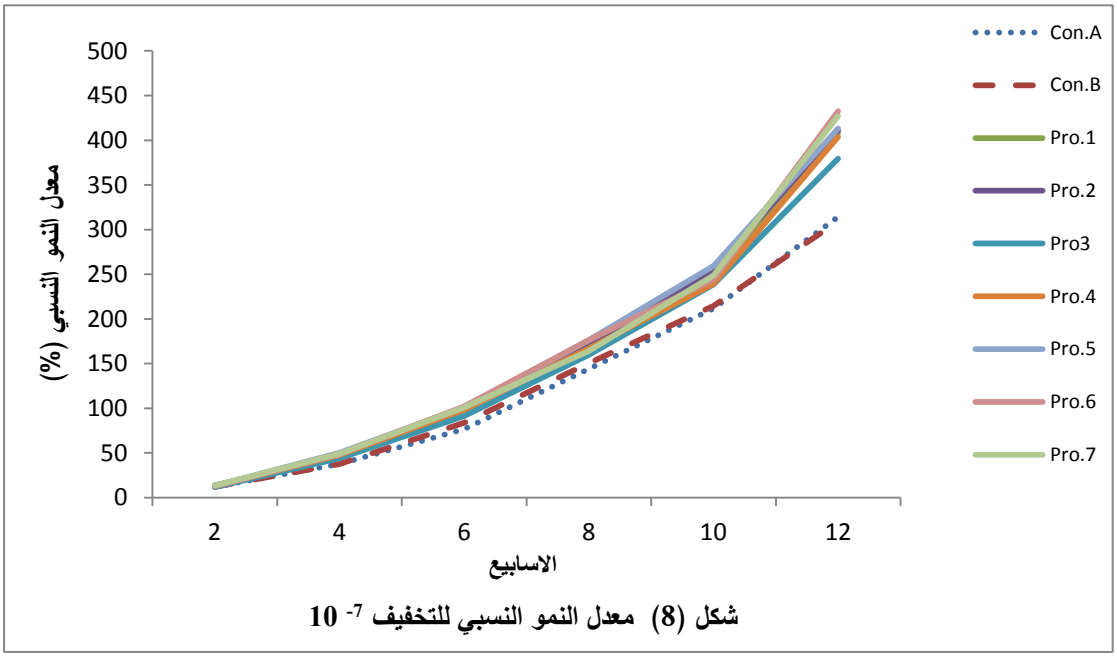
شكل (5) معدل النمو اليومي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-6}



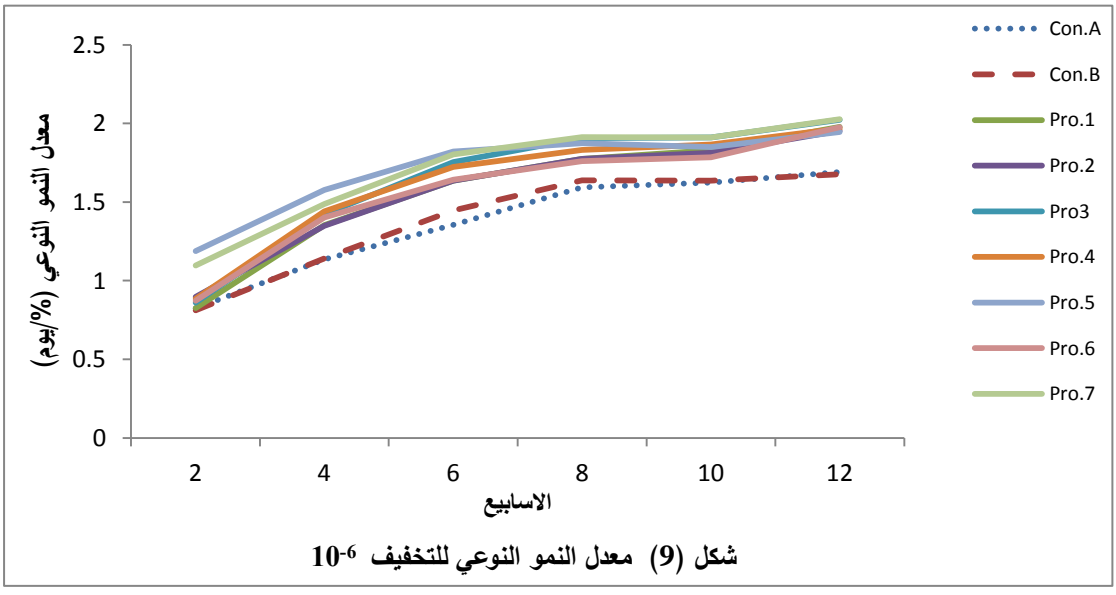
شكل (6) معدل النمو اليومي لأسماك التجربة للتخفيف 10^{-7}



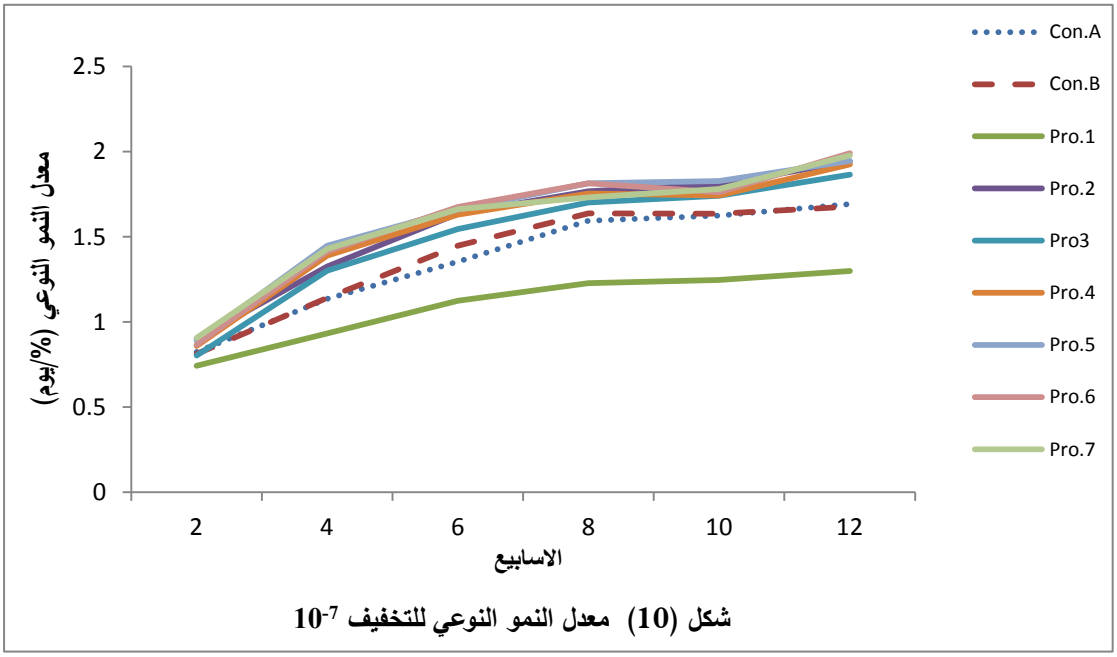
شكل (7) معدل النمو النسبي للتخفيف 10^{-6}



شكل (8) معدل النمو النسبي للتخفيف 10^{-7}



شكل (9) معدل النمو النوعي للتخفيف 10^{-6}



شكل (10) معدل النمو النوعي للتخفيف 10^{-7}

4-6-5- معامل النمو الحراري Thermal growth cofficient

يتبين من الجدول (13) تفوق معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة معنوياً ($p\leq0.05$) على باقي المعاملات التجريبية بتسجيل أعلى متوسطات لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المعزز الحيوي السابعة متوسطين بلغا 0.13±0.001 و 0.13±0.00 % ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت متوسطين بلغا 0.12±0.00 و0.13±0.00 % للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما، كما افترقت عنها معاملات المعزز الحيوي الأخرى وتلتها إذ سجلت معاملة المعزز الحيوي الأولى متوسطين بلغا 0.12± 0.00 و0.12±0.001 % ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 0.12±0.00 و0.12±0.001 % ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت متوسطين بلغا 0.13±0.001 و0.12±0.001 % ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت متوسطين بلغا 0.12±0.00 و0.12±0.00 % ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة سجلت متوسطين بلغا 0.12±0.00 و0.12±0.00 % ولكلا التخفيفين المذكورين دون تسجل أية فروق معنوية بينها، أما معاملتي المقارنة A و B فقد سجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المقارنة A متوسط بلغ 0.10±0.00 % ومعاملة المقارنة B التي سجلت متوسط بلغ 0.10±0.0001 % دون تسجل أية فروق معنوية بينهما لهذا المعيار، ويبين الشكلين (11) و(12) معامل النمو الحراري التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

4-6-6- معدل النمو الايضي Metabolic growth rate

تشير نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (13) إلى وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لمعدل النمو الايضي إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً ($p\leq0.05$) على المعاملات التجريبية الأخرى إذ سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} أعلى متوسطين بلغا 11.65±0.09 و11.41±0.02 غم/كغم/يوم، تلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ سجلت متوسطين بلغا 11.44±0.04 و11.40±0.01 غم/كغم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت متوسطين بلغا 11.19±0.06 و11.18±0.04 غم/كغم/ يوم ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت متوسطين بلغا 11.33±0.006 و11.07±0.03 غم/كغم/ يوم ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت متوسطين بلغا 11.66±0.07 و10.76±0.09 غم/كغم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 11.22±0.03 و11.16±0.07 غم/كغم/يوم ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت متوسطين بلغا 11.40±0.03 و11.13±0.07 غم/ كغم/ يوم على التوالي ولكلا للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} ولم تسجل أية فروق معنوية بين تلك المعاملات، أما معاملتي المقارنة A وB فقد سجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المقارنة A متوسط بلغ 9.71±0.01 غم/كغم/يوم ومعاملة المقارنة B التي سجلت متوسط بلغ 9.65±0.06 غم/كغم/ يوم دون تسجل أية فروق معنوية بينهما لهذا المعيار، ويبين الشكلين (13) و(14) معدل النمو الايضي التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

4-6-7- معدل التحويل الغذائي Feed conversation rate

يتبيّن من الجدول (13) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية إذ تفوقت معاملتي المقارنة A وB على المعاملات الأخرى لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المقارنة A أعلى متوسط بلغ 2.16±0.02 وسجلت معاملة المقارنة B متوسط بلغ 2.23±0.05 دون تسجل أية فروق معنوية بينهما، جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} متوسطين بلغا 1.90±0.02 و1.83±0.03 تلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت متوسطين بلغا 1.76±0.04 و1.90±0.02، كما افترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت متوسطين بلغا 1.75±0.01 و1.82±0.04 ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 1.80±0.03 و1.81±0.03 ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت متوسطين بلغا 1.82±0.02 و1.82±0.01 على التوالي دون تسجل أية فروق معنوية بينها، تلتهما بذلك معاملة المعزز الحيوي

السابعة إذ سجلت متوسطين بلغا 1.77±0.03 و1.74±0.04 كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي السادسة بتسجيلها أقل متوسطين بلغا 1.74±0.04 و1.73±0.04، ويبين الشكلين (15) و(16) معدل التحويل الغذائي التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

4-6-8- كفاءة التحويل الغذائي Feed conversation efficiency

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (13) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لمعيار كفاءة التحويل الغذائي إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السادسة معنوياً ($p\leq0.05$) على باقي المعاملات التجريبية إذ سجلت أعلى متوسطين لهذا المعيار للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} بلغا 57.30±1.56 و57.81±1.58 تلتها في ذلك المعاملة السابعة إذ سجلت متوسطين بلغا 56.38±1.18 و57.55±1.54، كما افترقت عنها معاملات المعزز الحيوي الأخرى وجاءت من بعدها إذ سجلت معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت متوسطين بلغا 56.86±0.44 و54.83±1.42 ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 55.60±1.17 و55.05±1.04 ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها متوسطين بلغا 54.77±0.69 و54.91±0.33 على التوالي ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} دون تسجيل أي فارق معنوي بينها، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت لكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} متوسطين بلغا 56.61±1.43 و52.54±0.56 وجاءت بعدها المعاملة الخامسة التي سجلت للتخفيفين المذكورين متوسطين بلغا 52.50±0.57 و54.42±0.97، إما معاملتي المقارنة A وB فقد سجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المقارنة A متوسط بلغ 46.29±0.59 ومعاملة المقارنة B سجلت متوسط بلغ 44.83±1.07 دون تسجل أية فروق معنوية بينهما لهذا المعيار، ويبين الشكلين 17 و18 كفاءة التحويل الغذائي التراكمي لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و 10^{-7}.

4-6-9- نسبة كفاءة البروتين Protein efficiency ratio

يتبين من الجدول (13) تفوق معاملة المعزز الحيوي السادسة معنوياً ($p\leq0.05$) على المعاملات التجريبية لنسبة كفاءة البروتين إذ سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} أعلى متوسطين بلغا 1.96±0.05 و1.98±0.05 تلتها معاملة المعزز الحيوي السابعة إذ سجلت متوسطين بلغا 1.93±0.04 و1.97±0.05 كما افترقت عنها معاملات المعزز الحيوي الأخرى إذ جاءت من بعدها فسجلت معاملة المعزز الحيوي الأولى متوسطين بلغا 1.95±0.01 و1.88±0.04 ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت متوسطين بلغا 1.90±0.04 و1.88±0.03 ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة

التي سجلت متوسطين بلغا 1.87±0.02 و1.88±0.01 ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} دون تسجيل أية فروق معنوية بين تلك المعاملات، كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثالثة بتسجيلها متوسطين بلغا 1.94±0.04 و1.80±0.01 ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ سجلت متوسطين بلغا 1.80±0.01 و1.86±0.03 ولكلا التخفيفين المذكورين، إما معاملتي المقارنة A وB فقد سجلتا أدنى متوسطين لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المقارنة A متوسط بلغ 1.58±0.02 ومعاملة المقارنة B التي سجلت متوسط بلغ 1.53±0.03 دون تسجل أية فروق معنوية بينهما لهذا المعيار، ويبين الشكلين (19) و(20) نسبة كفاءة البروتين التراكمية لمعاملات المعزز الحيوي للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}.

يلاحظ من استعراض النتائج في الجدول (13) لمعامل النمو الحراري تفوق معاملة المعزز الحيوي السابعة والسادسة لهذا المعيار جاء من بعدها معاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية والثالثة والرابعة والخامسة ولكلا التخفيفين (10^{-6}) و(10^{-7}) دون تسجل أية فروق معنوية بين المعاملات الأخيرة وبدورها تفوقت تلك المعاملات على معاملتي المقارنة A وB، أقترح معامل النمو الحراري من قبل Cho (1992) للتنبؤ بنمو نوع معين من الأسماك بالعلاقة مع غذاءها وطريقة تربيتها وحجمها ودرجة الحرارة كما استعمل هذا النموذج البسيط في دراسات عديدة لتحديد تأثير العوامل الغذائية والبيئية المختلفة على أداء عمليات الاستزراع والسلالات وسنوات الإنتاج (Bureau وآخرون،2006). أما بخصوص تفوق معاملات المعزز الحيوي معنوياً على معاملتي المقارنة A وB وبالأخص معاملتي المعزز الحيوي السادسة والسابعة لمعيار معامل النمو الحراري فربما يعزى سبب ذلك إلى التأثير التآزري ما بين درجات الحرارة المسجلة في الجدول (11) والتي كانت في تزايد منذ بداية التجربة وإلى نهاية التجربة التي زادت من مستوى التغذية من 3% الى 5% وفعالية التوليفة البكتيرية ضمن معاملات المعزز الحيوي والتي كانت مؤثرة في معاملات المعزز الحيوي وأكثر تأثيراً في المعاملتين السادسة والسابعة إذ تعد درجة الحرارة من أكثر العوامل الفيزيائية تأثيراً على الفعاليات الفسيولوجية للأسماك من خلال تأثيرها على الايض الغذائي وتوازن الطاقة داخل جسم الاسماك إذ تنظم سلوك التغذية والغذاء المتناول إذ تزداد كمية الغذاء المتناول بزيادة درجة الحرارة الى حد ما (Volkoff and Ronnested,2020) بالتزامن مع تأثير معاملات المعززات الحيوية التي تزيد من هضم العناصر الغذائية وإنتاج الطاقة في الجهاز الهضمي للأسماك (Ringo وآخرون،2018) من جراء إفراز مجموعة من الأنزيمات الهاضمة مثل Protease وAmylase وCellulase وPhytase وغيرها من

الأنزيمات (Ghosh وآخرون،2017).فضلاً عن تحفيز امتصاص العناصر الغذائية من خلال زيادة مساحة سطح الامتصاص داخل القناة الهضمية وفقاً لعدد من الاختلافات في القياسات النسيجية لمنطقة الطيات المعوية وخلايا نسيج الكرومافين الداخلية والزغابات الدقيقة (Zhou وآخرون،2010) وهذا ما وجد في هذه الدراسة بإستعمال معامل النمو الحراري الذي يجد العلاقة ما بين درجة حرارة المياه والكتلة الحرارية للجسم الحي المتحققة خلال مدة النمو الناتجة من الفرق ما بين الوزن النهائي مرفوع للأس 0.3333 والوزن الابتدائي مرفوع للأس 0.3333 مقسوماً على مدة التجربة مضروباً في درجة الحرارة .أما بالنسبة لمعدل النمو الايضي يلاحظ من استعراض النتائج في الجدول (13) تفوق معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً ($p\leq0.05$) على المعاملات التجريبية الأخرى وتلتها معاملات المعزز الحيوي السادسة والخامسة والرابعة والثالثة والثانية والأولى ولم تسجل أية فروق معنوية بين تلك المعاملات للتخفيفين (10^{-6}) و(10^{-7}) كما تفوقت تلك المعاملات جميعاً معنوياً على معاملتي المقارنة A و B اللتان بدورهما لم تفترقا معنوياً فيما بينهما، وربما يرجح سبب تفوق المعاملة السابعة إلى وظيفة المعزز الحيوي لتلك المعاملة لا سيما تصنيع بعض المواد والتي نتجت من طبيعة التوليفة البكتيرية لهذه المعاملة (Timmerman وآخرون،2004) التي تكونت من ثلاث عزلات بكتيرية مختلفة نتج عنها تأثير أنزيمي تآزري والذي أحدث زيادة في نشاط القناة الهضمية لأسماك التجربة وبالتالي أثر في العمليات الهضمية داخل الجهاز الهضمي لتلك الأسماك إذ تقوم بكتيريا المعزز الحيوي بتصنيع بعض الإنزيمات كالأميليز والبروتييز واللايبيز والسيلوليز فضلاً عن إفراز مواد مهمة كالفيتامينات والدهون غير المشبعة والأحماض الأمينية الناتجة من الفعل التأزري لمجتمع الأحياء النافعة داخل القناة الهضمية بالإضافة إلى العزلات البكتيرية الموجودة ضمن تركيبة المعزز الحيوي داخل المضيف وبالتالي نتج عن ذلك زيادة هضم العناصر الغذائية فضلاً عن ذلك زيادة مساحة سطح الامتصاص من زغابات وخبايا داخل القناة الهضمية والذي زاد من معدل امتصاص العناصر الغذائية ويعزز ذلك ما توصل إليه Li وآخرون (2019) إذ وجدوا زيادة في فعالية أنزيمات الجهاز الهضمي لصغار أسماك التاربوت كالاميليز واللايبيز والببسين عند استعمالهم معزز حيوي ذو أنواع متعددة من البكتيريا في أغذية تلك الأسماك، أما بخصوص معاملات المعزز الحيوي السادسة فربما يرجح سبب تفوقها إلى التوافق ما بين العزلتين البكتيريتين 5144 *Bifidobacterium bifidum* و *Streptococcus thermophilus* 5935 في توليفة هذه المعاملة الحيوية والذي انعكس بشكل واضح على أداء هذه المعاملة لهذا المعيار وهذا ما أشار إليه Nopchinda وآخرون (2002) وأنه يمكن تحقيق أفضل أداء

لبكتيريا *Streptococcus thermophilus* مع أحد الأنواع البكتيرية الأخرى *Bifidobacterium bifidum* أو *Lactobacillus plantarum* أو *Lactobacillus paracasei* في توليفة المعززات. أما بخصوص تفوق باقي معاملات المعزز الحيوي من بعد معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً ($p\leq0.05$) على معاملتي المقارنة فربما يعزى السبب إلى طبيعة عمل المعززات الحيوية على تعديل مجتمع الأحياء المجهرية النافعة المستوطنة داخل القناة الهضمية للأسماك بالإشتراك مع العوامل البيئية (Kelly and Salinas,2017) وأن تعديل ذلك المجتمع بزيادة استيطان بكتيريا المعزز الحيوي النافعة يخلق نوع من العلاقة التآزرية بينهما ينعكس عنها إنتاج بعض المنتجات الايضية المايكروبية كالأحماض الدهنية قصيرة السلسلة والإندولات والبروبيونات والخلات والبيوتريت Zhang and (Davies,2016) والتي تؤثر في عملية الايض وفي تعديل النشاط الإفرازي للخلايا المعوية وبالتالي تؤثر في إنتاج الببتيدات المعوية التي تعمل على تعديل الحركة المعوية وإفرازاتها الإنزيمية (Borre وآخرون،2014 ؛ Cani and Knauf,2016)، وربما ينتج أيضاً عن تلك العلاقة تأثير في النواقل العصبية التي تتحرر من الخلايا العصبية المعوية في الجهاز الهضمي للحيوانات كالسيروتونين والدوبامين والنورابنفرين (Asano وآخرون،2012 ؛Yano وآخرون،2015) والتي بدورها تؤثر في سلوك التغذية وحركة القناة الهضمية ووظيفتها وإفراز الهرمونات في الحيوانات (Yang and Strandwitz,2018 ; Chiu,2017) وبالتالي تؤثر تلك العوامل مجتمعة في عمليات الايض داخل الجهاز الهضمي في الأسماك من خلال عملها على الخلايا المعوية وتنظيم وظيفة الحاجز المعوي وقابلية الامتصاص والفعالية الأنزيمية وامتصاص العناصر الغذائية وتخزينها وفقاً لعدد من الاختلافات في القياسات النسيجية في الجدول (19) لطبقات القناة المعوية والزغابات الدقيقة للأسماك وهذا يدل حصول زيادة في مساحة سطح الامتصاص داخل القناة الهضمية والذي ينتج عنه زيادة في امتصاص العناصر الغذائية.

تشير نتائج معدل وكفاءة التحويل الغذائي في الجدول (13) أن أفضل معدل وكفاءة تحويل غذائي كان لمعاملة المعزز الحيوي السادسة تلتها في ذلك معاملة المعزز الحيوي السابعة وجاء من بعدهما معاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية والرابعة ولم تسجل أية فروق معنوية بينها كما تلتهما معاملة المعزز الحيوي الثالثة ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الخامسة ولكلا التخفيفين (10^{-6}) و(10^{-7}) على التوالي واللاتي تفوقن على معاملتي المقارنة A وB لهذا المعيار كما لم تسجل اية فروق معنوية بين معاملتي المقارنة ومما تجدر الإشارة إليه أن معدل التحويل الغذائي يمثل العلاقة ما

بين كمية الغذاء المتناولة إلى الزيادة الوزنية للأسماك ومن خلاله يمكن تقييم كفاءة العليقة الغذائية وكلما انخفضت قيمته كانت الأسماك أكثر كفاءة في تحويل الغذاء المتناول إلى لحوم والعكس صحيح لذا فإن معاملتي المقارنة وأن تفوقتا معنوياً بزيادة قيمة ذلك المعيار فأنهما أقل من باقي معاملات المعزز الحيوي، وبشكل عام تتصف طبيعة عمل المعززات الحيوية بالغموض فيعتقد أنها ربما تزيد من شعور الأسماك بالجوع أو تحفز شهية الأسماك وتحسين هضم المركبات الغذائية غير القابلة للهضم وبالتالي تحقيق الاستفادة من العناصر الغذائية وتزيد من قابلية الامتصاص لتلك العناصر وزيادة أنتاج الفيتامينات وإزالة السموم من المواد الغذائية كما ويعتقد أن آلية عملها تجمع ما بين الأمور المذكورة (Krishna وآخرون ،2018). أما بالنسبة لمعاملة المعزز الحيوي السادسة فيعزى سبب تفوقها إلى التأثير التأزري للتوليفة البكتيرية لهذه المعاملة التي أدت دور المكملات الغذائية داخل القناة الهضمية للأسماك من خلال إفرازها عناصر مهمة كالفيتامينات والدهون غير المشبعة والأحماض الأمينية فضلاً عن تصنيعها لعدد من الأنزيمات المايكروبية كالأميليز والبروتييز واللاييبز والسيلوليز والتي كان لها تأثير مفيد على العمليات الهضمية داخل الجهاز الهضمي للأسماك (Banerjee and Ray,2017) ويعزز هذا التفسير ما أشار أليه Ghosh وآخرون(2017) عند دراستهم على الأنزيمات المايكروبية المفرزة من القناة الهضمية على التثبيط المايكروبي في أسماك البلطي النيلي، أو ربما يعلل سبب ذلك إلى أن العناصر الغذائية قد أُستغلت بشكل صحيح من الأسماك وبالتالي تحقيق الإستفادة منها (Giri وآخرون،2014) أو ربما يعزى السبب إلى أن معاملة المعزز الحيوي السادسة قد أدت إلى زيادة مساحة سطح الامتصاص داخل القناة الهضمية والتي نتج عنها امتصاص العناصر الغذائية بكفاءة عالية نتج عنها هذا الفارق المعنوي في أداء أسماك تلك المعاملة للمعيار المذكور (Zhou,2010) ويعزز هذا الرأي ما جاء به EL-Haroun وآخرون (2006) عند دراستهم تأثير المعزز الحيوي التجاري Biogen كمحفز نمو في أداء أسماك البلطي النيلي والاستفادة من الغذاء إذ وجد أن العناصر الغذائية يحدث لها امتصاص كفوء عند معاملة غذاء أسماك البلطي النيلي بالمعزز الحيوي المذكور، وينطبق هذا الكلام على باقي معاملات المعزز الحيوي وخصوصاً المعاملة السابعة إذ وجد Ayyat وآخرون (2014) إن استعمال السلالات البكتيرية الثلاثة *Lactobacillus acidophilus* و *Streptococcus thermophilus* و *Bifidobacterium bifidum* في غذاء أسماك البلطي النيلي حققت أعلى قيمة في معيار الزيادة الوزنية وتحسين استهلاك الغذاء مع تسجيل اقل قيمة لمعامل التحويل الغذائي مقارنة مع المعزز الحيوي ذو السلالة الواحدة ، كما جاءت من بعدها معاملة المعزز

الحيوي الأولى والثانية والرابعة تلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة ومن بعدها الخامسة في نفس آلية العمل للمعيار المذكور إلا أنهن افترقن فيما بينهن تبعاً لقيم المتغيرات في النموذج الرياضي من كمية الغذاء المستهلكة والزيادة الوزنية تبعاً للأداء الفيسيولوجي لأسماك تلك المعاملات، وربما يعزى سبب تفوق المعاملات ذات العزلة البكتيرية الواحدة كالأولى والثانية على بعض المعاملات ذات العزلات البكتيرية المزدوجة كالمعاملة الرابعة ومن بعدهما معاملة المعزز الحيوي الثالثة على المعاملة الرابعة إلى طبيعة ما تنتجه كل عزلة بكتيرية من منتجات أيضية ثانوية كالإنزيمات أو الحوامض العضوية أو الفيتامينات (Li وآخرون،2019) التي يكون لها دور كبير في وظيفة القناة الهضمية للأسماك كزيادة فعالية الإنزيمات الهاضمة داخل القناة الهضمية للأسماك وزيادة قابلية هضم العناصر الغذائية في الأسماك (Mukherjee وآخرون،2019)، كما أن البعض الآخر من العزلات البكتيرية ينتج تلك المواد بكميات قليلة أو ربما لا ينتجها أساساً لذا يستغل ما ينتج من مواد من العزلة البكتيرية الأخرى ويدعم هذا التفسير ما أشار إليه كل من Duponnois و Garbaye (1990) أن البكتيريا أو الفطريات يمكن أن تستفيد من المركبات الخاصة التي يتم أنتاجها من قبل الشريك الأخر والتي لا تستطيع أنتاجها بنفسها أو إذا انتجتها بكميات محدودة للنمو فقط.

أن نتائج نسبة كفاءة البروتين في الجدول (13) أظهرت تفوق معاملة المعزز الحيوي السادسة معنوياً ($p\leq0.05$) على باقي المعاملات التجريبية تلتها في ذلك المعاملة السابعة وجاء من بعدها معاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية والرابعة ولكلا التخفيفين (10^{-6}) و(10^{-7}) ولم تفترق تلك المعاملات معنوياً بينهما ومن ثم تلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة وجاءت بعدها المعاملة الخامسة ولكلا التخفيفين (10^{-6}) و(10^{-7}) إذ تفوقن جميع المعاملات المذكورة على معاملتي المقارنة A وB واللتان لم تسجلا أية فروق معنوية بينهما لهذا المعيار وبشكل عام إن استعمال المعززات الحيوية في أغذية الأسماك تحسن وبشكل كبير نسبة كفاءة البروتين والاستفادة من النايتروجين الظاهري والذي ينتج عنه تحقيق الاستفادة من البروتين فضلاً عن زيادة كفاءة استهلاك الغذاء (Lara-Flores وآخرون،2003) وهذا ما أشار أليه EL-Haroun وآخرون (2006) بتحقيق أعلى معدلات لنسبة كفاءة البروتين عند إضافة المعززات الحيوية في أغذية أسماك البلطي النيلي و Allameh وآخرون(2017) الذين توصلوا إلى نفس النتائج المذكورة بزيادة محتوى البروتين والدهن في أسماك البلطي النيلي دون تسجيل أية تأثيرات معنوية على محتوى الرطوبة والرماد عند إضافة المعززات الحيوية في أغذية تلك الأسماك، وربما يعزى سبب تفوق معاملة المعزز الحيوي السادسة الى ما أشار

أليه Nopchinda وآخرون (2002) أنه يمكن تحقيق أفضل أداء لبكتيريا *Streptococcus thermophilus* مع أحد الأنواع البكتيرية الأخرى *Bifidobacterium bifidum* أو *Lactobacillus plantarum* أو *Lactobacillus paracasei* وبما أن المعاملة المذكورة تحتوي على العزلتين البكتيريتين *Bifidobacterium bifidum* 5144 و *Streptococcus thermophilus* 5935 الأمر الذي انعكس بشكل واضح على أداء هذه المعاملة لهذا المعيار إذ تتحقق أداء أفضل للمعزز الحيوي بوجودهما معاً من خلال تصنيع بعض المنتجات الايضية المختلفة كالأنزيمات أو الحوامض العضوية أو الفيتامينات (Li وآخرون،2019) والتي ربما كانت تصنع بكميات أكبر مما تصنعه عزلة *Lactobacillus acidophilus* 4453 الأمر الذي ربما يجعلها تعتمد على تلك المنتجات في سد احتياجاتها والذي انعكس على أداء هذه المعاملة لهذا المعيار إذ أشار لهذا الأمر Duponnois و Garbaye (1990) أن البكتيريا أو الفطريات يمكن أن تستفيد من المركبات الخاصة التي يتم إنتاجها من الشريك الإخر التي لا تستطيع أنتاجها بنفسها أو إذا كانت تنتجها بكميات محدودة للنمو فقط وبالرغم من ذلك فأن هذه المعاملة متفوقة معنوياً على معاملات المعزز الحيوي الأخرى ومعاملتي المقارنة A و B، ويعزز ذلك ما توصل إليه Puvanasundram وآخرون(2021) بأن إضافة المعززات الحيوية متعددة الأنواع البكتيرية في تربية الأحياء المائية يحقق تحسن في الزيادة الوزنية ومعدل النمو النوعي ونسبة كفاءة البروتين. ومما تجدر الإشارة إليه أن بعض المعاملات ذات المعززات الحيوية المفردة كالأولى والثانية لم تفترق معنوياً عن معاملة المعزز الحيوي الرابعة كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثالثة ومن بعدها الخامسة إذ نجد هنالك تكافؤ في الأداء للمعاملات ذات العزلة البكتيرية المفردة على بعض المعاملات ذات العزلات البكتيرية المزدوجة وبالأخص التي تحتوي على العزلة البكتيرية *Lactobacillus acidophilus* 4453 ولنفس الأسباب آنفة الذكر أن العزلة الأخيرة ربما كانت تنتج بعض المنتجات الايضية الثانوية بشكل قليل جداً أو أنها لا تنتجها اساساً لذا تعتمد بشكل وبآخر على ما يتم أنتاجه من العزلات البكتيرية في المعاملات ذات العزلات البكتيرية المزدوجة كالمعاملة الرابعة والخامسة مما انعكس على أداء هذه المعاملات، إما بخصوص معاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية ومن بعدهما الثالثة فربما كان تصنيعها للمنتجات الايضية الثانوية أكثر مما لو كانت عليه بالتوليفات المزدوجة الرابعة والخامسة للسبب المشار إليه أعلاه مما يحقق أداء أفضل لها (Duponnois and Garbaye,1990) وبالأخص لهذا المعيار وبالرغم من ذلك فأن جميع هذه المعاملات متفوقة معنوياً على معاملتي المقارنة A و B وكما هو معروف أن وظيفة أي معزز

حيوي تتحدد بناءً على بعض أو كل مكوناته من الأنواع البكتيرية إذ لا يمكن التكهن بتأثير أي معزز حيوي مفرد أو مزدوج بناءً على جميع أو بعض مكوناته مع الأخذ بنظر الاعتبار عدة عوامل منها جودة المياه وأنواع الأحياء الدقيقة في تركيبة المعزز الحيوي ومستويات الإنزيمات المفرزة من قبلها والقابلية الوراثية للأسماك (Hamdan وآخرون،2016).

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى لمعيار الزيادة الوزنية إذ سجلت متوسط بلغ 188.86±0.64 غم ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت متوسط بلغ 198.73±2.42غم ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت متوسط بلغ 186.09±0.53 غم ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت متوسط بلغ 190.59±0.50 غم ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت متوسط بلغ 196.34±2.63 غم على التوالي كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملتين الثانية والخامسة لهذا المعيار. كما تفوق التخفيف 10^{-6} أيضاً لمعيار معدل النمو اليومي إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى متوسط بلغ 2.24±0.007 غم/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة متوسط بلغ 2.36±0.02 غم/ يوم ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة متوسط بلغ 2.21±0.006 غم/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي السادسة متوسط بلغ 2.26±0.006 غم/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة متوسط بلغ 2.33±0.03 غم/ يوم على التوالي كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لمعاملتي المعزز الحيوي الثانية والخامسة لهذا المعيار. أما بالنسبة لمعيار معدل النمو النسبي فنجد تفوق التخفيف 10^{-6} لكل معاملة على التخفيف 10^{-7} إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى متوسط بلغ 427.25±4.11% ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة متوسط بلغ 446.88±6.25% ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة متوسط بلغ 422.57±1.23% ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة متوسط بلغ 448.98±8.29% على التوالي، في حين لم تسجل أية فروق معنوية بين التخفيفين لمعاملات المعزز الحيوي الثانية والخامسة والسادسة. أما بخصوص معامل النمو النوعي فهو الآخر تفوق فيه التخفيف 10^{-6} لكل معاملة على التخفيف 10^{-7} إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى متوسط بلغ 1.97±0.009%/ يوم ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة متوسط بلغ 2.02±0.01%/ يوم ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة متوسط بلغ 1.96±0.002%/ يوم ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة متوسط بلغ 2.02±0.01%/يوم على التوالي في حين لم تسجل أية فروق معنوية بين التخفيفين لمعاملات المعزز الحيوي الثانية والخامسة والسادسة على التوالي. أما بالنسبة

لمعيار معامل النمو الحراري فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف 10^{-7} لمعاملة المعزز الحيوي الأولى إذ سجلت لهذا التخفيف متوسط بلغ 0.12±0.00% وسجل لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة متوسط بلغ 0.13±0.001% ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة متوسط بلغ 0.12±0.00% ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة متوسط بلغ 0.13±0.001% في حين لم يسجل أي فارق معنوي بين كلا التخفيفن للمعيار أعلاه لمعاملات المعزز الحيوي الثانية والخامسة والسادسة على التوالي، في حين كان هنالك تفاوت في نتائج التحليل الإحصائي بين التخفيفين لمعدل النمو الايضي إذ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى إذ سجلت لهذا التخفيف متوسط بلغ 11.40±0.03 غم/كغم/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة متوسط بلغ 11.66±0.07 غم/كغم/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة متوسط بلغ 11.33±0.006غم/كغم/يوم ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة متوسط بلغ 11.65±0.09 غم/كغم/يوم، بينما لم يكن هنالك فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لنفس المعيار لمعاملات المعزز الحيوي الثانية والخامسة على التوالي. ولم يسجل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لمعياري معدل التحويل الغذائي وكفاءة التحويل الغذائي لجميع معاملات المعزز الحيوي ماعدا المعاملة الثالثة إذ تفوق فيها التخفيف 10^{-7} معنوياً بتسجيله قيمة بلغت 1.90±0.02، إما بخصوص كفاءة التحويل الغذائي فكان التخفيف 10^{-6} متفوق معنوياً عن التخفيف 10^{-7} لنفس المعاملة إذ سجل متوسط بلغ 56.61±1.43، وكما هو الحال في المعيارين أعلاه إذ لم يسجل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لمعيار نسبة كفاءة البروتين لجميع معاملات المعزز الحيوي ما عدا المعاملة الثالثة إذ سجل التخفيف 10^{-6} متوسط بلغ 1.94±0.04، وربما يُعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية في التخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى لتوليفة العزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة داخل القناة الهضمية للأسماك وبحسب Giri وآخرون (2014) أن أستعمال المعززات الحيوية بالتخفيف CFU\g 10^{-6} حققت تحسين في معدل النمو عن طريق إحتجاز العناصر الغذائية بشكل أفضل في أسماك الروهو، ويعزز هذا الرأي ما أشار إليه Ramos وآخرون (2017) عن أستعمال بكتريا المعزز الحيوي *Bacillus sp.* و *Pediococcus sp.* و *Enterococcus sp.* و *Lactobacillus sp.* بتخفيف 10^{-6} أثر وبشكل كبير على إداء أسماك التراوت القزحي كالوزن النهائي للجسم والزيادة الوزنية ومعدل التحويل الغذائي ونسبة كفاءة البروتين.

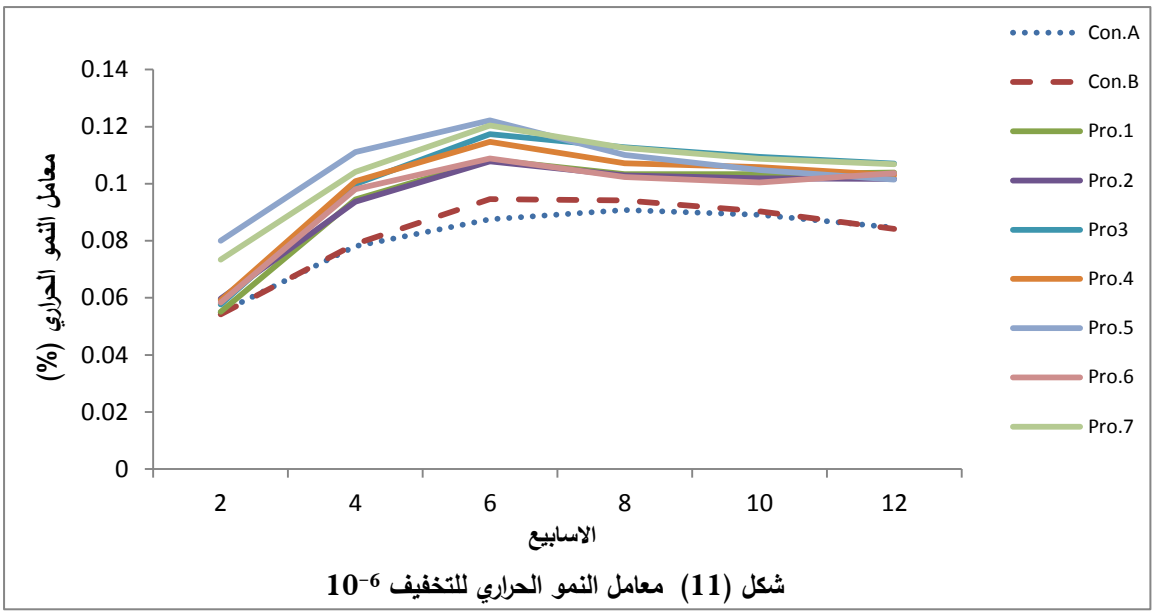
أما بخصوص تفوق التخفيف 10^{-7} لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة لمعامل التحويل الغذائي ربما يعلل سبب ذلك إلى احتمالية تكرار البيئة البكتيرية داخل القناة الهضمية للأسماك للتخفيف 10^{-6} على عكس التخفيف 10^{-7} مما يخلق حالة من التنافس بين بكتيريا نفس النوع تؤثر على أداء أسماك هذه المعاملة لهذا المعيار، أو ربما يعود السبب إلى عوامل خاصة بنفس مجموعة أسماك المعاملة من اختلافات فردية أو قابلية وراثية أو حالة توازن الأحياء المجهرية داخل القناة الهضمية لتلك الأسماك وغيرها من الأمور وبالمحصلة النهائية يمكن القول أن وظيفة أي معزز حيوي تتحدد بناءً على بعض أو كل مكوناته من الأنواع البكتيرية إذ لا يمكن التكهن بتأثير أي معزز حيوي مفرد أو مزدوج بناءً على جميع أو بعض مكوناته ، وقد وجد Tan وآخرون (2019) أن بكتيريا العزز الحيوي *Rummeliibacillus stabekisii* بالتخفيف 10^{-7} كانت ذات تأُثير كبير على إداء أسماك البلطي النيلي كالوزن النهائي للجسم والزيادة الوزنية ومعدل التحويل الغذائي ونسبة كفاءة البروتين.

جدول (13) بعض معايير النمو المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

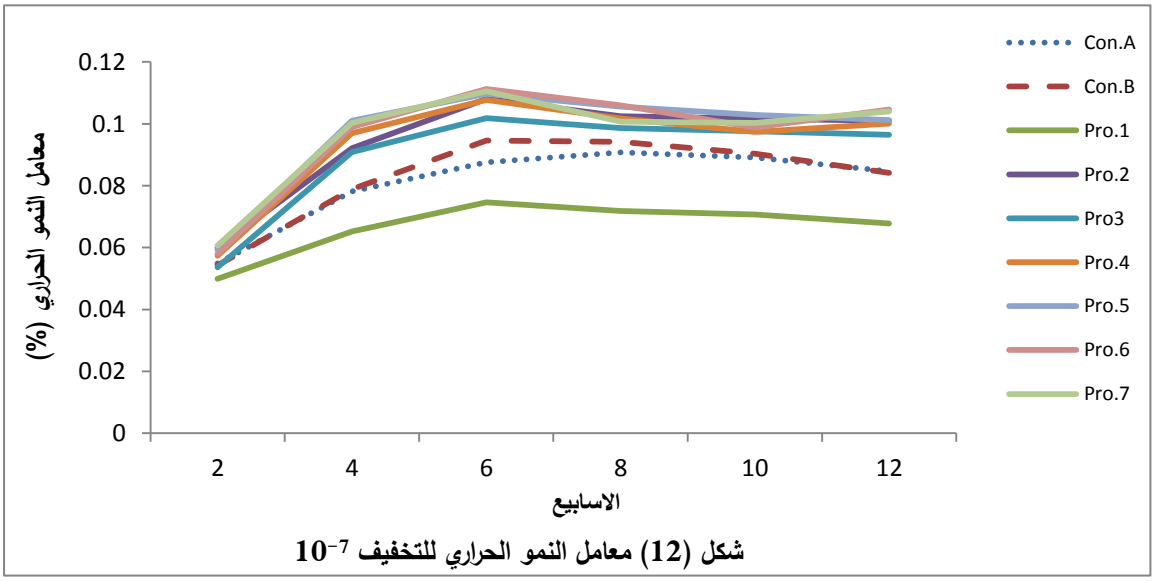
المعاملات		معامل النمو الحراري (%)	معدل النمو الايضي (غم / كغم /يوم)	العلف المقدم (غم)	معدل التحويل الغذائي	كفاءة التحويل الغذائي	نسبة كفاءة البروتين
معاملة السيطرة A		0.00±0.10 c	0.01±9.71 c	4.47±296.36 b	0.02±2.16 a	0.59±46.29 d	0.02±1.58 d
معاملة السيطرة B		0.00±0.10 c	0.06±9.65 c	6.67±305.54 b	0.05±2.23 a	1.07±44.83 d	0.03±1.53 d
المعزز الحيوي1	10^{-6}	0.05±0.12* 0.001±0.12 b	0.03±11.40* 0.07±11.13 b	3.74±332.16* 12.58±327.67 a	0.01±1.75 0.04±1.82 bcd	0.44±56.86 1.42±54.83 abc	0.01±1.95 0.04±1.88 abc
	10^{-7}						
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.00±0.12 0.001±0.12 b	0.03±11.22 0.07±11.16 b	5.75±326.84 8.35±326.88 a	0.03±1.80 0.03±1.81 bcd	1.17±55.60 1.04±55.05 abc	0.04±1.90 0.03±1.88 abc
	10^{-7}						
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.001±0.13* 0.001±0.12 b	0.07±11.66* 0.09±10.76 b	9.94±351.49* 7.23±321.51 a	0.04±1.76 0.02±1.90* bc	1.43±56.61* 0.56±52.54 bc	0.04±1.94* 0.01±1.80 bc
	10^{-7}						
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.00±0.12* 0.00±0.12 b	0.006±11.33* 0.03±11.07 b	5.08±339.85* 1.71±323.23 a	0.02±1.82 0.01±1.82 bcd	0.69±54.77 0.33±54.91 abc	0.02±1.87 0.01±1.88 abc
	10^{-7}						
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.00±0.12 0.00±0.12 b	0.06±11.19 0.04±11.18 b	1.59±345.93 4.49±331.27 a	0.02±1.90 0.03±1.83 b	0.57±52.50 0.97±54.42 c	0.01±1.80 0.03±1.86 c
	10^{-7}						
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.00±0.12 0.00±0.13 a	0.04±11.44 0.01±11.40 b	8.36±329.233 8.85±330.15 a	0.04±1.74 0.04±1.73 d	1.56±57.30 1.58±57.81 a	0.05±1.96 0.05±1.98 a
	10^{-7}						
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.001±0.13* 0.00±0.13 a	0.09±11.65* 0.02±11.41 a	5.22±348.41 9.21±330.32 a	0.03±1.77 0.04±1.74 cd	1.18±56.38 1.54±57.55 ab	0.04±1.93 0.05±1.97 ab
	10^{-7}						
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

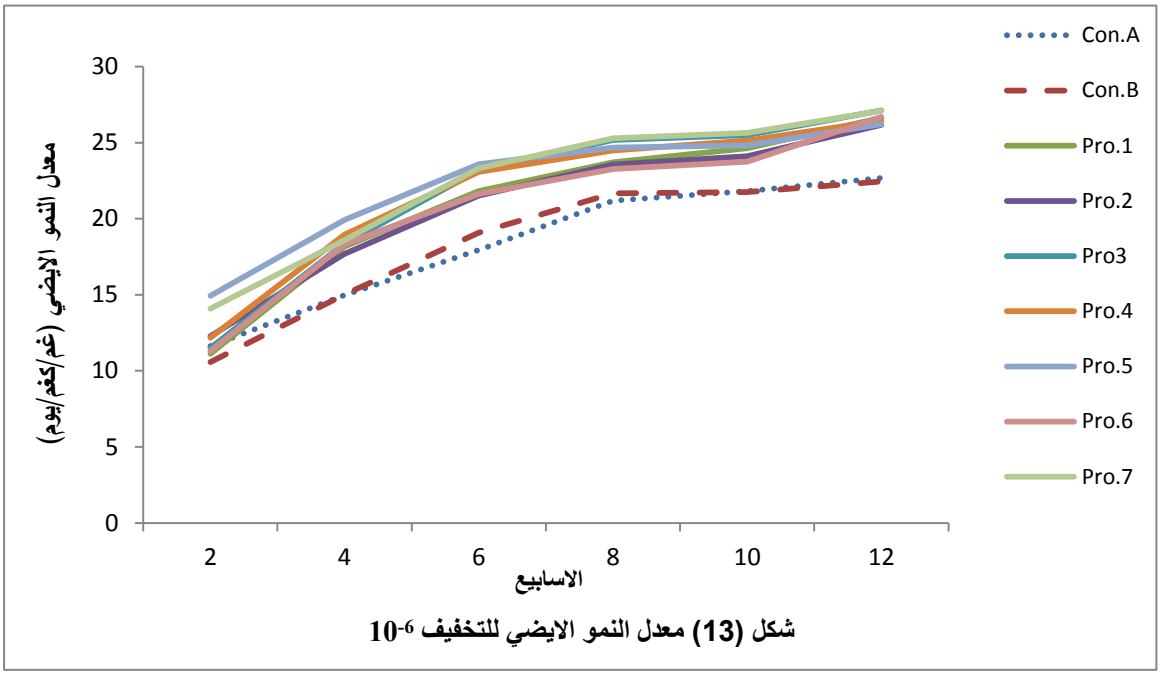
* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)



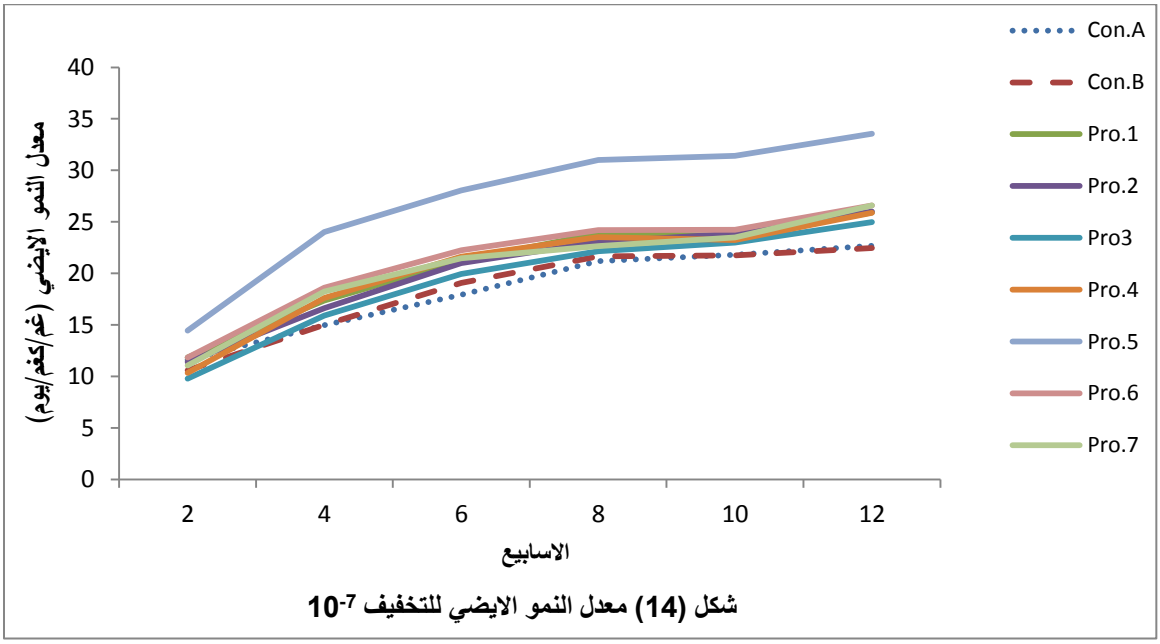
شكل (11) معامل النمو الحراري للتخفيف 10^{-6}



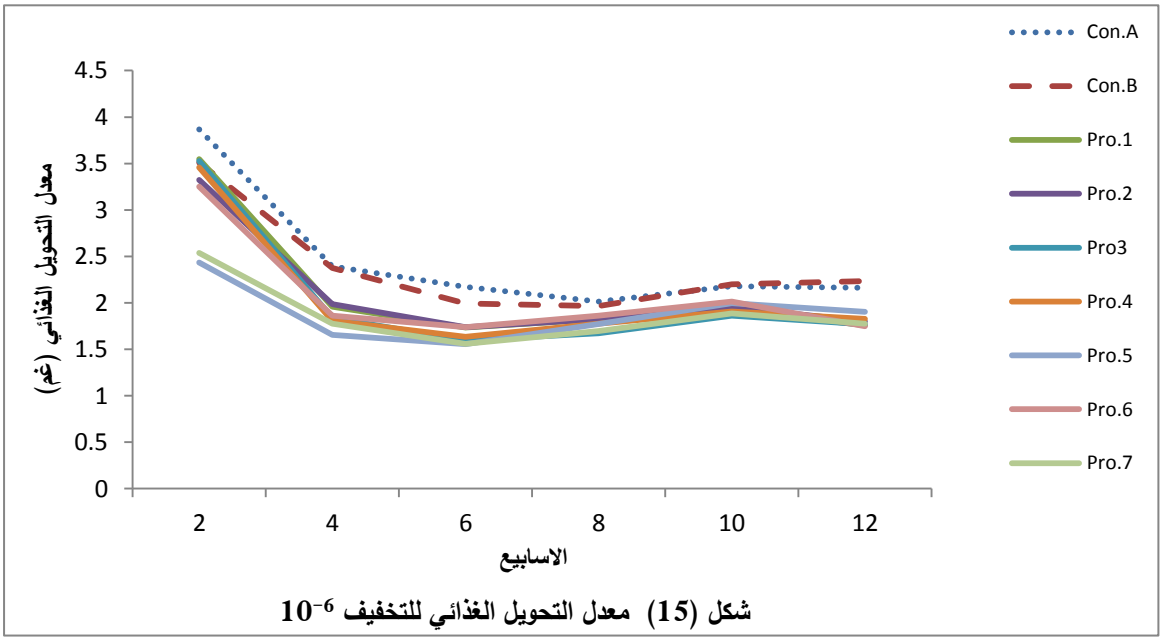
شكل (12) معامل النمو الحراري للتخفيف 10^{-7}



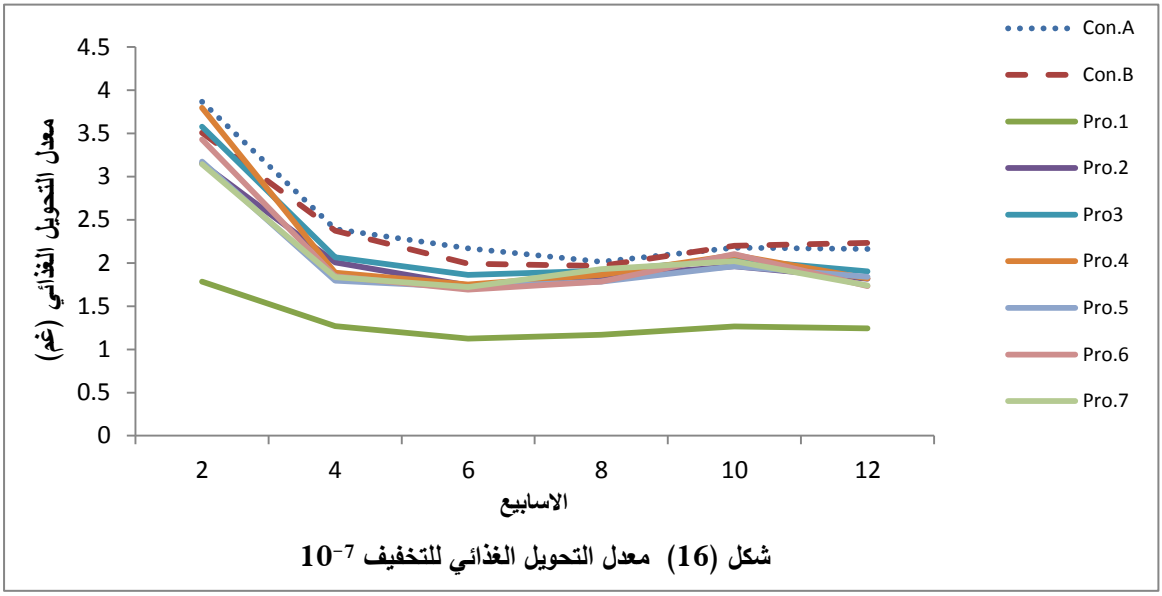
شكل (13) معدل النمو الايضي للتخفيف 10^{-6}



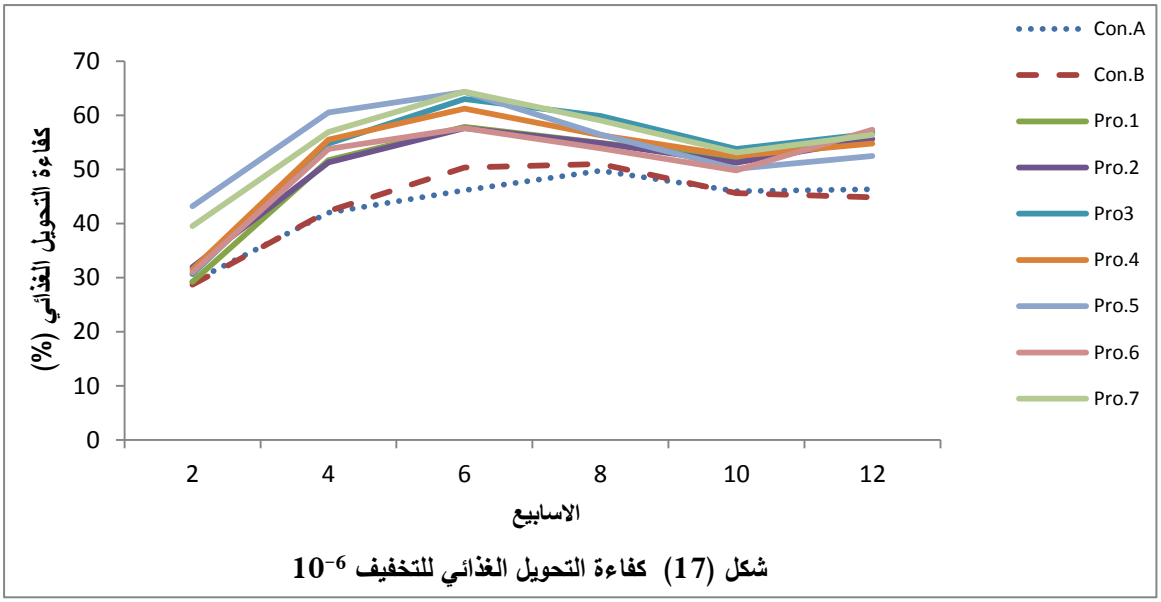
شكل (14) معدل النمو الايضي للتخفيف 10^{-7}



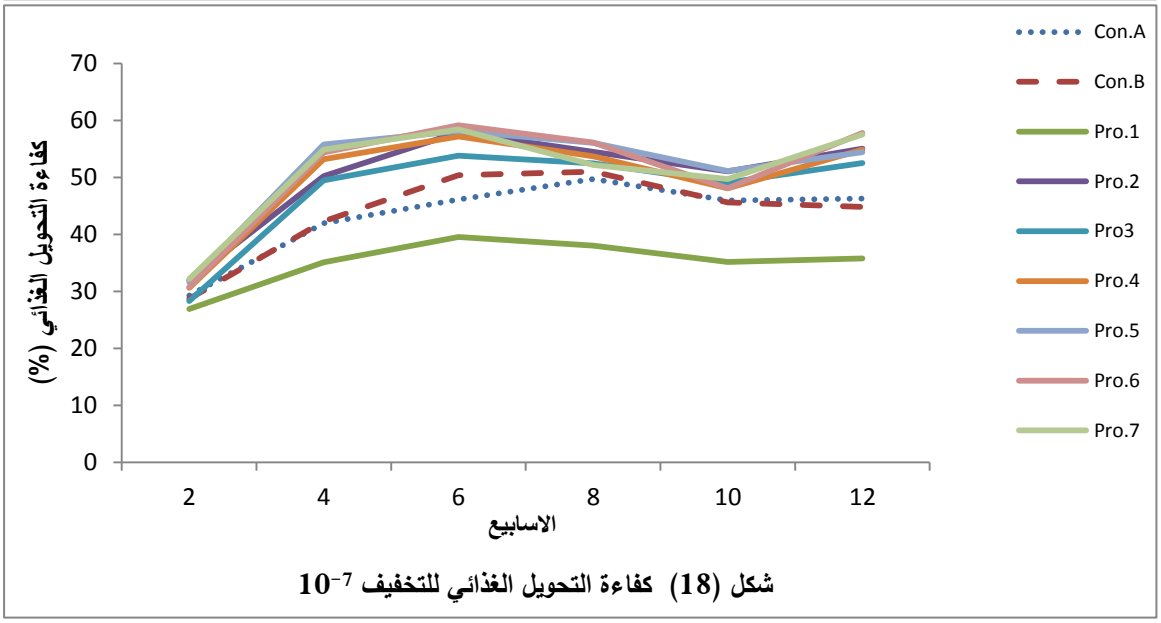
شكل (15) معدل التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-6}



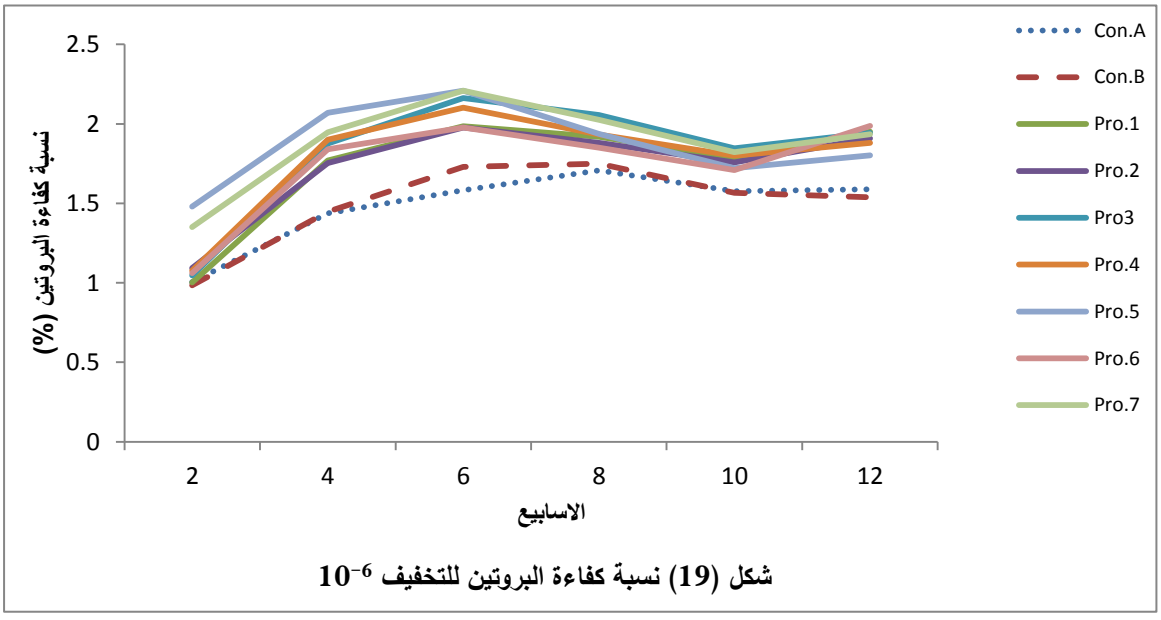
شكل (16) معدل التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-7}



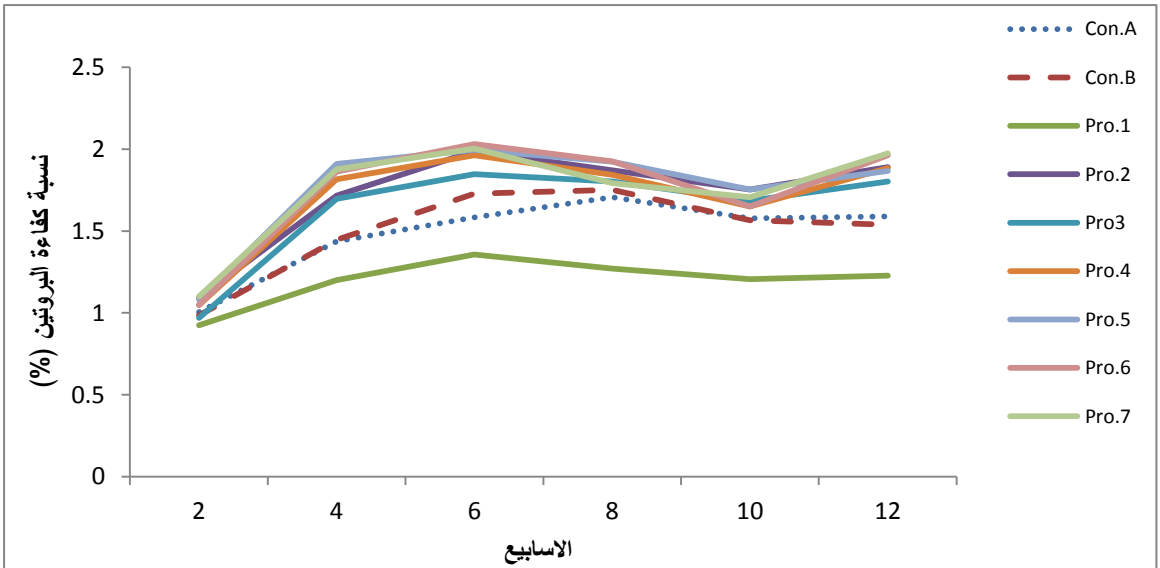
شكل (17) كفاءة التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-6}



شكل (18) كفاءة التحويل الغذائي للتخفيف 10^{-7}



شكل (19) نسبة كفاءة البروتين للتخفيف 10^{-6}



شكل (20) نسبة كفاءة البروتين للتخفيف 10^{-7}

4-7- بعض معايير الدم والمناعة لأسماك التجربة

4-7-1- معايير الدم

4-7-1-1- خلايا الدم الحمر RBC

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (14) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات المعزز الحيوي لخلايا الدم الحمر إذ تفوقت معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة بتسجيلهما أعلى قيم لهذا المعيار إذ سجلت معاملة المعزز الحيوي السابعة قيمتان بلغتا 0.39±2.45 و0.36±2.07 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 وسجلت معاملة المعزز الحيوي السادسة قيمتان بلغتا 0.35±2.36 و0.27±1.83 10^6 خلية/ملم^3 دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما، وافترقت عنهما معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 0.05±1.63 و0.03±1.31 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 تلتها معاملة المعزز الحيوي الخامسة بتسجيلها قيمتان بلغتا 0.06±1.37 و0.04±1.22 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها قيمتان بلغتا 0.14±1.40 و0.10±1.10 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة بتسجيلها قيمتان بلغتا 0.13±1.38 و0.035±1.16 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 ومعاملة المعزز الحيوي الأولى بتسجيلها قيمتان بلغتا 0.03±1.27 و0.045±1.16 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون أن تفترق عن معاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 0.01±1.11 $\times 10^6$ خلية/ملم^3 وجاءت من بعدها معاملة المقارنة A التي سجلت أدنى قيمة لهذا المعيار بلغت 0.06±0.93 $\times 10^6$ خلية/ملم^3.

4-7-1-2- الهيموغلوبين Hb

تشير النتائج في الجدول (14) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات المعزز الحيوي لجميع المعايير الدمية إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً ($p\leq0.05$) على باقي معاملات المعزز الحيوي لمعيار الهيموغلوبين إذ سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} أعلى قيمتين بلغتا 9.55±0.45 و8.26±0.14 غم/ديسيلتر، تلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ سجلت قيمتين بلغتا 8.93±0.84 و7.81±0.21 غم/ديسيلتر، وافترقت عنها معنوياً ($p\leq0.05$) معاملات المعزز الحيوي الخامسة والرابعة والثانية إذ جاءت من بعدها إذ سجلت معاملة المعزز الحيوي الخامسة قيمتين بلغتا 8.26±0.36 و7.87±0.15 غم/ديسيلتر وسجلت معاملة المعزز الحيوي الرابعة قيمتين بلغتا 8.34±0.73 و7.76±0.26 غم/ديسيلتر وسجلت معاملة المعزز الحيوي الثانية قيمتين بلغتا 8.60±0.58 و7.58±0.47 غم/ديسيلتر على التوالي ولكلا للتخفيفين المذكورين دون تسجيل أي فارق معنوي($p\leq0.05$) بين تلك المعاملات، كما تلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتين بلغتا 7.78±0.13 و7.10±0.01 غم/ديسيلتر على التوالي ولكلا للتخفيفين المذكورين، كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى والتي سجلت لكلا التخفيفين قيمتين بلغتا 7.05±0.05 و7.31±0.40 غم/ديسيلتر دون أن تفترق معنوياً ($p\leq0.05$) عن معاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 7.05±0.45 غم/ديسيلتر، أما معاملة المقارنة A فسجلت أدنى قيمة لهذا المعيار بلغت 6.65±0.65 غم/ديسيلتر.

4-7-1-3- مكداس الدم PCV

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (14) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات التجريبية لمعيار مكداس الدم إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً ($p\leq0.05$) بتسجيلها أعلى قيمتان لهذا المعيار بلغتا للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} 28.42±0.66 و26.50±0.99% ،تلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة والتي سجلت قيمتان بلغتا 27.02±1.97 و25.95±0.85%، وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 24.96±0.35 و23.57±0.42%، كما تلتها معاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 22.98±0.33 و22.10±1.34% ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 23.04±1.38 و21.88±0.97% ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 24.06±0.03 و23.26±0.50% ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا

23.70±0.79 و23.10±0.56% ولكلا التخفيفين المذكورين على التوالي دون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بينها وبدورها تفوقت تلك المعاملات معنوياً($p\leq0.05$) على معاملتي المقارنة A وB اللتان سجلتا أدنى قيم لهذا المعيار إذ بلغت لمعاملة المقارنة A 19.15±1.15% وبلغت لمعاملة المقارنة B 20.06±1.05% دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما.

4-7-1-4- متوسط حجم خلايا الدم الحمر MCV

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (14) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لمعيار متوسط حجم خلايا الدم الحمر إذ تفوقت معاملة المقارنة A معنوياً ($p\leq0.05$) على جميع المعاملات التجريبية وسجلت قيمة بلغت 206.45±0.45 مايكرومتر^3 وافترقت عنها معنوياً ($p\leq0.05$) معاملتي المعزز الحيوي الأولى والثالثة إذ تلتها وسجلت معاملة المعزز الحيوي الأولى قيمتان بلغتا 185.11±0.35 و210.26±0.98 مايكرومتر^3 وسجلت معاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمتان بلغتا 190.93±1.79 و209.97±0.30 مايكرومتر^3 ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} دون تسجيل أي فارق معنوي($p\leq0.05$) بينهما.كما افترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 176.61±1.32 و196.70±1.94 مايكرومتر^3، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة إذ سجلت قيمتان بلغتا 156.75±0.85 و204.39±1.56 مايكرومتر^3 ولكلا التخفيفين المذكورين ومعاملة المقارنة B والتي سجلت قيمة بلغت 180.69±7.87 مايكرومتر^3، كما افترقت عنهما معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ تلتها وسجلت قيمتان بلغتا 154.20±1.55 و180.32±0.54 مايكرومتر^3 وافترقت عنهما معنوياً ($p\leq0.05$) معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ تلتها وسجلت قيمتان بلغتا 108.82±1.81 و129.28±1.61 مايكرومتر^3،أما معاملة المعزز الحيوي السابعة فسجلت أدنى قيمتdن لهذا المعيار بلغتا 108.59±2.16 و112.18±0.63 مايكرومتر^3 ولكلا التخفيفين المذكورين سالفاً.

4-7-1-5- متوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر MCH

يتبين من الجدول (14) تفوق معاملة المقارنة A معنوياً ($p\leq0.05$) على جميع المعاملات التجريبية إذ سجلت أعلى قيمة لهذا المعيار بلغت 69.48±0.51 بيكوغرام تلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 59.48±0.90 و70.52±1.72 بيكوغرام ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 64.86±1.00 و62.16±0.89 بيكوغرام ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين المعاملتين

المذكورتين، وتلاهما في ذلك معاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 60.55±0.62 بيكوغرام ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 61.97±1.30 و59.54±0.46 بيكوغرام ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 54.59±0.74 و67.47±1.46 بيكوغرام، كما افترقت عنهما معنوياً ($p\leq0.05$) معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ جاءت من بعدهما وسجلت قيمتان بلغتا 57.45±0.71 و54.58±0.95 بيكوغرام، وتلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ سجلت قيمتان بلغتا 40.66±0.41 و50.83±0.64 بيكوغرام، أما معاملة المعزز الحيوي السابعة فسجلت أدنى قيمتان لهذا المعيار بلغتا 44.69±0.51 و46.98±0.50 بيكوغرام ولكلا التخفيفين المذكورين.

4-7-1-6- متوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر MCHC

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (14) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لمتوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السادسة معنوياً ($p\leq0.05$) على جميع المعاملات التجريبية وسجلت أعلى قيمتان لهذا المعيار بلغتا للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} 30.30±0.65 و35.76±0.49%، وافترقت عنها معنوياً ($p\leq0.05$) معاملة المقارنة B إذ تلتها وسجلت قيمة بلغت 31.17±0.82%ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 31.29±2.20 و31.86±2.00%ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 29.93±0.52 و32.73±0.63%ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 30.66±0.88 و32.18±0.37%ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 33.11±0.88 و31.15±0.46% وتلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة إذ سجلت قيمتان بلغتا 27.68±0.77 و28.19±0.31% ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 27.84±0.83 و28.04±1.14% ولكلا التخفيفين المذكورين، أما معاملة المقارنة A فسجلت أدنى قيمة لهذا المعيار بلغت 29.91±0.08%.

جدول (14) بعض معايير الدم المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

المعاملات		خلايا الدم الحمر (10^6 خلية/ ملم^3)	الهيموغلوبين (غم/ديسيلتر)	مكداس الدم (%)	متوسط حجم خلايا الدم الحمر (مايكرومتر^3)	متوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر (بيكوغرام)	متوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر (%)
معاملة السيطرة A		0.06±0.93 c	0.65±6.65 d	1.15±19.15 d	0.45±206.45 a	0.51±69.48 a	0.08±29.91 cd
معاملة السيطرة B		0.01±1.11 bc	0.45±7.05 cd	1.05±20.06 d	7.87±180.69 d	0.62±60.55 c	0.82±31.17 ab
المعزز الحيوي1	10^{-6}	0.03±1.27* 0.04±1.16 bc	0.05±7.05 0.40±7.31 cd	0.79±23.70 0.56±23.10 c	0.35±185.11 0.98±210.26 b	0.74±54.59 1.46±67.47 c	0.88±33.11* 0.46±31.15 ab
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.05±1.63* 0.03±1.31 b	0.58±8.60* 0.47±7.58 abc	0.35±24.96 0.42±23.57 bc	1.55±154.20 0.54±180.32* e	0.71±57.45 0.95±54.58 d	0.88±30.66* 0.37±32.18 ab
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.13±1.38* 0.035±1.16 bc	0.13±7.78 0.01±7.10 bcd	0.03±24.06 0.50±23.26 c	1.79±190.93 0.30±209.97 b	1.30±61.97 0.46±59.54 c	0.52±29.93 0.63±32.73* ab
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.14±1.40* 0.10±1.10 bc	0.73±8.34 0.26±7.76 abc	1.38±23.04 0.97±21.88 c	0.85±156.75 1.56±204.39* d	0.90±59.48 1.72±70.52* b	0.77±27.68 0.31±28.19 c
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.06±1.37* 0.04±1.22 bc	0.36±8.26 0.15±7.87 abc	0.33±22.98* 1.34±22.10 c	1.32±176.61 1.94±196.70 c	1.00±64.86 0.89±62.16 b	0.83±27.84 1.14±28.04 c
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.35±2.36 0.27±1.83 a	0.84±8.93* 0.21±7.81 ab	1.97±27.02 0.85±25.95 ab	1.81±108.82 1.61±129.28 f	0.41±40.66 0.64±50.83* e	0.65±30.30 0.49±35.76* a
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.39±2.45 0.36±2.07 a	0.45±9.55* 0.14±8.26 a	0.66±28.42 0.55±26.50 a	2.16±108.59 0.63±112.18 g	0.51±44.69 0.50±46.98 e	2.20±31.29 2.00±31.86 ab
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

يلاحظ من استعراض النتائج في الجدول (14) حصول تحسن في أغلب معايير الدم للأسماك المغذاة على المعززات الحيوية مقارنة مع معاملتي المقارنة ، إذ يلاحظ تفوق معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة لمعيار خلايا الدم الحمر وجاء من بعدها معاملات المعزز الحيوي الثانية ومن بعدها معاملات المعزز الحيوي الثالثة والرابعة والخامسة والأولى ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} ومعاملة المقارنة B دون تسجل أية فروق معنوية بين المعاملات المذكورة، وبدورها تفوقت تلك المعاملات على معاملة المقارنة A، وقد يعلل سبب ذلك التفوق لأسماك معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة إلى فعل التوليفات البكتيرية في تلك المعاملات من خلال ما تنتجه من مواد ايضية ثانوية تزيد من فعالية الايض داخل أجسام أسماك تلك المعاملات الأمر الذي يتطلب كميات كبيرة من الأوكسجين والذي يؤدي إلى زيادة خلايا الدم الحمر لإستيعاب تلك الكميات ونقلها حيث إحتياجها من قبل الخلايا الحية لمجابهة فعالية الايض العالية في تلك الخلايا (Lenfant and Johansen,1972) وما يعزز هذا التفسير ما توصلت إليه الدراسة من نتائج لمعامل النمو الايضي في الجدول (13) للمعاملات المذكورة وينطبق هذا الكلام على معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ تتميز العزلة البكتيرية *Bifidobacterium bifidum* 5144 بإنتاجها للكثير من المنتجات الايضية الثانوية كالفيتامينات مثل الثيامين والرايبوفلافين والبايريدوكسين وحامض الفوليك والكوبالامين وحامض الأسكوربيك وحامض النيكوتينيك وحامض السكسينيك والبايوتين (Shah,2011) وإنزيمات الجهاز الهضمي مثل Casein phosphatase و Lysozym (Jonathan,2006) وبعض المركبات الدهنية (Amalaradjou and Bhunia,2012) التي تزيد من فعالية الايض داخل أجسام أسماك المعاملة المذكورة ولذا تتطلب هذا القدر الكبير من الأوكسجين والذي يرافقه زيادة في أعداد خلايا الدم الحمر لإستيعاب تلك الكمية ونقلها حيث إحتياجها من قبل الخلايا الحية حيث تحدث الفعاليات الايضية العالية في تلك الخلايا .أما فيما يخص الهيموغلوبين فيلاحظ تفوق معاملة المعزز الحيوي السابعة ومن بعدها السادسة لهذا المعيار وجاء من بعدها معاملات المعزز الحيوي الخامسة والرابعة والثانية وجاءت من بعدهن معاملة المعزز الحيوي الثالثة ولكلا التخفيفان (10^{-6}) و(10^{-7}) وتلتها معاملة المعزز الحيوي الأولى ولم تفترق هذه المعاملة عن معاملة المقارنة B وجميع المعاملات المذكورة تفوقن على معاملة المقارنة A وكما معروف أن هيموغلوبين الدم موجود في خلايا الدم الحمر (De Souza and Bonilla-Rodriguez,2007) لذا فإن كمية الهيموغلوبين بالدم ترتبط بعدد خلايا الدم الحمر فكلما زادت أعدادها زادت كميته في الدم. وعند إستعراض النتائج في الجدول (14) نجد تسجيل فروق معنوية في

قيم معيار مكداس الدم بين جميع المعاملات التجريبية إذ افترقت جميع معاملات المعزز الحيوية وتفوقت معنوياً على معاملتي المقارنة A و B وبنفس الوقت افترقت تلك المعاملات معنوياً فيما بينها ولكلا التخفيفين إذ يلاحظ تفوق معاملتي المعزز الحيوي السابعة والسادسة لمعيار مكداس الدم وجاء من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثانية وتلتها معاملات المعزز الحيوي الأولى والثالثة والرابعة والخامسة، ولابد من الإشارة هنا إلى أن مكداس الدم والهيموغلوبين يزدادان بزيادة عدد خلايا الدم الحمر في الدم وهذا يعني أن هذه التفوق المعنوي للمعيارين المذكورين سالفاً له علاقة وثيقة بأعداد خلايا الدم الحمر المشار إليها في الجدول (14) والتي نتجت من جراء معاملات المعزز الحيوي من توليفات من عزلات بكتيرية من مجموعة بكتيريا حامض اللبنيك التي تتميز بإنتاجها لمجموعة من المنتجات الايضية الثانوية الضرورية للعديد من العمليات البيولوجية كأنزيم البروتييز والببتيديز واليوريز واللاييز والاميليز والايستريز والفينوكسيديز ومجموعة الأنزيمات المحللة للسكريات المتعددة (Tallapragada وآخرون،2018) إضافة إلى مجموعة من الفيتامينات كمجموعة الفيتامينات الذائبة في الدهون وتشمل فيتامين A و D و E و K، ومجموعة الفيتامينات الذائبة في الماء وتشمل فيتامين C ومجموعة فيتامينات B مثل الثايمين والرايبوفلافين والنياسين وحامض البانتوثنيك والبايرودوكسين والبايوتين وحامض الفوليك (Leblanc وآخرون،2013) التي كما ذكرنا سابقاً تزيد من الفعالية الايضية داخل الخلايا الحية للأسماك والتي تتطلب كميات كبيرة من الأوكسجين المذاب في الماء والتي تتطلب عدد مناسب من خلايا الدم الحمر لإمداد تلك الخلايا بما تحتاجه من الأوكسجين المذاب في الماء وبالتالي تزداد قيمة كل من معياري مكداس الدم والهيموغلوبين.

أما بخصوص معايير الدم الاخرى كمتوسط حجم خلايا الدم الحمر ومتوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر ومتوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر فقد درست كمؤشر للإخلال أو الاضطرابات التي من الممكن أن تحدث في حال أثرت معاملات المعزز الحيوي بشكل سلبي على أداء أسماك تلك المعاملات مقارنة مع معاملتي المقارنة A و B فمن خلال البيانات الموجودة في الجدول (14) يلاحظ تفوق معاملة المقارنة A لمعياري متوسط حجم خلايا الدم الحمر ومتوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر على باقي المعاملات التجريبية ويلاحظ كذلك تفوق معاملة المعزز الحيوي السادسة معنوياً لمعيار متوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر لكلا التخفيفان (10^{-6}) و(10^{-7}) وتلاها في ذلك معاملة المعزز الحيوي الرابعة والخامسة ومن بعدها معاملة المقارنة A وقد يعزى ذلك التفوق الى إحتمالية تكوين خلايا دم جديدة بكميات أكبر للمعاملات المذكورة إذ تكون تلك الخلايا ذات حجم كبير

ولها تركيز عالي من الهيموغلوبين مما يؤدي إلى أرتفاع قيمة كل من متوسط حجم خلايا الدم الحمر ومتوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر ومتوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر (Hrubec and Smith,2010) وبالتالي حصول التفوق المعنوي للمعاملات المذكورة.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى لخلايا الدم الحمر إذ سجلت قيمة بلغت 1.27±0.03 ×10^{6} خلية/ملم^{3} ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمة بلغت 1.63±0.05 ×10^{6} خلية/ملم^{3} ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمة بلغت 1.38±0.13 ×10^{6} خلية/ملم^{3} ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمة بلغت 1.40±0.14 ×10^{6}خلية/ملم^{3} ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمة بلغت 1.37±0.06 ×10^{6} خلية/ ملم^{3} على التوالي كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لمعاملتي المعزز الحيوي السادسة والسابعة . كما تفوق التخفيف 10^{-6} على التخفيف 10^{-7} لمعيار هيموغلوبين الدم لكل من معاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمة بلغت 8.60±0.58 غم/100 مل ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمة بلغت 8.93±0.84 غم/ 100 مل ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمة بلغت 9.55±0.45 غم/ 100 مل على التوالي كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لمعاملات المعزز الحيوي الأولى والثالثة والرابعة والخامسة. أما بالنسبة لمكداس الدم فنجد تفوق التخفيف 10^{-6} على التخفيف 10^{-7} إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الخامسة قيمة بلغت 22.98±0.33% كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لمعاملات المعزز الحيوي الأولى والثانية والثالثة والرابعة والسادسة والسابعة. أما بخصوص متوسط حجم خلايا الدم الحمر فتفوق فيه التخفيف 10^{-7} على التخفيف 10^{-6} إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الثانية قيمة بلغت 180.32±0.54 مايكرومتر^{3} ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة قيمة بلغت 204.39±1.56 مايكرومتر^{3} كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملات الأولى والثالثة والخامسة والسادسة والسابعة. أما بخصوص متوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-7} معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف 10^{-6} لكل من معاملة المعزز الحيوي الرابعة إذ سجلت قيمة بلغت 70.52±1.72 بيكوغرام ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمة بلغت 50.83±0.64 بيكوغرام وكما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملات الأولى والثانية والثالثة والخامسة والسابعة على التوالي.أما بالنسبة لمتوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم

الحمر فنجد تفوق التخفيف 10^{-6} على التخفيف 10^{-7} إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى قيمة بلغت 33.11±0.88 % ولمعاملة المعزز الحيوي الثانية قيمة بلغت 30.66±0.88 %، كما يلاحظ تفوق التخفيف 10^{-7} على التخفيف 10^{-6} لنفس المعيار لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة إذ سجلت قيمة بلغت 32.73±0.63% ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمة بلغت 35.76±0.49%، كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملات الأولى والرابعة والخامسة والسابعة على التوالي. وقد يُعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى لتوليفة العزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة ونتج عنه أداء أفضل لدم الأسماك تلك المعاملات التجريبية وبحسب Giri وآخرون(2014) أن المعززات الحيوية بالتخفيف10^{-6} CFU/g حسنت من معدل النمو عن طريق إحتجاز العناصر الغذائية بشكل أفضل في أسماك الروهو.أما بخصوص تفوق التخفيف 10^{-7} لمعاملة المعزز الحيوي الثانية لمعيار متوسط حجم خلايا الدم الحمر ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة لمعياري متوسط حجم خلايا الدم الحمر ومتوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة لمتوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر ومعاملة المعزز الحيوي السادسة لمتوسط هيموغلوبين خلايا الدم الحمر ومتوسط تركيز هيموغلوبين خلايا الدم الحمر وربما يعلل سبب ذلك إلى إحتمالية تكرار البيئة البكتيرية داخل القناة الهضمية للأسماك للتخفيف 10^{-6} على عكس التخفيف 10^{-7} مما يخلق حالة من التنافس بين بكتيريا نفس النوع تؤثر على أداء أسماك هذه المعاملة على المعايير المذكورة، أو ربما يعود السبب إلى عوامل خاصة بنفس مجموعة أسماك المعاملة من اختلافات فردية أو قابلية وراثية أو حالة توازن الأحياء المجهرية داخل القناة الهضمية لتلك الأسماك وغيرها من الأمور وبالمحصلة النهائية يمكن القول أن وظيفة أي معزز حيوي تتحدد بناءً على بعض أو كل مكوناته من الأنواع البكتيرية إذ لا يمكن التكهن بتأثير أي معزز حيوي مفرد أو مزدوج بناءً على جميع أو بعض مكوناته.

4-7-2-المعايير المناعية

تعتبر بكتيريا المعزز الحيوي الحية من المحفزات المناعية التي تستعمل كبدائل للمضادات الحيوية والمواد الكيميائية وتعمل كجزيئات إنذار لتفعيل الجهاز المناعي في الأسماك (Lopez وآخرون،2003) لذا اختبر تأثيرها في الكثير من الإحياء المائية (Geng وآخرون،2012)، وفيما يلي استعراض لنتائج بعض المعايير المناعية المدروسة :

4-7-2-1- خلايا الدم البيض WBC

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (15) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات المعزز الحيوي لخلايا الدم البيض إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة وسجلت أعلى قيمتان لهذا المعيار بلغتا 214.05±1.83 و209.18±1.18×10^3 خلية/ ملم^3 للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7}، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ سجلت للتخفيفين المذكورين قيمتان بلغتا 209.99±0.50 و209.96±1.78×10^3 خلية/ملم^3 وجاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي السادسة بتسجيلها قيمتان بلغتا 211.30±0.70 و208.29±0.71×10^3 خلية/ملم^3 وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الرابعة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 208.78±0.21 و209.06±0.87×10^3 خلية/ملم^3 ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 208.67±0.43 و207.90±0.40×10^3 خلية/ملم^3، وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الثالثة إذ تلتها وسجلت قيمتان بلغتا 208.19±0.95 و206.83±0.33×10^3 خلية/ملم^3 وجاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 207.82±0.27 و207.05±0.34×10^3 خلية/ملم^3 ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي، أما أدنى قيمة لهذا المعيار فكانت من نصيب معاملة المقارنة A التي سجلت قيمة بلغت 204.86±0.86×10^3 خلية/ملم^3 ومعاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 204.02±1.02×10^3 خلية/ملم^3.

4-7-2-2- الغلوبيولين المناعي Immunoglobulin IgM

أظهر معيار الغلوبيولين المناعي IgM في الجدول (15) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية فكانت أعلى قيمة مسجلة تعود إلى معاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 0.0061±0.001 و0.0072±0.0003 غم/لتر، وجاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ سجلت قيمتان بلغتا 0.0063±0.0004 و0.0061±0.0004غم/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 0.0062±0.0008 و0.0051±0.001 غم/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 0.007±0.0001 و0.0044±0.0002 غم/لتر،كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثالثة إذ سجلت قيمتان بلغتا 0.0051±0.0003 و0.0034±0.001 غم/لتر ولكلا التخفيفين المذكورين، أما أدنى قيمة مسجلة لهذا المعيار تعود لمعاملتي المقارنة A وB إذ سجلت معاملة المقارنة A قيمة بلغت 0.0022±0.0009 غم/لتر ومعاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت

0.0031±0.0009غم/لتر ولم تفترقا معنوياً ($p\leq0.05$) عن معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 0.0048±0.001 و0.0017±0.0006 غم/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 0.0035±0.001 و0.0029±0.0004 غم/لتر ولكلا التخفيفين المذكورين دون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بينهما.

جدول (15) بعض المعايير المناعية المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

المعاملات		خلايا الدم البيض (ملمتر^3/10^3)	خلايا الدم البيض المتغايرة (%)	خلايا الدم البيض اللمفاوية (%)	خلايا الدم البيض وحيدة النوى (%)	خلايا الدم البيض الحمضية (%)	خلايا الدم البيض القاعدية (%)	الغلوبيولين المناعي IgM (غم/لتر)	بروتينات بلازما الدم الكلية (غم/100 مل)
معاملة السيطرة A		0.86±204.86 e	0.25±2.85	0.45±8.55	0.10±2.50	0.04±0.25 e	0.00±0.10	0.00±0.0022 c	0.10±2.60 cd
معاملة السيطرة B		1.02±204.02 e	0.30±1.70	0.50±9.50	1.10±2.00	0.02±0.22 ef	0.05±0.25	0.00±0.0031 c	0.04±2.94 d
المعزز الحيوي1	10^{-6} 10^{-7}	0.27±207.82 0.34±207.05 d	0.64±1.55 0.95±1.95	0.55±8.55 0.50±7.50	0.25±1.55 0.80±2.90	0.005±0.25 0.01±0.59* a	0.00±0.10 1.30±1.70	0.001±0.0048 0.00±0.0017 c	0.20±3.10 0.05±2.85 cd
المعزز الحيوي 2	10^{-6} 10^{-7}	0.43±208.67 0.40±207.90 bcd	0.53±2.57 0.17±1.23	0.00±6.00 0.50±8.50*	0.95±1.05 0.02 ±2.07	0.01±0.38 0.01±0.41 a	0.00±0.20 0.00±0.10	0.001±0.0035 0.00±0.0029 c	0.25±3.25 0.20±2.70 cd
المعزز الحيوي 3	10^{-6} 10^{-7}	0.95±208.19* 0.33±206.83 cd	0.63±2.06 0.07±0.98	0.70±8.30 2.00±10.00	0.05±0.95 0.20±1.00	0.01±0.31* 0.01±0.21 de	0.05±0.25 0.05±0.15	0.00±0.0051 0.001±0.0034 bc	0.20±3.30* 0.005±2.99 c
المعزز الحيوي 4	10^{-6} 10^{-7}	0.21±208.78 0.87±209.06 bcd	0.75±2.45 0.01±2.01	2.44±9.55 0.85±6.15	0.35±1.95 0.20±2.80	0.00±0.31 0.01±0.41* b	0.00±0.20 0.00±0.10	0.00±0.007* 0.00±0.0044 ab	0.08±4.02 0.25±3.65 b
المعزز الحيوي 5	10^{-6} 10^{-7}	0.50±209.99 1.78±209.96 ab	0.56±3.48* 0.25±1.34	0.57±11.03 2.23±9.23	0.55±2.75 0.50±1.00	0.01±0.20 0.005±0.19 f	0.05±0.25 0.00±0.10	0.00±0.0062* 0.001±0.0051 ab	0.26±4.24 0.10±4.10 b
المعزز الحيوي 6	10^{-6} 10^{-7}	0.70±211.30* 0.71±208.29 abc	0.20±2.30 1.34±2.25	0.62±9.69 2.60±9.40	1.25±1.85 0.29±1.70	0.01±0.30 0.01±0.29 cd	0.05±0.35 0.05±0.25	0.00±0.0063 0.00±0.0061 ab	0.07±5.02 0.40±4.40 a
المعزز الحيوي 7	10^{-6} 10^{-7}	1.83±214.05* 1.18±209.18 a	1.65±2.65 0.41±1.91	0.50±8.50 0.80±10.80*	0.01±1.10 0.14±2.45	0.005±0.31 0.005±0.29 c	0.005±0.30 0.31±0.31	0.001±0.0061 0.00±0.0072 a	0.09±5.11 0.005±4.99 a
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

يلاحظ من استعراض النتائج في الجدول (15) حصول تحسن في أغلب المعايير المناعية للأسماك المغذاة على المعززات الحيوية مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB إذ يلاحظ تفوق معاملتي المعزز الحيوي السابعة تلتها الخامسة ثم السادسة ومن بعدها الرابعة والثانية اللتان لم تفترقا معنوياً فيما بينهما وتلتهما في ذلك معاملة المعزز الحيوي الثالثة ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى وجاء من بعدها معاملتي المقارنة A وB لمعيار خلايا الدم البيض، ربما يرجع سبب ذلك التفوق إلى تفاعل المعززات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة مع بعض المكونات المناعية كأنواع خلايا الدم البيض والتي نتج عنها تعزيز الاستجابة المناعية الفطرية لجميع أسماك معاملات المعزز الحيوي (Nikoskelainen وآخرون،2003) ويدعم هذا الرأي ما توصل إليه Kumar وآخرون (2008) عند دراستهم أستعمال بكتيريا المعزز الحيوي *Bacillus subtilus* في غذاء أسماك الروهو بزيادة عدد خلايا الدم البيض وبعض أنواعها كخلايا الدم البيض وحيدة النوى Monocytes وبالتالي زيادة المناعة الفطرية. ومن خلال استعراض النتائج الخاصة بالعد المايكروبي الكلي للقناة الهضمية في الجدول (21) يلاحظ أن العد المايكروبي الكلي المكون من الأحياء الدقيقة النافعة المستوطنة بشكل طبيعي داخل القناة الهضمية وبكتيريا المعزز الحيوي لمعاملات المعزز الحيوي أكثر مما هو عليه في معاملتي المقارنة A وB وبشكل كبير في المعاملات متعدد العزلات البكتيرية إذ أن استيطان العزلات البكتيرية الثلاث مجتمعة في معاملة المعزز الحيوي السابعة وهي الأفضل معنوياً عن باقي المعاملات التجريبية أو بشكل مزدوج في معاملات المعزز الحيوي الخامسة والسادسة والرابعة نتج عنه تعديل واضح في مجتمع الأحياء النافعة الدقيقة وإقصاء بعض الأحياء الدقيقة الغريبة أو الممرضة الأمر الذي ربما أثر على عدد خلايا الدم البيض في الدورة الدموية من خلال التأثير على مصادرها في الكلية والطحال والقناة الهضمية وبشكل عام أشارت دراسات تجريبية عديدة أن خلايا الدم البيض يزداد عددها في دم الأسماك التي تتغذى على أغذية حاوية على معززات حيوية مقارنة مع الأغذية غير الحاوية عليها، إضافة إلى تحسن الاستجابة المناعية فيها عند مقارنتها مع معاملة المقارنة وقد توصلت دراسات كثيرة لمثل هذه النتيجة كأستعمال معزز حيوي مكون من مزيج من بكتيريا و *Lactobacillus acidophilus* و*Bacillus subtilis* في أغذية أسماك البلطي النيلي (Aly,2013) والمعزز الحيوي المكون من *Bacillus subtilis* وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* في أسماك الكارب الأبيض*Cirrhinus cirrhosus* (Ullah وآخرون،2018) والمعزز الحيوي متعدد الأنواع البكتيرية *Lactobacillus sporogenes* و*Lactobacillus acidophilus* و *Bacillus*

subtilis و *Bacillus licheniformis* في أسماك الكارب الابيض (Sharma وآخرون،2013) وبنفس الآليات المذكورة أعلاه ومن خلال استعراض نتائج العد المايكروبي الكلي للقناة الهضمية للأسماك في الجدول (21) يلاحظ أن معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المفردة كالثانية المتفوقة معنوياً على الأولى والثالثة اللتان بدورهما تفوقتا على معاملتي المقارنة A وB كان لها أداء مماثل لمعاملات المعزز الحيوي متعددة العزلات البكتيرية المذكورة في تعديل المحتوى المايكروبي الكلي للقناة الهضمية أو زيادة المناعة الفطرية لكن بوتيرة اقل والذي انعكس في تسجيل الفارق المعنوي لمعيار خلايا الدم البيض لأسماك الكارب الشائع وهذا ما وجده Kamgar and Ghane (2014) عند اختبار تأثير بكتيريا المعزز الحيوي *Bacillus subtilis* في أغذية أسماك التراوت القزحي.

ويلاحظ أن المعاملات التجريبية قد افترقت معنوياً فيما بينها لمعيار الغلوبيولين المناعي IgM إذ يلاحظ أن أداء أسماك معاملات المعزز الحيوي متعددة العزلات البكتيرية كمعاملة المعزز الحيوي السابعة تفوقت معنوياً على جميع معاملات المعزز الحيوي ومن بعدها معاملات المعزز الحيوي السادسة والخامسة والرابعة وربما يفسر ذلك على أن المعززات الحيوية تعمل على تحفيز المناعة الفطرية للأسماك من خلال زيادة عدد خلايا B في قناتها المعوية التي تنتج الغلوبيولينات المناعية ومنها الغلوبيولين المناعي IgM في دم الأسماك، ومن خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي الخاصة بالمعايير النسيجية الشكلية في الجدول (19) وبالأخص سمك الطبقة المخاطية للقناة الهضمية يلاحظ أن جميع معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المفردة والمزدوجة والثلاثية قد تفوقن معنوياً على معاملتي المقارنة A وB، إذ تنتشر في هذه الطبقة الخلايا اللمفاوية B إذ تعد الجهاز المناعي في القناة الهضمية للأسماك وتقوم بأفراز الغلوبيولينات المناعية والتي تعد خط دفاع حاسم ضد المايكروبات الممرضة وتمنع أيضاً وصول البكتيريا المتعايشة إلى الظهارة المعوية (Parra وآخرون،2016) التي أيضا ازداد عددها بزيادة سمك الطبقة المخاطية وما هذه الزيادة إلا استجابة لآلية عمل المعززات الحيوية إذ أن استيطان العزلات البكترية الثلاث مجتمعة في معاملة المعزز الحيوي السابعة وهي الأفضل معنوياً أو بشكل مزدوج كما هو الحال عليه في معاملات المعزز الحيوي السادسة والخامسة والرابعة أو بشكل مفرد كما هو الحال عليه في معاملة المعزز الحيوي الثالثة نتج عنها تحفيز للخلايا اللمفاوية B الموجودة في الطبقة المخاطية للقناة الهضمية وبالتالي نتج عنها زيادة في أفرار الغلوبيولين المناعي IgM ويعزز هذا الرأي ما جاء به Guzman-Villanueva وآخرون (2014) الذين وجدوا زيادة إفراز الغلوبيولين المناعي IgM من الخلايا اللمفاوية B الموجودة في الطبقة

المخاطية للقناة الهضمية لأسماك الدنيس بتأثير بكتيريا المعزز الحيوي *Shewanella putrefaciens* في غذاءها، وهذا ما توصل إليه أيضا Giri وآخرون (2012) بزيادة مستوى الغلوبيولين المناعي IgM في مصل دم أسماك كارب الروهو عند تغذيتهم على غذاء حاوي على بكتيريا المعزز الحيوي *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2.كما وجد Ullah وآخرون (2018) زيادة فعالية الغلوبيولين المناعي IgM في مصل دم أسماك موري *Cirrhinus mrigala* عند تغذيتها على غذاء يحتوي على معزز حيوي تجاري مكون من بكتيريا *Bacillus subtilis* وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة مقارنة مع معاملتي المقارنة A و B فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لخلايا الدم البيض إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمة بلغت 208.19±0.95×10^3/ملم^3 وسجل لمعاملة المعزز الحيوي السادسة قيمة بلغت (211.30±0.70×10^3/ملم^3 ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة قيمة بلغت (214.05±1.83× 10^3/ملم^3 على التوالي. أما بخصوص الغلوبيولين المناعي IgM فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها القيمة 0.007±0.00 غم/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة بتسجيلها القيمة 0.0062±0.00 غم/لتر كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملات الأولى والثانية والثالثة والسادسة والسابعة على التوالي وربما يعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى لتوليفة العزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة ونتج عنه أداء أفضل للمعايير المناعية. أما بخصوص تفوق التخفيف 10^{-7} لمعاملة المعزز الحيوي الأولى والرابعة لبعض المعايير المناعية سالفة الذكر ربما يعلل سبب ذلك إلى إحتمالية تكرار البيئة البكتيرية داخل القناة الهضمية للأسماك للتخفيف 10^{-6} على عكس التخفيف 10^{-7} مما يخلق حالة من التنافس بين بكتيريا نفس النوع تؤثر على أداء أسماك هذه المعاملة على المعايير المذكورة، أو ربما يعود السبب إلى عوامل خاصة بنفس مجموعة أسماك المعاملة من اختلافات فردية أو قابلية وراثية أو حالة توازن الأحياء المجهرية داخل القناة الهضمية لتلك الأسماك وغيرها من الأمور وبالمحصلة النهائية يمكن القول أن وظيفة أي معزز حيوي تتحدد بناءً على بعض أو كل مكوناته من الأنواع البكتيرية إذ لا يمكن التكهن بتأثير أي معزز حيوي مفرد أو مزدوج بناءً على جميع أو بعض مكوناته.

4-8- هرمونات الغدة الدرقية

4-8-1- الهرمون المحفز للغدة الدرقية TSH

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (16) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية للهرمون المحفز للغدة الدرقية إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً ($p\leq0.05$) للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على جميع المعاملات التجريبية بتسجيلها أعلى قيمتين لهذا المعيار بلغتا 0.05±0.65 و0.04±0.62 مايكرو وحدة دولية/لتر، وتلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ سجلت قيمتين بلغتا 0.01±0.57 و0.01±0.59 مايكرو وحدة دولية/مل، وافترقتا عنها معاملتا المعزز الحيوي الخامسة والرابعة إذ تلاها وسجلت معاملة المعزز الحيوي الخامسة قيمتين بلغتا 0.02±0.57 و0.05±0.51 مايكرو وحدة دولية/مل وسجلت ايضاً معاملة المعزز الحيوي الرابعة قيمتين بلغتا 0.03±0.58 و0.01±0.51 مايكرو وحدة دولية/مل ولكلا التخفيفين المذكورين دون تسجيل أي فارق معنوي($p\leq0.05$) بينهما. كما تلتهما معاملة المقارنة A إذ سجلت قيمة بلغت 0.02±0.47 مايكرو وحدة دولية/مل ولم تفترق معنوياً ($p\leq0.05$) عن معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 0.01±0.51 و0.005±0.49 مايكرو وحدة دولية/مل ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 0.005±0.53 و0.005±0.51 مايكرو وحدة دولية/مل ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 0.005±0.50 و0.005±0.51 مايكرو وحدة دولية/مل ولكلا التخفيفين المذكورين، كما سجلت معاملة المقارنة B اقل قيمة لهذا المعيار إذ بلغت 0.01±0.49 مايكرو وحدة دولية/مل.

4-8-2- هرمون الثايرونين T3

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (16) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات المعزز الحيوي لهرمون الثايرونين إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً بتسجيلها أعلى قيمتان لهذا المعيار إذ بلغتا للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} 0.30±5.80 و0.10±5.10 نانومول/لتر، وتلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة بتسجيلها قيمتان بلغتا 0.16±5.14 و0.10±5.10 نانومول/لتر، كما افترقت عنها معنوياً ($p\leq0.05$) معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ تلتها وسجلت قيمتان بلغتا 0.13±4.79 و0.96±4.52 نانومول/لتر، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 0.19±4.28 و0.74±3.76 نانومول/لتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 0.66±4.09 و0.01±2.99 نانومول/لتر ومعاملة المعزز

الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 3.64±0.76 و3.62±0.91 نانومول/لتر دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما، كما جاءت معاملة المعزز الحيوي الأولى من بعدهما وسجلت قيمتان بلغتا 2.91±0.11 و2.41±0.08 نانومول/لتر ولكلا التخفيفين المذكورين.أما معاملة المقارنة B فقد إفترقت معنوياً ($p\leq0.05$) عن معاملات المعزز الحيوي وتلتها وسجلت قيمة بلغت 1.80±0.20 نانومول/لتر، كما سجلت معاملة المقارنة A اقل قيمة لهذا المعيار بلغت 0.90±0.10 نانومول/لتر.

4-8-3- هرمون الثايروكسين T4

أظهر هرمون الثايروكسين في الجدول (16) فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات التجربة فكانت أعلى قيمتان للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} تعودان إلى معاملة المعزز الحيوي السابعة إذ بلغتا 9.09±0.90 و8.76±0.46 نانومول/لتر، كما جاءت معاملة المعزز الحيوي السادسة من بعدها بتسجيلها قيمتان بلغتا 7.89±0.11 و8.39±1.39 نانومول/لتر، وافترقت عنها معنوياً ($p\leq0.05$) معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ تلتها وسجلت قيمتان بلغتا 6.83±0.17 و6.86±0.26 نانومول/لتر، وجاءت من بعدها معاملات المعزز الحيوي الخامسة إذ سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 5.78±0.22 و6.71±1.71 نانومول/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 7.20±0.20 و5.28±0.28 نانومول/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 7.35±0.25 و5.60±0.60 نانومول/لتر ولم يسجيل أي فارق معنوي($p\leq0.05$) بينهما ولكلا التخفيفين المذكورين وتلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها قيمتان بلغتا 5.83±0.17 و4.66±0.33 نانومول/لتر، ويلاحظ أيضا من الجدول (16) أن جميع معاملات المعزز الحيوي تفوقن معنوياً على معاملة المقارنة B التي سجلت لهذا المعيار قيمة بلغت 4.77±0.46 نانومول/لتر، أما أقل قيمة مسجلة لهرمون الثايروكسين تعود الى معاملة المقارنة A إذ بلغت 4.31±0.20نانومول/لتر.

جدول (16) هرمونات الغدة الدرقية المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

المعاملات		الهرمون المحفز للغدة الدرقية (TSH) (مايكرو وحدة دولية/مل)	هرمون الثايرونين (T3) (نانومول/لتر)	هرمون الثايروكسين (T4) (نانومول/لتر)
معاملة السيطرة A		0.02±0.47 cd	0.10±0.90 f	0.20±4.31 e
معاملة السيطرة B		0.01±0.49 d	0.20±1.80 ef	0.46±4.77 de
المعزز الحيوي1	10^{-6}	0.01±0.51 0.005±0.49 cd	0.11±2.91 0.08±2.41 de	0.25±7.35* 0.60±5.60 cd
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.005±0.53 0.005±0.51 cd	0.13±4.79 0.96±4.52 abc	0.17±6.83 0.26±6.86 bc
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.005±0.50 0.005±0.51 cd	0.66±4.09 0.01±2.99 cd	0.20±7.20* 0.28±5.28 cd
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.03±0.58* 0.01±0.51 bc	0.76±3.64 0.91±3.62 cd	0.17±5.83* 0.33±4.66 cde
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.02±0.57* 0.05±0.51 bc	0.19±4.28 0.74±3.76 bc	0.22±5.78 1.71±6.71 cd
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.01±0.57 0.01±0.59 ab	0.16±5.14 0.10±5.10 ab	0.11±7.89 1.39±8.39 ab
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.05±0.65 0.04±0.62 a	0.30±5.80 0.10±5.10 a	0.90±9.09 0.46±8.76 a
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

*العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

تؤدي هرمونات الغدة الدرقية دورًا مهمًا في جميع العمليات الفسيولوجية في الجسم كعملية التمثيل الغذائي وإعادة تشكيل العظام وتحسين وظيفة القلب وتطور الدماغ (Gavrila and Hollenberg, 2019). ويلاحظ أن المعاملات التجريبية قد افترقت معنوياً فيما بينها لهذا المعيار إذ إن أداء أسماك معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المتعددة كمعاملة المعزز الحيوي السابعة التي تفوقت معنوياً على جميع معاملات المعزز الحيوي للهرمونات الثلاث ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي السادسة والخامسة ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الرابعة ومن خلال استعراض النتائج في الجدول (21) يلاحظ تسجيل أغلب معاملات المعزز الحيوي لاسيما السابعة أعلى قيم مسجلة لعدد المايكروبات الكلي للقناة الهضمية للأسماك ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي السادسة بفعل التركيبة الثلاثية والمزدوجة في هاتين المعاملتين اللتان أجريتا تعديل مايكروبي في مجتمع الأحياء الدقيقة بزيادة عدد بكتيريا المعزز الحيوي داخل القناة الهضمية لأسماك تلك المعاملات وكما معروف أن مجتمع الأحياء الدقيقة داخل القناة الهضمية يتفاعل مع النواقل العصبية للقناة الهضمية كالسيروتونين والدوبامين والكاتيكول أمين والنورابنفرين التي تتحرر من الخلايا العصبية المعوية في الجهاز الهضمي للأسماك (Asano وآخرون،2012 ; Yano وآخرون،2015) والتي تتفاعل بشكل وأخر مع محور تحت المهاد_النخامية_الدرقية الذي يؤثر في حركة القناة الهضمية ووظيفتها وإفراز الهرمونات في للأسماك (Strandwitz,2018 ; Yang and Chiu,2017) كأفراز الهرمون المحفز للغدة الدرقية والذي عمل على تحفيز الغدة الدرقية وزاد من إفرازها لهرموني الثايرونين والثايروكسين في دم أسماك التجربة. كما أن المعززات الحيوية مع مجتمع الأحياء الدقيقة النافعة ربما أثرت بشكل غير مباشر في إفراز الغدة الدرقية لهرموني الثايرونين والثايروكسين من خلال بعض العمليات كإمتصاص اليود الذي يكون عنصراً أساسياً لعمل الغدة الدرقية أو ربما يدخل في تخليق هرموناتها أو في تحويل هرمون الثايروكسين الى هرمون الثايرونين الفعال بايلوجياً.

كما ويعزى سبب تفوق معاملات المعزز الحيوي ذات العزلة المفردة كالمعاملة الثانية التي تفوقت على معاملتي المعزز الحيوي الأولى والثالثة اللتان تفوقتا أيضا على معاملتي المقارنة A وB إلى أن العزلات البكتيرية الثلاث ضمن تركيبة المعززات الحيوية أعلاه بشكل مفرد هي من ضمن أنواع بكتيريا حامض اللبنيك التي تتميز بإنتاجها لمجموعة من الفيتامينات الضرورية للعديد من العمليات البيولوجية التي تحدث في جميع الكائنات الحية والتي تتضمن مجموعتين الأولى مجموعة الفيتامينات الذائبة في الدهون وتشمل فيتامين A وD وE وK، والثانية مجموعة الفيتامينات الذائبة في

الماء وتشمل فيتامين C ومجموعة فيتامينات B مثل الثايمين والرايبوفلافين والنياسين وحامض البانتوثنيك والبايرودوكسين والبايوتين وحامض الفوليك والكوبالامين (Leblanc وآخرون،2013) وحامض النيكوتينيك وحامض السكسينيك والبيوتين وان هذه الفيتامينات (Shah,2011) كما ذكر سابقاً تؤثر بشكل غير مباشر على إفرازات الغدة الدرقية لهرموني الثايرونين والثايروكسين من خلال عملها في تخليق هرمونات الغدة الدرقية أو في تحويل هرمون الثايروكسين إلى هرمون الثايرونين الفعال بايلوجياً.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB للهرمون المحفز للغدة الدرقية فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها قيمة بلغت 0.58±0.03 نانومول/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمة بلغت 0.57±0.02 نانومول/لتر، أما بخصوص هرمون الثايرونين فلم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لجميع المعاملات التجريبية. ومن خلال استعراض النتائج في الجدول (16) لهرمون الثايروكسين يلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى بتسجيلها قيمة بلغت 7.35±0.25 نانومول/لتر، ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمة بلغت 7.20±0.20 نانومول/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمة بلغت 5.83±0.17 نانومول/لتر ويعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى لتوليفة العزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة ونتج عنه أداء أفضل لهرمونات الغدة الدرقية دون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين التخفيفين المذكورين لمعاملات المعزز الحيوي الأخرى للمعايير المدروسة.

4-9- أنزيمات الكبد

4-9-1- أنزيم ناقل أمين الاسبارتيت AST

يبين الجدول (17) نتائج التحليل الإحصائي لأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت إذ أظهرت تلك النتائج وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) إذ تفوقت معاملة المقارنة A على جميع المعاملات التجريبية بتسجيلها أعلى قيمة لأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت بلغت 58.72±0.40 وحدة دولية/لتر، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملة المقارنة B بقيمتها البالغة 54.51±0.95 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 49.71±1.59 و57.71±1.47 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 53.00±1.50 و56.65±1.64 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 59.41±1.00 و51.87±0.78 وحدة دولية/لتر للتخفيفن 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون وجود أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين تلك المعاملات.أما اقل قيمة لهذا المعيار فقد كانت لمعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 48.07±1.43 و49.51±0.60 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 50.71±1.57 و42.74±1.16 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 49.11±1.00 و49.78±0.27 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 49.81±0.50 و48.82±1.67 وحدة دولية/لتر للتخفيفن 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون وجود أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين تلك المعاملات.

4-9-2- أنزيم ناقل أمين الالانين ALT

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (17) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لأنزيم ناقل أمين الالانين إذ سجلت أعلى قيمة له في معاملة المقارنة A التي بلغت 19.95±0.85 وحدة دولية/لتر، وتلتها معاملة المقارنة B بقيمتها التي بلغت 17.45±0.95 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 18.17±0.87 و18.00±0.80 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 17.31±0.71 و18.50±1.05 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 19.18±0.26 و18.05±0.35 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 17.70±1.80 و18.00±0.20 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت

قيمتان بلغتا 17.78±1.72 و18.04±1.60 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 19.66±0.65 و18.00±0.19 وحدة دولية/لتر للتخفيفن 10^{-6} و10^{-7} على التوالي دون وجود أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين تلك المعاملات. أما أقل قيمة لهذا المعيار فقد كانت معاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 18.59±1.18 و14.84±0.73 وحدة دولية/لتر.

4-9-3- أنزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP

أظهر أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الجدول (17) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات التجربة فكانت أعلى قيمة معنوية ($p\leq0.05$) مسجلة تعود إلى معاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت أعلى قيمتان له بلغتا 56.29±0.83 و51.05±0.78 وحدة دولية/لتر، في حين جاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 52.96±0.45 و48.80±0.73 وحدة دولية/لتر، وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الأولى إذ تلتها وسجلت قيمتان بلغتا 49.19±1.17 و52.52±2.40 وحدة دولية/لتر للتخفيفن 10^{-6} و10^{-7}.كما تلتها معاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 43.94±1.39 و51.70±1.09 وحدة دولية/لتر، وجاءت من بعدها معاملة المقارنة A التي سجلت قيمة بلغت 46.45±1.05 وحدة دولية/لتر، وافترقت عنها معاملة المقارنة B إذ تلتها وسجلت قيمة بلغت 45.16±0.83 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 50.05±0.14 و39.24±0.89 وحدة دولية/لتر ولكلا التخفيفن المذكورين، في حين جاءت بالترتيب الأخير معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 39.78±0.73 و39.43±0.79 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 39.91±0.49 و42.15±1.40 وحدة دولية/لتر دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما.

جدول (17) أنزيمات الكبد المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

المعاملات		أنزيم ناقل أمين الاسبارتيت (AST) (وحدة دولية/لتر)	أنزيم ناقل أمين الالانين (ALT) (وحدة دولية/لتر)	أنزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) (وحدة دولية/لتر)
معاملة السيطرة A		0.40±58.72 a	0.85±19.95 a	1.05±46.45 de
معاملة السيطرة B		0.95±54.51 b	0.95±17.45 ab	0.83±45.16 e
المعزز الحيوي 1	10^{-6}	1.43±48.07	0.87±18.17	1.17±49.19
	10^{-7}	0.60±49.51 c	0.80±18.00 ab	2.40±52.52 bc
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	1.57±50.71*	0.71±17.31	1.39±43.94
	10^{-7}	1.16±42.74 c	1.05±18.50 ab	1.09±51.70* cd
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	1.59±49.71	0.26±19.18	0.73±39.78
	10^{-7}	1.47±57.71* b	0.35±18.05 ab	0.79±39.43 f
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	1.50±53.00	1.80±17.70	0.14±50.05*
	10^{-7}	1.64±56.65 b	0.20±18.00 ab	0.89±39.24 e
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	1.00±49.11	1.72±17.78	0.49±39.91
	10^{-7}	0.27±49.78 c	1.60±18.04 ab	1.40±42.15 f
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.50±49.81	0.65±19.66	0.45±52.96*
	10^{-7}	1.67±48.82 c	0.19±18.00 ab	0.73±48.80 b
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	1.00±59.41*	1.18±18.59	0.83±56.29*
	10^{-7}	0.78±51.87 b	0.73±14.84 b	0.78±51.05 a
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan,1955)

يلاحظ من خلال استعراض النتائج في الجدول (17) أن معاملة المقارنة قد تفوقت معنوياً جميع المعاملات التجريبية وسجلت أعلى قيمة لأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت وأنزيم ناقل أمين الالانين وأن القيم المسجلة لجميع المعاملات التجريبية كانت ضمن الحدود الطبيعية للأنزيمين المذكورين إذ ذكر Peyghan وآخرون (2008) أن النسب الطبيعية لأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت 43–63 وحدة دولية/لتر ولأنزيم ناقل أمين الالانين 15–21 وحدة دولية/لتر في مصل دم أسماك الكارب الشائع.أما بخصوص أنزيم الفوسفاتيز القاعدي فنجد أعلى قيمة له كانت لصالح معاملة المعزز الحيوي السابعة ومن بعدها السادسة وثم معاملة المعزز الحيوي الأولى ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الثانية وربما يرجح سبب ارتفاع مستواه في دم أسماك تلك المعاملات إلى ما أشار إليه welker and Lim (2011) إن زيادة فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي ما هي إلا انعكاس عن التغييرات الحاصلة في طبقة غشاء حدود الفرشاة المبطن لسطح الخلايا المعوية داخل القناة الهضمية الذي هو عبارة عن تركيبة من البروتينات التركيبية الوظيفية المتداخلة مع طبقة دهنية مزدوجة وتعد الموقع الأساسي المسؤول عن المراحل النهائية للهضم والامتصاص(Crane,1968)، وبحسب رأي Gawlicka وآخرون(2000) و German وآخرون (2004) إن زيادة أنزيمات طبقة حدود الفرشاة وفعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي ناتجة عن زيادة امتصاص العناصر الغذائية كالكاربوهيدرات أو الدهون.كما أشار Rawls وآخرون (2004) إن فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي قد تكون مرتبطة بالمناعة في الأسماك لكن تأثيره غير مفهوم لحد الان.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة من معاملات المعزز الحيوي مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB لأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الثانية إذ سجلت للتخفيف المذكور قيمة بلغت 50.71±1.57 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي السابعة بتسجيلها القيمة بلغت 59.41±1.00 وحدة دولية/لتر، أما معاملة المعزز الحيوي الثالثة فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-7} إذ سجلت قيمة بلغت 57.71±1.47 وحدة دولية/لتر في حين لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملات الأولى والرابعة والخامسة والسادسة على التوالي. أما بخصوص الفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لأنزيم ناقل أمين الألانين فلم يسجل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بين التخفيفين المذكورين لجميع معاملات المعزز الحيوي. كما يلاحظ أيضا تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي لمعاملة المعزز الحيوي الرابعة إذ سجلت قيمة بلغت 50.05±0.14 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمة بلغت 52.96±0.45 وحدة دولية/لتر ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي

سجلت قيمة بلغت 56.29±0.83 وحدة دولية/لتر على التوالي. أما التخفيف 10^{-7} فقد تفوق معنوياً على التخفيف 10^{-6} للمعيار المذكور إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الثانية قيمة بلغت 51.70±1.09 وحدة دولية/لتر في حين لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لمعاملات الأولى والثالثة والخامسة على التوالي، ويعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى لتوليفة العزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة ونتج عنهُ فعالية أكبر لتلك الأنزيمات.أما بخصوص تفوق التخفيف 10^{-7} لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة لأنزيم ناقل أمين الاسبارتيت ربما يعلل سبب ذلك إلى احتمالية تكرار البيئة البكتيرية داخل القناة الهضمية للأسماك للتخفيف 10^{-6} على عكس التخفيف 10^{-7} مما يخلق حالة من التنافس بين بكتيريا نفس النوع نتج عنه أداء أقل لأسماك هذه المعاملة لهذا المعيار، أو ربما يعود السبب إلى عوامل خاصة بنفس مجموعة أسماك المعاملة من إختلافات فردية أو قابلية وراثية أو حالة توازن الأحياء المجهرية داخل القناة الهضمية لتلك الأسماك وغيرها.

4-10- أداء الدم لأسماك التجربة

من خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي لأداء الدم لأسماك التجربة في الجدول (18) يلاحظ وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لمعيار أداء الدم إذ سجلت أعلى قيمتان له في معاملة المعزز الحيوي السابعة بلغتا 13.42±0.24 و 12.98±0.15ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 13.29±0.32 و12.71±0.24 للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملة المعزز الحيوي الخامسة بتسجيلها قيمتان بلغتا 12.34±0.07 و12.08±0.01، تلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها قيمتان بلغتا 12.28±0.27 و11.84±0.01 ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 12.07±0.14 و11.68±0.00 ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 12.37±0.09 و11.77±0.02 ومعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 11.82±0.01 و11.63±0.06 ولكلا للتخفيفين المذكورين على التوالي، وتلتها معاملة المقارنة B بقيمتها التي بلغت 11.43±0.006 أما أقل قيمة مسجلة فتعود لمعاملة المقارنة A والتي سجلت قيمة بلغت 11.04±0.18.

يعد أداء الدم في الأسماك أكثر موثوقية ودقة لمراقبة صحة الأسماك ونموها لأن أي معيار مفرد من معايير الدم لا يمكن الإعتماد عليه بدرجة كافية كمؤشر حيوي لصحة الأسماك ونموها وأن المدى

الطبيعي لهذا المعيار لدراسات بعدد عينات 441 وبمتوسط 14.43 عينة تراوحت ما بين 10.68-18.24 ويلاحظ من الجدول (18) أن قيم أداء الدم لأسماك التجربة هي ضمن هذا المدى وتشير قيم أداء الدم المستحصلة خلال هذه الدراسة إلى أن أنسجة الجسم كانت مؤكسجة جيدًا بسبب زيادة مستوى خلايا الدم الحمر والهيموغلوبين ومكداس الدم فيها فضلاً عن تحسن وظيفة الجهاز المناعي في الأسماك من جراء إرتفاع مستويات خلايا الدم البيض والبروتين الكلي لمصل الدم في الأسماك إذ تفسر هذه العوامل العلاقة الإيجابية القوية بين النمو والمناعة وأداء الدم للأسماك (Esmaeili,2021).

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة من معاملات المعزز الحيوي مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB لمعيار أداء الدم فيلاحظ تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى إذ سجلت للتخفيف المذكور قيمة بلغت 11.82±0.01 ولمعاملة المعزز الحيوي الثانية قيمة بلغت 12.37±0.09 ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمة بلغت 12.07±0.14 ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمة بلغت 12.28±0.27 على التوالي في حين لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين للمعاملات الخامسة والسادسة والسابعة على التوالي ، ويعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى للعزلات البكتيرية على أسماك معاملات المعزز الحيوي المذكورة ونتج عنها أداء دم أفضل.

جدول (18) أداء الدم المدروس (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

المعاملات		خلايا الدم الحمر (10^6/ملم^3)	الهيموغلوبين (غم/100 مل)	مكداس الدم (%)	خلايا الدم البيض (10^3/ملم^3)	بروتينات بلازما الدم الكلية (غم/100 مل)	أداء الدم
معاملة السيطرة A		0.06±0.93 c	0.65±6.65 d	1.15±19.15 d	0.86±204.86 e	0.10±2.60 cd	0.18±11.04 e
معاملة السيطرة B		0.01±1.11 bc	0.45±7.05 cd	1.05±20.06 d	1.02±204.02 e	0.04±2.94 d	0.006±11.43 d
المعزز الحيوي 1	10^{-6}	0.03±1.27*	0.05±7.05	0.79±23.70	0.27±207.82	0.20±3.10	0.01±11.82*
	10^{-7}	0.04±1.16 bc	0.40±7.31 cd	0.56±23.10 c	0.34±207.05 d	0.05±2.85 cd	0.06±11.63 cd
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.05±1.63*	0.58±8.60*	0.35±24.96	0.43±208.67	0.25±3.25	0.09±12.37*
	10^{-7}	0.03±1.31 b	0.47±7.58 abc	0.42±23.57 bc	0.40±207.90 bcd	0.20±2.70 cd	0.02±11.77 bc
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.13±1.38*	0.13±7.78	0.03±24.06	0.95±208.19*	0.20±3.30*	0.14±12.07*
	10^{-7}	0.035±1.16 bc	0.01±7.10 bcd	0.50±23.26 c	0.33±206.83 cd	0.005±2.99 c	0.00±11.68 bc
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.14±1.40*	0.73±8.34	1.38±23.04	0.21±208.78	0.08±4.02	0.27±12.28*
	10^{-7}	0.10±1.10 bc	0.26±7.76 abc	0.97±21.88 c	0.87±209.06 bcd	0.25±3.65 b	0.01±11.84 bc
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.06±1.37*	0.36±8.26	0.33±22.98*	0.50±209.99	0.26±4.24	0.07±12.34
	10^{-7}	0.04±1.22 bc	0.15±7.87 abc	1.34±22.10 c	1.78±209.96 ab	0.10±4.10 b	0.01±12.08 b
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.35±2.36	0.84±8.93*	1.97±27.02	0.70±211.30*	0.07±5.02	0.32±13.29
	10^{-7}	0.27±1.83 a	0.21±7.81 ab	0.85±25.95 ab	0.71±208.29 abc	0.40±4.40 a	0.24±12.71 a
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.39±2.45	0.45±9.55*	0.66±28.42	1.83±214.05*	0.09±5.11	0.24±13.42
	10^{-7}	0.36±2.07 a	0.14±8.26 a	0.55±26.50 a	1.18±209.18 a	0.005±4.99 a	0.15±12.98 a
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

4 -11- المعايير النسيجية الشكلية

4-11-1- سمك الطبقة المخاطية

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (19) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لسمك الطبقة المخاطية إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً بتسجيلها أعلى قيمتان للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لهذا المعيار بلغتا 822.50±2.50 و787.50±2.50 مايكرومتر،وجاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 687.50±0.00 و648.12±0.62 مايكرومتر، كما جاءت معاملة المعزز الحيوي الرابعة من بعدها بتسجيلها قيمتان بلغتا 615.00±2.50 و595.00±2.50 مايكرومتر، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 605.00±2.50 و586.87±0.62 مايكرومتر ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 596.87±0.62 و592.50±3.75 مايكرومتر، كما تلتها معاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 576.25±2.50 و555.00±1.25 مايكرومتر ومن بعدها جاءت معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 543.00±1.00 و524.50±2.00 مايكرومتر. كما تلتهما معاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 440.00±5.00 مايكرومتر، أما اقل قيمة مسجلة لهذا المعيار تعود إلى معاملة المقارنة A التي سجلت قيمة بلغت 391.25±1.25 مايكرومتر.

4-11-2- سمك الطبقة تحت المخاطية

يلاحظ من استعراض النتائج في الجدول (19) لسمك الطبقة تحت المخاطية وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً بتسجيلها أعلى قيمتان للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لهذا المعيار بلغتا 126.00±0.00 و120.25±0.75 مايكرومتر، وجاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 107.50±1.25 و101.50±0.05 مايكرومتر، كما جاءت معاملة المعزز الحيوي الخامسة من بعدها بتسجيلها قيمتان بلغتا 97.25±0.25 و90.75±0.25 مايكرومتر، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 92.50±0.00 و84.50±0.50 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة بتسجيلها قيمتان بلغتا 88.75±0.75 و85.25±0.25 مايكرومتر، وجاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثانية بتسجيلها قيمتان بلغتا 88.00±1.00 و82.75±0.25 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 80.37±1.12 و75.25±1.75، أما معاملة المقارنة B فقد افترقت

عن معاملات المعزز الحيوي المذكورة وتلتها بتسجيلها قيمة بلغت 73.37±0.12 مايكرومتر، في حين سجلت معاملة المقارنة A اقل قيمة لسمك الطبقة تحت المخاطية بلغت 61.87±0.62 مايكرومتر.

4-11-3- سمك الطبقة العضلية

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول(19) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لسمك الطبقة العضلية إذ سجلت أعلى قيمتان لها للتخفيفان 10^{-6} و10^{-7} في معاملة المعزز الحيوي السابعة إذ بلغتا 186.25±1.25 و183.12±0.62 مايكرومتر، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 177.50±0.00 و165.00±2.50 مايكرومتر، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 155.00±2.50 و148.75±0.25 مايكرومتر. في حين جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 148.50±0.50 و143.50±0.50 مايكرومتر ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 145.75±0.25 و142.25±0.25 مايكرومتر دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما. أما معاملتي المعزز الحيوي الأولى والثالثة فقد افترقتا معنوياً ($p\leq0.05$) عن باقي معاملات المعزز الحيوي إلا أنهما لم تسجلا أي فارق معنوي بينهما إذ سجلت الأولى قيمتان بلغتا 140.50±0.50 و136.25±1.25 مايكرومتر والثالثة سجلت قيمتان بلغتا 142.50±0.00 و137.00±0.50 مايكرومتر. كما افترقت معاملة المقارنة B ($p\leq0.05$) عن جميع معاملات المعزز الحيوي إذ تلتها وسجلت قيمة بلغت 127.50±2.50 مايكرومتر، كما سجلت أدنى قيمة لهذا المعيار لمعاملة المقارنة A بلغت 116.25±1.25 مايكرومتر.

4-11-4- سمك الطبقة المصلية

يبين الجدول (19) نتائج التحليل الإحصائي لسمك الطبقة المصلية إذ أظهرت تلك النتائج وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً على جميع معاملات المعزز الحيوي بتسجيلها للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 66.50±1.50 و61.50±1.50 مايكرومتر، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 59.25±0.75 و56.25±0.00، وتلتها معاملتي المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 50.75±0.25 و49.00±0.50 مايكرومتر ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 54.50±0.50 و42.50±0.00 مايكرومتر دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما. كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان

بلغتا 48.75±0.25 و44.00±0.00 مايكرومتر ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 47.00±0.00 و44.25±0.75 مايكرومتر دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما، وتلتهما معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 40.00±1.00 و36.62±0.62 مايكرومتر ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7}، كما افترقت معاملة المقارنة B معنوياً ($p\leq0.05$) عن جميع معاملات المعزز الحيوي إذ تلتها وسجلت قيمة بلغت 33.75±1.25 مايكرومتر، وسجلت أدنى قيمة لهذا المعيار لمعاملة المقارنة A بلغت 25.62±0.62 مايكرومتر.

4-11-5- عدد الخلايا الكأسية

أظهر معيار عدد الخلايا الكأسية في الجدول(19) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية فكانت أعلى قيمتان معنويتان ($p\leq0.05$) مسجلتان تعودان إلى معاملة المعزز الحيوي السابعة إذ بلغتا 56.50±0.50 و55.00±1.00 خلية/100 مايكرومتر للتخفيفن 10^{-6} و10^{-7} وجاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 55.25±0.25 و52.25±0.25 خلية /100 مايكرومتر، وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 46.00±1.00 و37.00±0.00 خلية/100 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 39.00±0.00 و37.25±0.75 خلية/100 مايكرومتر، كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 35.37±0.12 و27.00±0.50 خلية/100 مايكرومتر ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 33.25±0.75 و31.50±1.50 خلية /100 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة بتسجيلها قيمتان بلغتا 27.50±0.00 و26.50±0.50 خلية/100 مايكرومتر، كما افترقت عنها معاملة المقارنة B ($p\leq0.05$) عن جميع معاملات المعزز الحيوي إذ تلتها وسجلت قيمة بلغت 25.25±0.25 خلية /100 مايكرومتر، وسجلت أدنى قيمة لهذا المعيار لمعاملة المقارنة A بلغت 18.75±0.00 خلية/100 مايكرومتر.

4-11-6- عدد الزغابات الدقيقة

يتضح من خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (19) وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً على جميع معاملات المعزز الحيوي بتسجيلها للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 13.75±0.00 و12.37±0.62 زغابة، كما جاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 12.25±1.00

و11.75±0.00 زغابة، وافترقت عنها معاملة المعزز الخامسة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 12.50±0.25 و10.00±0.00 زغابة وتلتها معاملة الحيوي الرابعة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 11.25±0.00 و10.37±0.37 زغابة، كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 9.25±0.00 و8.37±0.12 زغابة وتلتها معاملة الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 7.50±0.00 و7.00±0.50 زغابة، وجاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 5.75±0.25 و4.75±0.25 زغابة، كما افترقتا معاملتي المقارنة A وB ($p\leq0.05$) عن جميع معاملات المعزز الحيوي إذ سجلت معاملة المقارنة معاملة المقارنة A أدنى قيم لهذا المعيار بلغت 2.87±0.12 زغابة وسجلت معاملة المقارنة B قيمة بلغت 3.62±0.12 زغابة دون تسجيل أي فارق معنوي بينهما.

4-11-7- طول الزغابات

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (19) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لطول الزغابات إذ حققت معاملة المعزز الحيوي السابعة اعلى قيمتان للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} بلغتا 722.50±0.00 و718.12±3.12 مايكرومتر، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت لهذا المعيار قيمتان بلغتا 610.00±1.25 و586.25±1.25 مايكرومتر، وافترقت عنها معاملة المعزز الخامسة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 540.62±1.87 و526.87±0.62 مايكرومتر وتلتها معاملة الحيوي الرابعة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 535.00±2.50 و513.12±1.87 مايكرومتر، وافترقت عنها معاملة المعزز الثالثة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 517.50±0.00 و513.12±4.37 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 495.00±1.25 و480.62±0.87 مايكرومتر وتلتها معاملة الأولى الحيوي التي سجلت قيمتان بلغتا 473.12±1.87 و450.00±2.50 مايكرومتر، كما افترقت معاملة المقارنة B معنوياً ($p\leq0.05$) عن جميع معاملات المعزز الحيوي إذ سجلت قيمة لهذا المعيار بلغت 348.75±1.25 مايكرومتر، أما معاملة المقارنة A فسجلت أدنى قيمة لهذا المعيار بلغت 318.75±1.25 مايكرومتر.

4-11-8- عرض الزغابات

أظهر معيار سمك الزغابات في الجدول(19) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية فكانت أعلى قيمتان للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} تعودان إلى معاملة المعزز الحيوي السابعة إذ

بلغتا 215.00±0.00 و205.00±0.00 مايكرومتر وجاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 196.25±1.25 و194.25±1.25 مايكرومتر وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الخامسة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 191.00±0.50 و189.37±0.62 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 188.00±1.00 و181.50±1.00 مايكرومتر، كما جاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 182.50±0.00 و178.12±0.62 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 173.12±0.62 و166.25±1.25 مايكرومتر وتلتها معاملة المعزز الحيوي الثالثة بتسجيلها قيمتان بلغتا 167.75±1.75 و161.25±0.75 مايكرومتر، كما افترقت معاملة المقارنة Bمعنوياً ($p\leq0.05$) عن جميع معاملات المعزز الحيوي إذ تلتها وسجلت قيمة بلغت 158.75±1.25 مايكرومتر وسجلت أدنى قيمة لهذا المعيار لمعاملة المقارنة A بلغت 137.50±0.00 مايكرومتر.

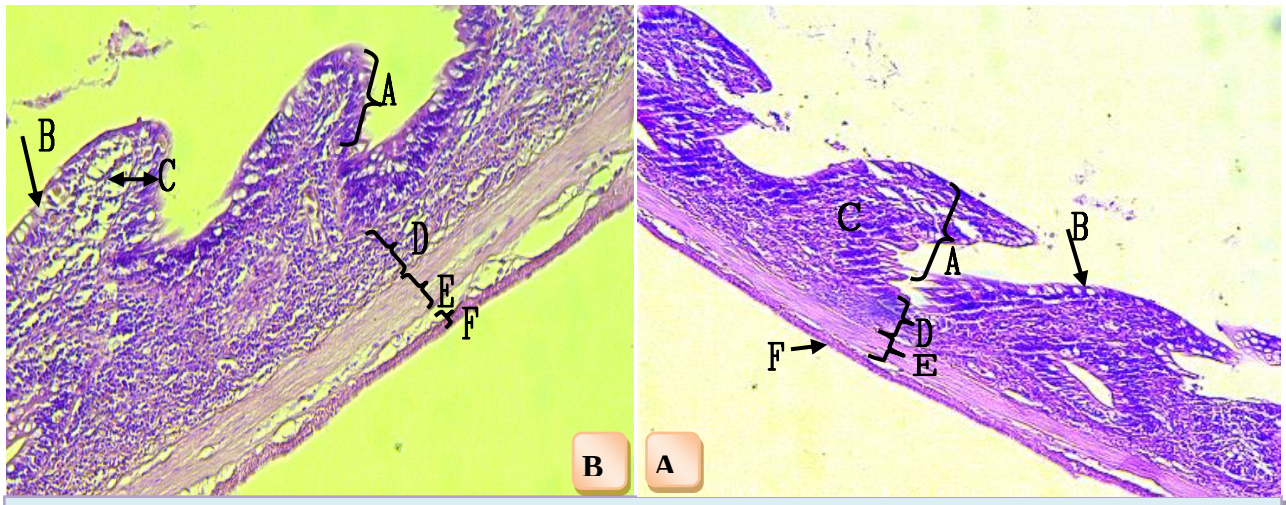
وتبين الصور2،3،4،5،6،7،8،9،10 المعايير النسيجية الشكلية لمقطع عرضي من القناة المعوية لأسماك الكارب الشائع للمعاملات التجريبية.

جدول (19) المعايير النسيجية الشكلية المدروسة (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

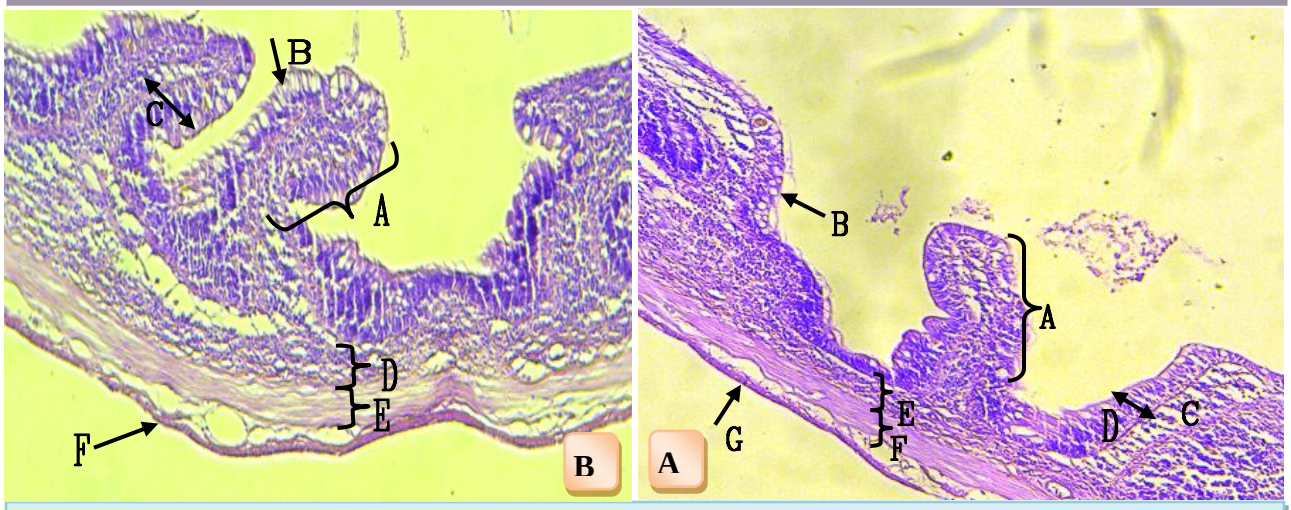
المعاملات		سمك الطبقة المخاطية (مايكرومتر)	سمك الطبقة تحت المخاطية (مايكرومتر)	سمك الطبقة العضلية (مايكرومتر)	سمك الطبقة المصلية (مايكرومتر)	عدد الخلايا الكأسية (خلية/100 مايكرومتر)	عدد الزغابات في المقطع الواحد	طول الزغابات (مايكرومتر)	عرض الزغابات (مايكرومتر)
معاملة السيطرة A		1.25±391.25 h	0.62±61.87 h	1.25±116.25 g	0.62±25.62 g	0.00±18.75 h	0.12±2.87 g	1.25±318.75 i	0.00±137.50 i
معاملة السيطرة B		5.00±440.00 g	0.12±73.37 g	2.50±127.50 f	1.25±33.75 f	0.25±25.25 g	0.12±3.62 g	1.25±348.75 h	1.25±158.75 h
المعزز الحيوي 1	10^{-6}	1.00±543.00 2.00±524.50 f	1.12±80.37 1.75±75.25 f	0.50±140.50 1.25±136.25 e	1.00±40.00* 0.62±36.62 e	0.12±35.37* 0.50±27.00 e	0.25±5.75* 0.25±4.75 f	1.87±473.12 2.50±450.00 g	0.62±173.12* 1.25±166.25 f
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	2.50±576.25 1.25±555.00 e	1.00±88.00 0.25±82.75 e	0.25±145.75 0.25±142.25 d	0.00±47.00 0.75±44.25 d	0.75±33.25 1.50±31.50 e	0.00±9.25* 0.12±8.37 d	1.25±495.00 0.87±480.62 f	0.00±182.50 0.62±178.12 e
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.62±596.87 3.75±592.50 d	0.00±92.50 0.50±84.50 d	0.00±142.50 0.50±137.00 e	0.50±54.50* 0.00±42.50 c	0.00±27.50 0.50±26.50 f	0.00±7.50 0.50±7.00 e	0.00±517.50 4.37±513.12 e	1.75±167.75 0.75±161.25 g
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	2.50±615.00 2.50±595.00 c	0.75±88.75 0.25±85.25 de	0.50±148.50 0.50±143.50 d	0.25±48.75 0.00±44.00 d	0.00±39.00 0.75±37.25 d	0.00±11.25 0.37±10.37 c	2.50±535.00 1.87±513.12 d	1.00±188.00 1.00±181.50 d
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	2.50±605.00 0.62±586.87 d	0.25±97.25 0.25±90.75 c	2.50±155.00 0.25±148.75 c	0.25±50.75 0.50±49.00 c	1.00±46.00* 0.00±37.00 c	0.25±12.50* 0.00±10.00 bc	1.87±540.62 0.62±526.87 c	0.50±191.00 0.62±189.37 c
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.00±687.50 0.62±648.12 b	1.25±107.50 0.05±101.50 b	0.00±177.50 2.50±165.00 b	0.75±59.25 0.00±56.25 b	0.25±55.25 0.25±52.25 b	1.00±12.25 0.00±11.75 b	1.25±610.00 1.25±586.25 b	1.25±196.25 1.25±194.25 b
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	2.50±822.50 2.50±787.50 a	0.00±126.00 0.75±120.25 a	1.25±186.25 0.62±183.12 a	1.50±66.50 1.50±61.50 a	0.50±56.50 1.00±55.00 a	0.00±13.75* 0.62±12.37 a	0.00±722.50 3.12±718.12 a	0.00±215.00 0.00±205.00 a
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

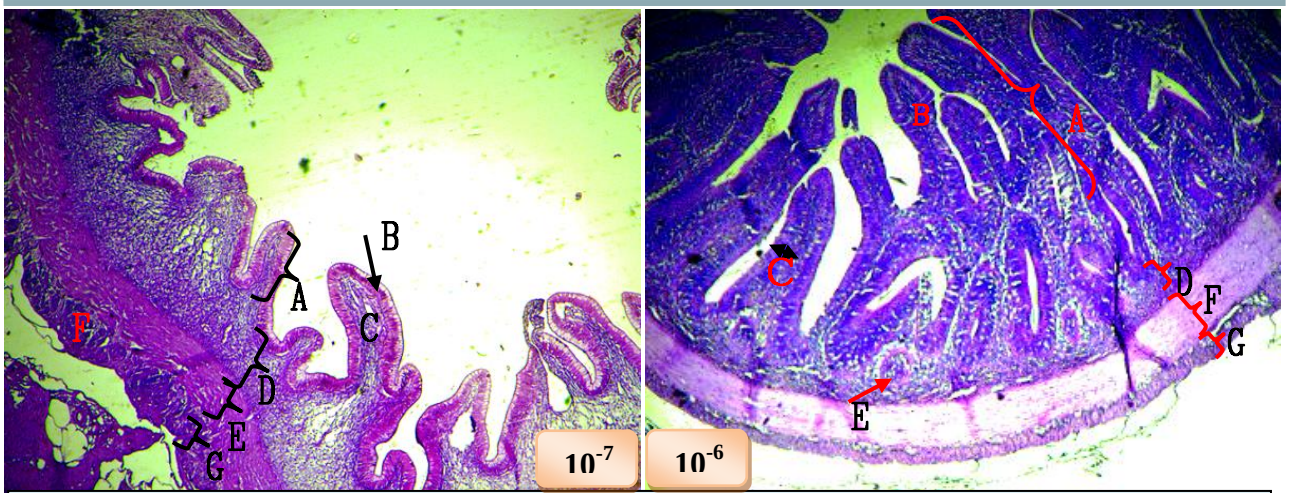
* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)



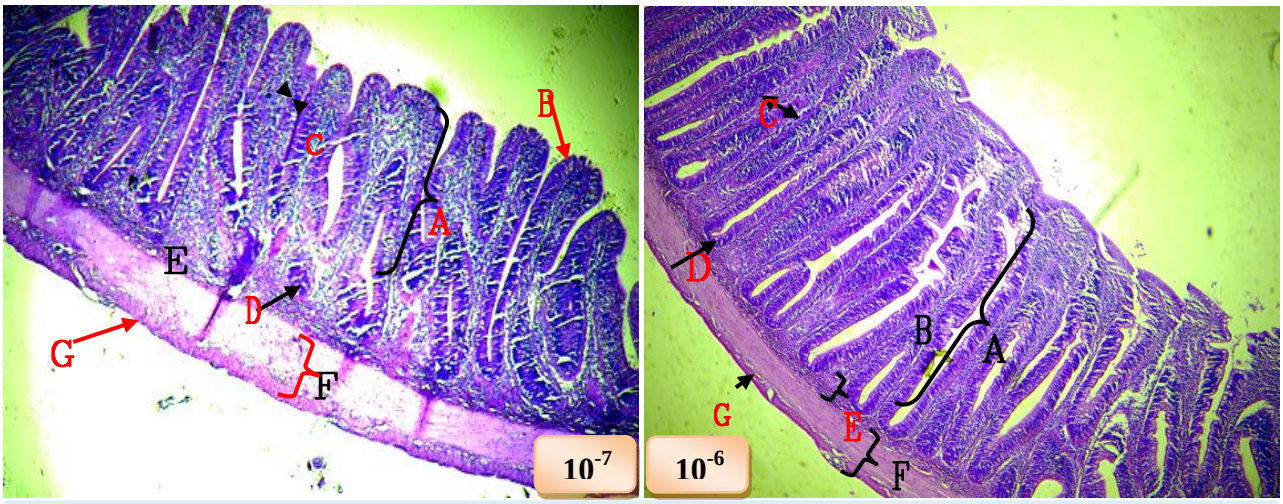
صورة (2): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المقارنة A يلاحظ: الزغابات قصيرة (A), الخلايا الكأسية قليلة العدد (B)، الصفيحة الحقيقية (C)، تحت المخاطية (D)، العضلية (E)، المصلية (F)، H&E 100



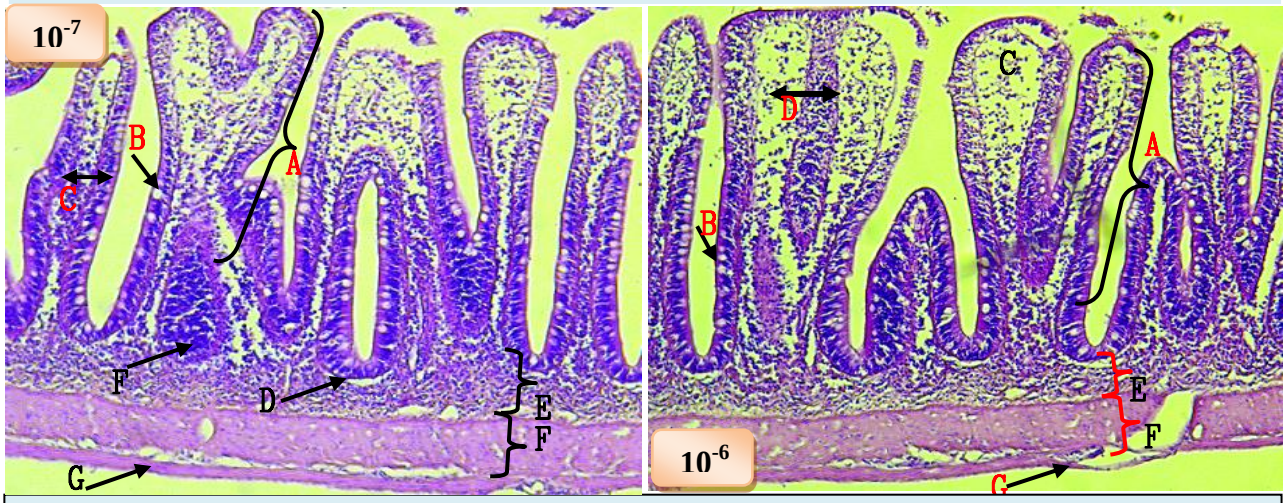
شكل (3): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المقارنة B نلاحظ: الزغابات أطول من المجموعة الأولى لكن اقصر من بقية المجاميع (A),الخلايا الكاسية قليلة العدد لكن أكثر من الأولى (B)، الصفيحة الحقيقية (C)، المخاطية (D)، تحت المخاطية (E)،العضلية (F)، المصلية (G)، H&E 100



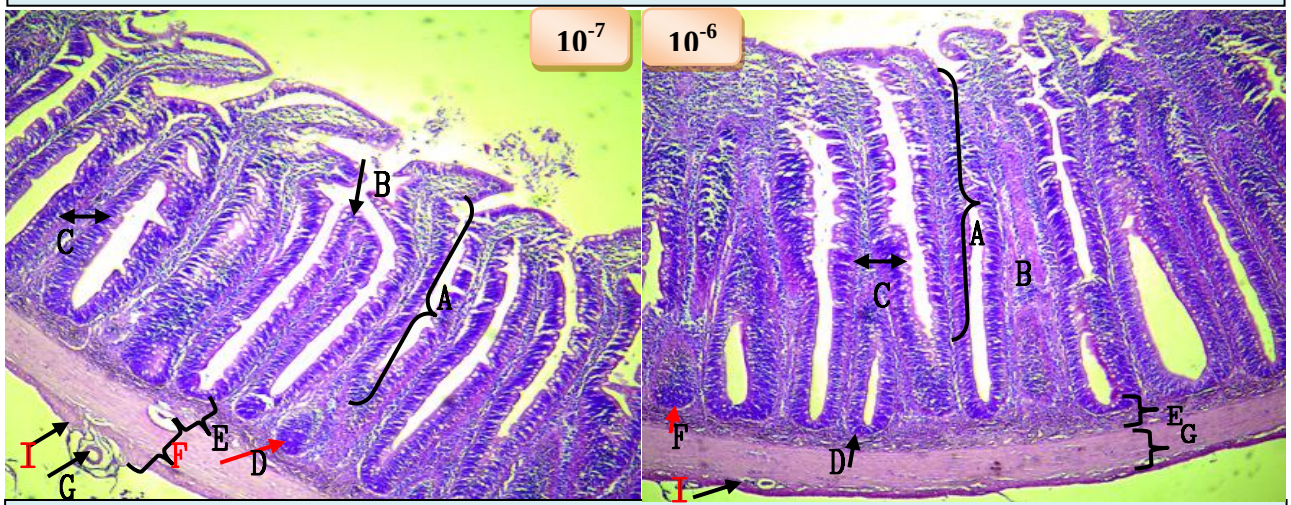
شكل (4): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الأولى يلاحظ: الزغابات كثيرة العدد ومتوسطة الطول (A), الصفيحة الحقيقية (B)، المخاطية (C)، تحت المخاطية (D)، الخبايا (E)،العضلية الخارجية (F)، عضلية داخلية (G)، H&E 100



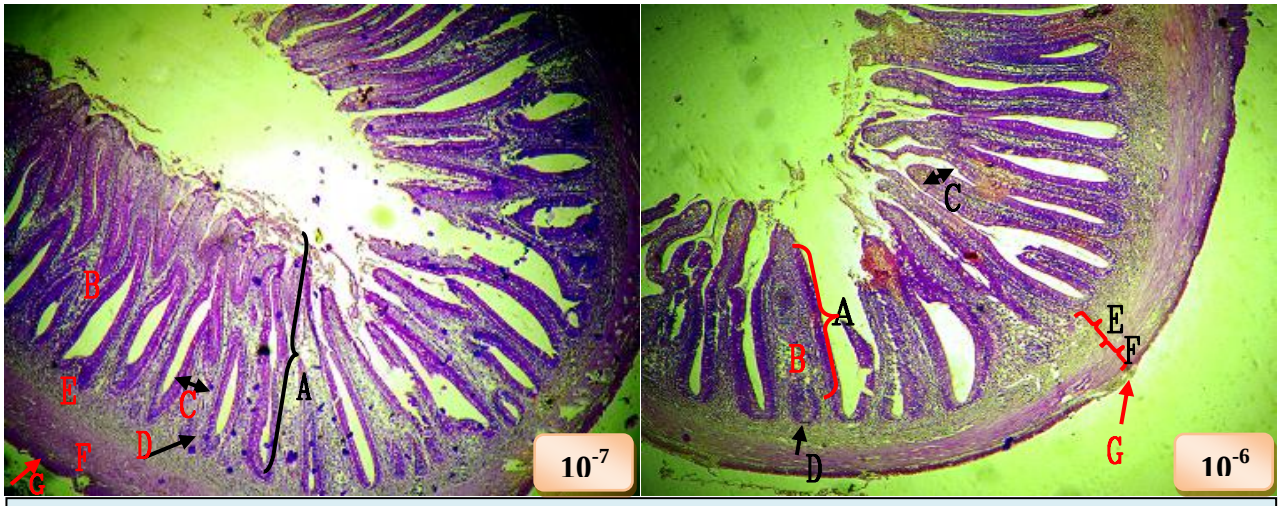
شكل (5): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الثانية يلاحظ : زيادة في طول وعرض الزغابات وبعض الزغابات متداخلة فيما بينها وتحتوي عدد كبير من الخلايا الكاسية (A)، الصفيحة الحقيقية (B)، المخاطية (C)، نسيج لمفاوي (D)، تحت المخاطية (E)، العضلية (F)، المصلية (G)، H&E 100



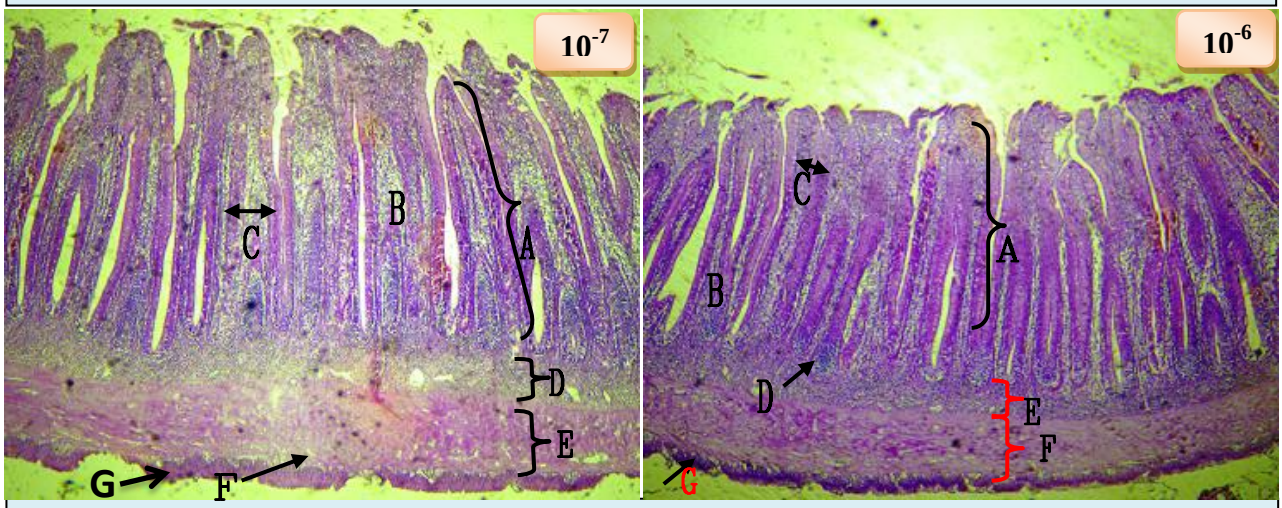
شكل (6): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة يلاحظ: الزغابات طويلة وبعضها متوسط الطول ومتفرع (A), كثافة الخلايا الكاسية (B)،الصفيحة الحقيقية (C)،الطبقة المخاطية (D)، تحت المخاطية (E)، العضلية (F)، المصلية (G)، H&E 100



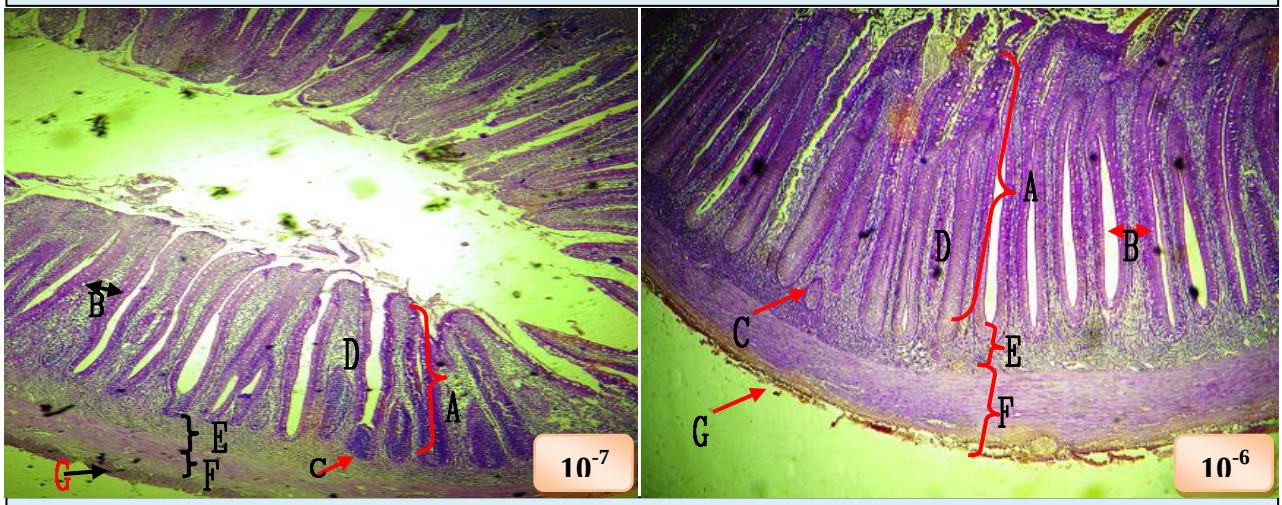
شكل (7): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الرابعة يلاحظ: الزغابات طويلة وعريضة وتحتوي على عدد كبير من الخلايا الكاسية (A), الصفيحة الحقيقية (B)، الطبقة المخاطية (C)، الخبايا (D)، تحت المخاطية (E)، العضلية (G)، المصلية (I)، H&E 100



شكل (8): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي الخامسة يلاحظ: الزغابات طويلة جدا وتحتوي عدد كبير من الخلايا الكاسية (A), الصفيحة الحقيقية (B)، الطبقة المخاطية (C)، الخبايا (D)، تحت المخاطية (E)، العضلية (F)، المصلية (G)، H&E 100



شكل (9): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي السادسة يلاحظ: الزغابات طويلة وعريضة (A), الصفيحة الحقيقية (B)، الطبقة المخاطية (C)، الخبايا (D)، تحت المخاطية (E)، العضلية (F)، المصلية (G)، H&E 100



شكل (10): مقطع عرضي للأمعاء في سمكة الكارب الشائع لمعاملة المعزز الحيوي السابعة يلاحظ: الزغابات طويلة وتحتوي عدد كبير من الخلايا الكاسية (A), الطبقة المخاطية (B)، خبايا لايبركان (C)، الصفيحة الحقيقية (D)، تحت المخاطية (E)، العضلية (F)، البرانية أو الخارجية (G)، H&E 100

يتكون جدار القناة المعوية في أسماك الكارب الشائع من أربع طبقات هي الطبقة الظهارية التي تتكون من نسيج ظهاري عمودي بسيط مع خلايا كأسية والطبقة تحت المخاطية التي تضم نسيج ضام رخو والصفيحة الحقيقية وخبايا ليبركون والطبقة العضلية التي تتكون من ألياف عضلية ملساء والطبقة المصلية التي تكون بشكل غطاء خارجي للقناة المعوية (Yassine وآخرون،2021). يتبين من خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (19) أن استعمال جميع معاملات المعزز الحيوي أثرت بشكل ايجابي واضح في القناة المعوية لأسماك تلك المعاملات طبقاً لعدد من الاختلافات في القياسات النسيجية لمنطقة الطيات المعوية داخل القناة الهضمية إذ أن معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية الثلاث كالسابعة تصدرت جميع معاملات المعزز الحيوي لجميع القياسات النسيجية الشكلية للقناة المعوية لأسماك التجربة ومعاملات المعزز الحيوي ذات العزلتين البكتيريتين كالسادسة التي تلت المعاملة السابعة وتفوقت معنوياً على معاملات المعزز الحيوي الأخرى تلتها الخامسة ثم الرابعة فضلاً عن معاملات المعزز الحيوي ذات العزلة البكتيرية المفردة كالثالثة التي تفوقت على الثانية والأولى لكن بوتيرة أقل من المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة والتي جميعها تفوقت معنوياً على معاملات المقارنة A وB إذ يلاحظ أن سمك جدار القناة المعوية بطبقاتها المختلفة في معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المتعددة لاسيما المعاملة السابعة والسادسة أكثر مما هي عليه في معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المفردة والتي يكون فيها سمك جدار القناة المعوية أكثر مما هي عليه في معاملتي المقارنة A وB ، كما ويلاحظ أيضا أن الطبقة المخاطية تتكون من نسيج ظهاري عمودي بسيط مع وجود الخلايا الكأسية والصفيحة الحقيقية وخبايا ليبركون وعدم ملاحظة الطبقة العضلية المخاطية صورة 2، وان الطبقة تحت المخاطية تتكون من نسيج رابط كثيف غير منتظم صورة 2–4 والطبقة العضلية الخارجية تتكون من طبقتين دائرية داخلية وطولية خارجية صورة 4. أما الطبقة المصلية فتكون بشكل طبقة رقيقة من النسيج الرابط الرخو صورة 3 وأن سمك كل هذه الطبقات يزداد في معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المتعددة وبالأخص المعاملة السابعة والسادسة ومن بعدها في معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المفردة كما مبين في الجدول (19). وربما يعزى السبب إلى أن المعززات الحيوية سالفة الذكر ربما التصقت واستوطنت بالطبقة المخاطية المعوية والطبقة الظهارية لأسماك تلك المعاملات بأعداد كبيرة وحسب ما مبين بالجدول (21) الخاص بالعد الكلي لمايكروبات القناة المعوية لأسماك التجربة إذ يلاحظ أنها تكاثرت وكونت مستوطنات كبيرة منها وبما أن العزلات البكتيرية الثلاث هي من مجموعة بكتيريا حامض اللبنيك فإنها

تستطيع إنتاج مجموعة من نواتج الايض الثانوية كالفيتامينات الضرورية للعديد من العمليات البيولوجية التي تحدث في جميع الكائنات الحية والتي تكون بشكل مجموعتين الأولى مجموعة الفيتامينات الذائبة في الدهون وتشمل فيتامينات A وD وE وK، والثانية مجموعة الفيتامينات الذائبة في الماء وتشمل فيتامين C ومجموعة فيتامينات B مثل الثايمين والرايبوفلافين والنياسين وحامض البانتوثنيك والبايرودوكسين والبايوتين وحامض الفوليك والكوبالامين (Leblanc وآخرون،2013)، كما تتصف بإنتاجها لمجموعة من الإنزيمات المايكروبية كإنزيم البروتييز والببتيديز واليوريز واللايبيز والاميليز والايستريز ومجموعة الإنزيمات المحللة للسكريات المتعددة (Tallapragada وآخرون،2018)، كما يمكنها أنتاج بعض الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة كحامض اللبنيك والخليك والبروبيونيك والبيوتريك (Lo Bianco وآخرون،2015 ; Hati وآخرون،2019) وبعض البكتريوسينات والمركبات المضادة للميكروبات الأخرى (Merrifield وآخرون،2010). وتعمل تلك المواد على إحداث تغييرات في تركيب القناة المعوية من سمك الطبقات المخاطية وتحت المخاطية والعضلية وزيادة عدد الزغابات وسمكها وزيادة كمية المخاط المبطن للظهارة المعوية وإقصاء البكتيريا الغريبة والمايكروبات الممرضة داخل القناة الهضمية وتحسين الوظيفة الوقائية للقناة الهضمية للأسماك (Merrifield وآخرون،2010) وزيادة مساحة سطح إمتصاص العناصر الغذائية المتاحة (Kristiansen وآخرون،2011).

كانت الزغابات في معاملتي المقارنة A وB قصيرة ونحيفة تشبه الخيوط مع خلايا كأسية محدودة العدد صورة 2 و3 كما أن طول وسمك وعدد الزغابات وعدد الخلايا الكأسية إزداد في معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المفردة وبشكل مضطرد بأتجاه معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المتعددة التي كانت الأكثر طولاً وسمكاً وعدداً للزغابات مع أكبر كثافة للخلايا الكأسية كما مبين في الجدول (19) والصور4-10، وربما يعزى السبب إلى أن المعززات الحيوية تحسن عملية الامتصاص (John وآخرون،2008) من خلال بعض التغييرات التي تحدثها على تركيبة أمعاء الأسماك كإستطالة الزغابات (Je وآخرون،2019) وزيادة ارتفاع الطيات المعوية (Yang وآخرون،2019)، أو ربما يعزى السبب للتأثير المركب للمعززات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة بجميع أشكالها سواء كان ذات العزلات البكتيرية المتعددة أو المفردة إذ أنها تعمل على زيادة كثافة الزغابات التي ينتج عنها ضيق في مناطق الإرتباط بين الخلايا المعوية وهذا الأمر يوفر حاجز فعال ضد المسببات المرضية من جهة ومن جهة أخرى فإن المعززات الحيوية تزيد من كثافة الزغابات

مع زيادة المتغيرات العددية في طولها وقطرها المشار إليها في الجدول (19) الذي ينتج عنه زيادة مساحة سطح الامتصاص داخل القناة الهضمية للأسماك (Standen وآخرون،2015) ، ويعزز ذلك التأثير ما ذكره Pirarat وآخرون(2011) إن استعمال بكتيريا المعزز الحيوي *Lactobacillus rhamnosus GG* في علائق أسماك البلطي النيلي نتج عنه زيادة كبيرة في ارتفاع الزغابات كما أن الزيادة في طول الزغابات تعني زيادة مساحة سطح امتصاص العناصر الغذائية المتاحة (Caspary,1992). ويعزز ذلك أيضا ما أشار أليه Merrifield وآخرون (2010) إن استعمال بكتيريا المعزز الحيوي *Pediococcus acidilactici* أحدثت تغييرات في طبيعة الزغابات المعوية الدقيقة إذ زادت من طولها وسمكها في أسماك التراوت القزحي. كما وأن الزيادة في كثافة الخلايا الكأسية لمعاملات المعزز الحيوي ربما يعزى إلى أن المعززات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة بتوليفاتها المختلفة أحدثت تغييرات نسيجية في القناة الهضمية لأسماك تلك المعاملات أدت إلى تحسين الوظيفة الدفاعية للقناة المعوية نتج عنها زيادة عدد الخلايا الكأسية وفعاليتها الإفرازية للمخاط المعوي الذي يعتبر حاجز دفاعي يعمل على أحتجاز المايكروبات الممرضة ومنع ارتباطها بالظهارة المعوية والقضاء عليها وهذا الأمر ينطبق كذلك على معاملات المعزز الحيوي ذات العزلة البكتيرية المفردة كالثالثة التي تصدرت على الثانية والأولى لكن بوتيرة أقل من المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة والتي جميعها تفوقت معنوياً على معاملات المقارنة A و B وحسب نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (19) ويعزز هذا الرأي ما توصل إليه Standen وآخرون (2016) بأن استعمال المعزز الحيوي التجاري AquaStar® Growout في علائق أسماك البلطي النيلي نتج عنه تحسن في وظيفة الغشاء المخاطي للقناة الهضمية مع خلق حالة من الاستعداد المناعي وتحسين وظيفة الحاجز المخاطي من خلال زيادة عدد الخلايا الكأسية ، ويعزز ذلك أيضا ما استنتجه Nikiforov-Nikishin وآخرون (2021) بأن إستعمال المعززات الحيوية المكونة من بكتيريا *Bacillus subtilis* ومزيج بكتيريا *Bacillus subtilis* و*Bacillus amyloliquefaciens* وبكتيريا *Lactobacillus acidophilus* في علائق يافعات أسماك التروات القزحي أدت إلى حصول تغييرات مختلفة في تركيب القناة المعوية كزيادة عدد الخلايا الكأسية والفعالية الإفرازية لها. وبالرغم من عدم توافر معلومات كافية عن تأثير المعززات الحيوية في عدد الخلايا الكأسية في الأسماك لكن يمكن التكهن بأن انخفاض عدد الخلايا الكأسية ينتج عنه قلة الدفاعات المعوية (Cerezuela وآخرون،2012). وبناءً على ما تقدم من استعراض لنتائج التحليل الإحصائي لمعايير النمو المدروسة يمكن الاستنتاج أن امتصاص المواد يكون

في معاملات المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة ومعاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المفردة (بوتيرة اقل) أكثر مما هي عليه في معاملتي المقارنة A وB بسبب زيادة معدل الايض الغذائي لأسماك تلك المعاملات الذي ترافقه زيادة في كل من طول وسمك وعدد الزغابات وعدد الخلايا الكأسية وسمك الطبقة تحت المخاطية والعضلية التي تؤثر في الامتصاص ونشاط الأمعاء مما يزيد من الاستفادة العالية من الغذاء الذي بدوره ينعكس بشكل إيجابي على أداء النمو والمناعي والفيسيولوجي لأسماك معاملات المعززات الحيوية.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة من معاملات المعزز الحيوي مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB لبعض الاختلافات في القياسات النسيجية للقناة المعوية لأسماك معاملات المعزز الحيوي فيلاحظ أن التخفيف 10^{-6} تفوق معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف10^{-7} لسمك الطبقة المصلية إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى قيمة بلغت 40.00±1.00 مايكرومتر ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمة بلغت 54.50±0.50 مايكرومتر ولم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لباقي معاملات المعزز الحيوي، أما بخصوص عدد الخلايا الكأسية فيلاحظ من الجدول (19) تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمة بلغت 35.37±0.12 خلية/100 مايكرومتر ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمة بلغت 46.00±1.00 خلية/100 مايكرومتر، أما بالنسبة لعدد الزغابات في المقطع الواحد فيلاحظ أيضا من الجدول (19) تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمة بلغت 5.75±0.25 زغابة ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمة بلغت 9.25±0.00 زغابة ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمة بلغت 12.50±0.25 زغابة ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمة بلغت 13.75±0.00 زغابة، وكما هو الحال عليه للمعايير أعلاه يلاحظ أيضا تفوق التخفيف 10^{-6} معنوياً ($p\leq0.05$) لمعيار عرض الزغابات لمعاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمة بلغت 173.12±0.62 مايكرومتر، كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لجميع معاملات المعزز الحيوي لبقية المعايير النسيجية الشكلية المدروسة ، ويعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى للعزلات البكتيرية على أثرت بشكل ايجابي واضح على القناة المعوية لأسماك معاملات المعزز الحيوي المذكورة.

4-12- التحليل الكيميائي لأسماك التجربة

4-12-1- المادة الجافة

يلاحظ من خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي للمادة الجافة في الجدول (20) عدم وجود أية فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) إذ سجلت معاملة المقارنة A قيمة بلغت 98.28±0.28% ومعاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 98.15±0.25%، في حين سجلت معاملة المعزز الحيوي الأولى قيمتان بلغتا 97.94±0.05 و97.59±0.50% ومعاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 97.24±0.25 و97.39±0.47% ومعاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 97.47±0.48 و97.67±0.49% ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا97.45±0.46 و97.56±0.46% ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا97.76±0.48 و97.15±0.48% ومعاملة المعزز الحيوي السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 97.99±0.005 و97.28±0.48% ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 97.46±0.47 و97.39±0.49% ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} على التوالي.

4-12-2- البروتين الخام

يتضح من خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (20) وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) لمعيار البروتين الخام إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي الثانية معنوياً على جميع معاملات المعزز الحيوي بتسجيلها للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 54.00±1.00 و53.29±0.51%، كما جاءت بالمرتبة الثانية معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 54.23±0.49 و52.26±0.48%، وافترقت عنها معاملة المعزز السابعة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 52.74±0.51 و53.07±0.51% وتلتها معاملة المعزز الحيوي السادسة إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 51.86±0.50 و52.44±0.51% ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 51.42±0.50 و52.73±0.50% ومعاملة الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 53.03±0.50 و51.28±0.51% دون تسجيل أي فارق معنوي بينها، وجاءت من بعدها معاملة المعزز الحيوي الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 52.34±0.51 و51.22±0.51%،كما سجلت معاملة المقارنة A ادنى قيمة لهذا المعيار بلغت 41.15±0.65% ومعاملة المقارنة B بلغت (41.94±0.48)% دون تسجيل أي فارق معنوي بين بينهما.

4-12-3- الدهن الخام

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (20) وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية لمعيار الدهن الخام إذ سجلت أعلى قيمة له في معاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 21.79±0.50%، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملة المقارنة A التي سجلت لهذا المعيار قيمة بلغت 20.86±0.50%، وافترقت عنها معاملة المعزز الحيوي الثانية إذ جاءت من بعدها وسجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 19.99±1.00 و19.33±1.00% ومعاملة المعزز الثالثة التي سجلت قيمتان بلغتا 19.31±0.57 و19.66±0.51% ومعاملة المعزز السادسة التي سجلت قيمتان بلغتا 19.57±0.51 و19.18±0.53% دون تسجيل أي فارق معنوي بينها، وتلتها معاملة المعزز الحيوي الأولى إذ جاءت من بعدها وسجلت قيمتان بلغتا 19.13±1.00 و18.78±0.50% ومعاملة المعزز الحيوي الرابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 18.87±0.52 و19.06±0.53% ومعاملة المعزز الحيوي الخامسة التي سجلت قيمتان بلغتا 19.37±0.54 و18.95±0.55% ومعاملة المعزز الحيوي السابعة التي سجلت قيمتان بلغتا 18.55±0.53 و18.40±0.52% على التوالي ولكلا التخفيفين المذكورين دون تسجيل أي فارق معنوي بينها.

4-12-4- الرماد

أظهر معيار الرماد في الجدول (20) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات التجريبية فكانت أعلى قيمة معنوية ($p\leq0.05$) مسجلة تعود إلى معاملة المقارنة B بلغت 32.09±0.51% وجاءت بالمرتبة الثانية معاملة المقارنة A التي سجلت قيمة بلغت 30.56±0.49%، وافترقت عنها جميع معاملات المعزز الحيوي إذ جاءت من بعدها وسجلت لمعاملة المعزز الحيوي الأولى قيمتان بلغتا 24.09±0.51 و25.69±0.51% ولمعاملة المعزز الحيوي الثانية قيمتان بلغتا 24.29±0.51 و24.27±0.51% ولمعاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمتان بلغتا 25.12±0.52 و25.67±0.51% وسجلت لمعاملة المعزز الحيوي الرابعة قيمتان بلغتا 24.75±0.52 و26.48±0.50% وسجلت لمعاملة المعزز الحيوي الخامسة قيمتان بلغتا 25.92±0.52 و24.46±0.51% وسجلت لمعاملة المعزز الحيوي السادسة قيمتان بلغتا 25.25±0.52 و24.84±0.53%، وسجلت لمعاملة المعزز الحيوي السابعة قيمتان بلغتا 25.05±0.52 و25.22±0.52 على التوالي ولكلا التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} دون تسجيل أي فارق معنوي بينها.

جدول (20) التحليل الكيمياوي (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة

المعاملات		الرطوبة (%)	المادة الجافة (%)	البروتين الخام (%)	الدهن الخام (%)	الرماد (%)
معاملة السيطرة A		0.01±1.45 d	0.28±98.28	0.65±41.15 d	0.50±20.86 ab	0.49±30.56 b
معاملة السيطرة B		0.005±1.59 d	0.25±98.15	0.48±41.94 d	0.50±21.79 a	0.51±32.09 a
المعزز الحيوي1	10^{-6}	0.04±2.15* 0.01±1.91 c	0.05±97.94 0.50±97.59	0.49±54.23* 0.48±52.26 ab	1.00±19.13 0.50±18.78 c	0.51±24.09 0.51±25.69 c
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.10±2.60* 0.01±2.15 a	0.25±97.24 0.47±97.39	1.00±54.00 0.51±53.29 a	1.00±19.99 1.00±19.33 bc	0.51±24.29 0.51±24.27 c
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.02±2.06* 0.01±1.85 c	0.48±97.47 0.49±97.67	0.51±52.34 0.51±51.22 c	0.57±19.31 0.51±19.66* bc	0.52±25.12 0.51±25.67 c
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.02±2.07 0.005±1.98 c	0.46±97.45 0.46±97.56	0.50±53.03 0.51±51.28 bc	0.52±18.87 0.53±19.06 c	0.52±24.75 0.50±26.48 c
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.01±1.76* 0.01±2.38 c	0.48±97.76 0.48±97.15	0.50±51.42 0.50±52.73 bc	0.54±19.37 0.55±18.95 c	0.52±25.92 0.51±24.46 c
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.25±2.25 0.03±2.26 ab	0.005±97.99 0.48±97.28	0.50±51.86 0.51±52.44 bc	0.51±19.57* 0.53±19.18 bc	0.52±25.25 0.53±24.84 c
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.01±2.07 0.04±2.15 bc	0.47±97.46 0.49±97.39	0.51±52.74 0.51±53.07 abc	0.53±18.55 0.52±18.40 c	0.52±25.05 0.52±25.22 c
مستوى المعنوية		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

يلاحظ من خلال استعراض النتائج أعلاه عدم تسجيل أية فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) لمعيار المادة الجافة ، أما بالنسبة للبروتين الخام فيلاحظ أن جميع معاملات المعزز الحيوي قد تفوقن معنوياً على معاملتي المقارنة A وB إذ أن معاملة المعزز الحيوي الثانية جاءت بالمرتبة الأولى ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الأولى ومن بعدها السابعة وتلتها معاملات المعزز الحيوي السادسة والخامسة والرابعة ومن بعدها معاملة المعزز الحيوي الثالثة وربما يعلل سبب تفوق معاملات المعزز الحيوي إلى قدرة بكتيريا المعزز الحيوي في المشاركة في عملية هضم البروتينات والكاربوهيدرات (Farzanfar,2006) التي ينتج عنها زيادة عملية احتجاز العناصر الغذائية داخل الجسم وتمثيلها في التركيب الكيمياوي لجسم الأسماك وهذه العملية تحدث عن طريق تعزيز بكتيريا القناة الهضمية النافعة التي بدورها تحسن قابلية الهضم وامتصاص العناصر الغذائية (Bomba وآخرون،2002)، ويعزز هذا الرأي ما تتصف به بكتيريا حامض اللبنيك التي من ضمنها العزلات البكتيرية المستعملة في هذه الدراسة بإنتاجها لمجموعة من المنتجات الايضية الثانوية كأنزيم البروتييز والببتيديز واليوريز واللايبيز والاميليز ومجموعة الأنزيمات المحللة للسكريات المتعددة (Tallapragada وآخرون،2018) التي تشارك في هضم البروتينات والدهون والكاربوهيدرات في غذاء الأسماك وتحليلها إلى موادها الأولية كالأحماض الامينية والدهنية والكلوكوز وتمثيلها في أنسجة الأسماك. ويعزز هذا الرأي ما توصل أليه Sahandi وآخرون (2018) من زيادة في محتوى البروتين الخام في عضلات أسماك التروات القزحي عند استعماله سلالتين من بكتيريا المعزز الحيوي *Bifidobacterium animalis* PTCC-1631 و *Bifidobacterium lactis* PTCC-1736 في أغذيتها .أما بالنسبة لمحتوى جسم الأسماك من الدهن الخام والرماد فقد تفوقت معاملة المقارنة B ومن بعدها معاملة المقارنة A على جميع معاملات المعزز الحيوي لهذين المعيارين. وقد أشار Banda وآخرون (2012) بأن لم يكن هنالك أي تأثير يذكر للمعززات الحيوية على التركيب الكيمياوي لعضلات سمك موسى *Solea senegalensis*.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين 10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة من معاملات المعزز الحيوي مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB لبعض معايير التركيب الكيمياوي لأسماك معاملات المعزز الحيوي فيلاحظ أن التخفيف 10^{-6} تفوق معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف 10^{-7} للبروتين الخام إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى قيمة بلغت 54.23±0.49%، كما

تفوق معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف10^{-7} لمعيار الدهن الخام إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي السادسة قيمة بلغت 19.57±0.51%، في حين تفوق التخفيف 10^{-7} معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف 10^{-6} لنفس المعيار إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمة بلغت 19.66±0.51%، كما لم يسجل أي فارق معنوي بين التخفيفين المذكورين لمعاملات المعزز الحيوي لبقية معايير التركيب الكيمياوي لأسماك التجربة. وربما يعزى السبب في تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى للعزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة.أما بخصوص تفوق التخفيف 10^{-7} لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة للدهن الخام ربما يعلل سبب ذلك إلى إحتمالية تكرار البيئة البكتيرية داخل القناة الهضمية للأسماك للتخفيف 10^{-6} على عكس التخفيف 10^{-7} مما يخلق حالة من التنافس بين بكتيريا نفس النوع نتج عنه أداء أقل لأسماك هذه المعاملة لهذا المعيار، أو ربما يعود السبب إلى عوامل خاصة بنفس مجموعة أسماك المعاملة من اختلافات فردية أو قابلية وراثية أو حالة توازن الأحياء المجهرية داخل القناة الهضمية لتلك الأسماك وغيرها.

4-13- العد المايكروبي الكلي للقناة المعوية للأسماك Total count of Microbiota

يتضح من خلال استعراض نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (21) وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ($p\leq0.05$) للعد المايكروبي الكلي للقناة المعوية للأسماك إذ تفوقت معاملة المعزز الحيوي السابعة معنوياً على جميع معاملات المعزز الحيوي بتسجيلها للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 2.35±0.15 و1.75±0.05 CFU/ml، في حين جاءت بالترتيب الثاني معاملات المعزز الحيوي السادسة والخامسة والرابعة بدون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بينهن إذ سجلت معاملة المعزز الحيوي السادسة قيمتان بلغتا 1.51±0.01 و1.21±0.01 CFU/ml وسجلت معاملة المعزز الحيوي الخامسة قيمتان بلغتا 1.45±0.05 و1.21±0.01 CFU/ml وسجلت معاملة المعزز الحيوي الرابعة قيمتان بلغتا 1.35±0.05 و0.96±0.01 CFU/ml، وافترقت عنهن معاملة المعزز الحيوي الثالثة إذ تلتهن وسجلت للتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} قيمتان بلغتا 0.76±0.01 و0.55±0.01 CFU/ml بدون تسجيل أي فارق معنوي ($p\leq0.05$) بينها وبين معاملة المعزز الحيوي الثانية التي سجلت قيمتان بلغتا 0.73±0.01 و0.63±0.005 CFU/ml، كما جاءت بالمرتبة

الأخيرة معاملة المعزز الحيوي الأولى التي سجلت قيمتان بلغتا 0.32±0.011 و0.19±0.005 CFU/ml والتي لم تفترق معنوياً ($p\leq0.05$) عن معاملة المقارنة A التي سجلت قيمة بلغت 0.019±0.001 CFU/ml ومعاملة المقارنة B التي سجلت قيمة بلغت 0.069±0.014 CFU/ml واللتان أيضاً لم تفترقا معنوياً ($p\leq0.05$) عن بعضهما البعض.

جدول (21) العد المايكروبي الكلي للقناة المعوية (المتوسط ± الخطأ القياسي) لأسماك الكارب الشائع المغذاة على المعززات الحيوية خلال مدة التجربة للتخفيف 10^{-9}

المعاملات		عدد المايكروبات الكلي (CFU/1 ml)
معاملة السيطرة A		0.001±0.019 d
معاملة السيطرة B		0.014±0.069 d
المعزز الحيوي1	10^{-6}	0.011±0.32*
	10^{-7}	0.005±0.19 d
المعزز الحيوي 2	10^{-6}	0.01±0.73*
	10^{-7}	0.005±0.63 c
المعزز الحيوي 3	10^{-6}	0.01±0.76*
	10^{-7}	0.01±0.55 c
المعزز الحيوي 4	10^{-6}	0.05±1.35*
	10^{-7}	0.01±0.96 b
المعزز الحيوي 5	10^{-6}	0.05±1.45*
	10^{-7}	0.01±1.21 b
المعزز الحيوي 6	10^{-6}	0.01±1.51*
	10^{-7}	0.01±1.21 b
المعزز الحيوي 7	10^{-6}	0.15±2.35*
	10^{-7}	0.05±1.75 a
مستوى المعنوية		0.05

*الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات التجريبية ضمن العمود الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

* العلامة (*) تدل على وجود فروق معنوية بين تخافيف المعاملة الواحدة ضمن الصف الواحد وفق اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan،1955)

يلاحظ من خلال استعراض النتائج أن أغلب معاملات المعزز الحيوي قد تفوقن معنوياً ($p\leq0.05$)على معاملتي المقارنة A وB وبالأخص المعاملات متعددة العزلات البكتيرية كمعاملة المعزز الحيوي السابعة التي جاءت بالمرتبة الأولى ومن بعدها معاملات المعزز الحيوي السادسة والخامسة والرابعة ومن بعدها معاملتي المعزز الحيوي ذات العزلة البكتيرية المفردة كالثانية والثالثة ، أما معاملة المعزز الحيوي الأولى ذات العزلة البكتيرية فلم تفترق معنوياً عن معاملتي المقارنة A وB وبشكل عام ربما يعزى السبب إلى نجاح عبور العزلات البكتيرية الثلاث بغض النظر عن طبيعة التوليفات البكتيرية في المعاملات التجريبية عبر المعدة ووصولها إلى الأمعاء ومقاومتها لظروفها المختلفة على غرار البكتيريا السالبة لصبغة كرام إذ أن العزلات البكتيرية الثلاث مكونة للأغشية الحيوية التي تحميها من الظروف القاسية داخل الجهاز الهضمي للأسماك وحسب ما مشار أليه في الفقرة 4-3، أو ربما يعلل سبب تفوق معاملات المعزز الحيوي إلى قدرات الالتصاق المختلفة للعزلات البكتيرية الثلاث التي كانت واضحة في المعاملة السابعة وبشكل متفاوت في باقي المعاملات كالسادسة والخامسة والرابعة وبوتيرة اقل في المعاملات ذات العزلة البكتيرية المفردة كالثانية والثالثة فضلاً عن البيئة الإنتقائية للقناة المعوية للأسماك، كما يمكن أن يعزى الأمر إلى حصول اختلاف مناطقي بين المستعمرات البكتيرية الموجودة أصلاً في القناة المعوية للأسماك ومستعمرات البكتيريا الدخيلة كالعزلات البكتيرية المستعملة في هذه الدراسة كمعززات حيوية (Allameh وآخرون،2015)، كما وقد يفسر التفاوت بين معاملات المعزز الحيوي إلى التضاد الحيوي بين العزلات البكتيرية في كل معاملة من معاملات المعزز الحيوي ومايكروبات القناة المعوية والذي يكون أشد في معاملات المعزز الحيوي ذات العزلات البكتيرية المتعددة كالسابعة ومن بعدها السادسة والخامسة والرابعة وبوتيرة أقل في المعاملات ذات العزلة البكتيرية المفردة كالثانية والثالثة (Mohammadian وآخرون،2017) الأمر الذي نتج عنه تعديل في المحتوى المايكروبي للقناة المعوية للأسماك بحصول تنافس على مواقع الالتصاق والذي كان جلياً في القيم المسجلة في الجدول (21) لأسماك المعاملات ذات العزلات البكتيرية المتعددة كالسابعة اولاً والسادسة والخامسة والرابعة وبوتيرة اقل في المعاملات ذات العزلة البكتيرية المفردة كالثانية والثالثة

ويعزز ذلك ما أشار أليه Gram وآخرون (1999) بأن المعززات الحيوية تستعمل في موازنة أستيطان الكائنات الحية الدقيقة في الجهاز الهضمي للأسماك.

أما بالنسبة للفرق بين التخفيفين10^{-6} و10^{-7} لكل معاملة من معاملات المعزز الحيوي مقارنة مع معاملتي المقارنة A وB للعد الكلي لمايكروبات القناة المعوية لأسماك معاملات المعزز الحيوي فيلاحظ أن التخفيف 10^{-6} تفوق معنوياً ($p\leq0.05$) على التخفيف 10^{-7} لجميع معاملات المعزز الحيوي إذ سجل لمعاملة المعزز الحيوي الأولى قيمة بلغت 0.32±0.011 CFU/ml وسجل لمعاملة المعزز الحيوي الثانية قيمة بلغت 0.73±0.01 CFU/ml وسجل لمعاملة المعزز الحيوي الثالثة قيمة بلغت 0.76±0.01 CFU/ml ولمعاملة المعزز الحيوي الرابعة قيمة بلغت 1.35±0.05 CFU/ml ولمعاملة المعزز الحيوي الخامسة قيمة بلغت 1.45±0.05 CFU/ml ولمعاملة المعزز الحيوي السادسة قيمة بلغت 1.51±0.01 CFU/ml ولمعاملة المعزز الحيوي السابعة قيمة بلغت 2.35±0.15 CFU/ml في حين سجل لمعاملة المقارنة A قيمة بلغت 0.019±0.001 CFU/ml وسجل لمعاملة المقارنة B قيمة بلغت 0.069±0.014 CFU/ml وربما يعزى سبب تفوق التخفيف 10^{-6} للمعاملات المذكورة إلى زيادة كثافة المستعمرات البكتيرية للتخفيف 10^{-6} في 1 مل من المعلق البكتيري الذي نتج عنه فعالية وأداء أقوى للعزلات البكتيرية للمعاملات المذكورة وهذا ما أشار أليه Bagheri وآخرون (2008) إلى أن الأستيطان البكتيري في الجهاز الهضمي في الأسماك يعتمد بشكل كبير على تركيز بكتيريا المعزز الحيوي في الغذاء المقدم للأسماك.

الفصل الخامس

5- الاستنتاجات والتوصيات

5-1 - الاستنتاجات :

1- أظهرت النتائج المستحصلة من هذه الدراسة أن المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة وخصوصاً المكونة من العزلات البكتيرية الثلاث ذات تأثير معنوي في أداء إصبعيات أسماك الكارب الشائع.

2- إن التخفيف 10^{-6} أكثر فعالية من التخفيف 10^{-7} على أداء إصبعيات أسماك الكارب الشائع ولأغلب المعايير المدروسة في التجربة.

3- إن المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة والتخفيف 10^{-6} ذات تأثير معنوي في بعض معايير الدم والمناعة وأداء الدم لأسماك التجربة.

4- إن المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة والتخفيف 10^{-6} ذات تأثير معنوي في هرمونات الغدة الدرقية لأسماك التجربة.

5- لم يسجل أي تأُثير معنوي للمعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المفردة والمتعددة والتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} في إنزيمي AST وALT بينما سجل تأثير معنوي لبعض معاملات المعزز الحيوي لإنزيم ALP .

6- إن المعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المتعددة لاسيما المكونة من العزلات البكتيرية الثلاث والتخفيف 10^{-6} ذات تأثير معنوي في القياسات النسيجية للقناة المعوية لأسماك التجربة.

7- لم يسجل أي تأُثير للمعززات الحيوية ذات العزلات البكتيرية المفردة والمتعددة والتخفيفين 10^{-6} و10^{-7} في التركيب الكيمياوي لأسماك التجربة.

8- إن العزلات البكتيرية الثلاث ضمن المعززات الحيوية المفردة كانت ذات حيوية جيدة ضمن مدة خزن 15 يوم وحيوية مقبولة عند مدة خزن 30 يوم على درجة 4 م°.

9- إن الطريقة التي حضرت فيها المعززات الحيوية في هذه الدراسة كانت فعالة إذ أن المعززات الحيوية أثرت وبشكل واضح على أداء إصبعيات أسماك الكارب الشائع.

10- ترفض الفرضية الصفرية وتقبل الفرضية البديلة لوجود فروق معنوية بين معاملات المعزز الحيوي ومعاملتي المقارنة A و B.

5-2- التوصيات

1- إستعمال المعززات الحيوية المحضرة من توليفات متعددة من مجموعة بكتيريا حامض اللبنيك لاسيما العزلات البكتيرية *Lactobacillus acidophilus* 4453 و *Bifidobacterium bifidum* 5144 و*Streptococcus thermophiles* 5935 في مشاريع الإستزراع السمكي.

2- اعتماد التخفيف (10^{-6}) عند تحضير المعززات الحيوية إذ كان ذا تأثير كبير لأغلب الصفات المدروسة لإصبعيات أسماك الكارب الشائع.

3- اعتماد طريقة تحضير المعززات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة في تحضير المعززات الحيوية مستقبلاً.

4- اعتماد تقنية التجفيد في تحضير المعززات الحيوية بالطريقة المستعملة في هذه الدراسة لأطالة عمر بكتيريا المعزز الحيوي لأكبر مدة ممكنة في ظروف خزن مختلفة.

5- استعمال العليقة الغذائية كحامل للمعززات الحيوية إذ لم ينتج أي تفاعل أو ضرر بينها وبين المعززات الحيوية المحملة عليها.

6- تقييم مناعة الأسماك التكيفية المتخصصة بإستعمال المعززات الحيوية بدلاً من المناعة الفطرية غير المتخصصة المختبرة في هذه الدراسة بعد إصابة الأسماك تجريبياً بأحد الأنواع البكتيرية الممرضة بأختبار التحدي ومن ثم قياس فعالية بروتين مصل الدم المتمم C3 complement على نفس النوع البكتيري من خلال زراعته في طبق بتري.

الفصل السادس

6-المصادر

6-1-المصادر العربية

بلازيفيك ، دوناج وكريسي، ماري ادرر (1983).مبادئ الاختبارات الكيميائية الحيوية في علوم الأحياء المجهرية التشخيصي ، ترجمة صائب نظمي السخن ، مطبعة جامعة الموصل، 160 صفحة.

بوند، أي كارل ،(1986).حياتية الأسماك (الجزء الثاني)، ترجمة هاشم عبد الرزاق أحمد وفرحان ضمد محيسن. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة البصرة ، مطبعة جامعة البصرة ،475 صفحة.

جاسم، صوفيا جبار (2017). تأثير غشاء حيوي فطري بكتيري كسماد حيوي في نمو وحاصل الحنطة .*Triticum aestivum* L. رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة الكوفة ، 154صفحة.

الجبوري، أحمد راضي جبار (2017). إستعمال أوراق نبات الرغل الملحي *Atriplex halimus* L. ونبات زهرة النيل *Eichhomia crassipes* في علائق أسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة المثنى، 76 ص.

الخفاجي، انغام نجاح هادي (2014). دراسة الفعالية التضادية لجرثومة *Bifidobacterium spp.* تجاه جرثومة *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسلين، رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة، 127 صفحة.

الدليمي، خلف صوفي داوود (1988) .علم الأحياء المجهرية – الجزء العلمي ، جامعة بغداد، 264 صفحة.

الذهب،أزهار عمران لطيف (1988).الفعالية التضادية لمستخلصات نباتية عراقية في بعض البكتيريا الممرضة، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل، 68 صفحة.

السلمان،محفوظ حسين محمد علي (2000).أساسيات تربية وإنتاج الأسماك، الطبعة الثانية، 396 صفحة.

ظاهر، عامر عبد الرحمن الشيخ ؛ شاكر، مصطفى عامر (2018). دراسة تأثير التغليف الدقيق للمعززات الحيوية في زيادة عيوشيتها تجاه معاملات بسترة الحليب المتوفر في الأسواق المحلية.المجلة العراقية لبحوث السوق وحماية المستهلك ،مجلد 10، العدد 1، 69-78 ص.

عواد، مصطفى إبراهيم واحمد، هاشم عبد الرزاق (2013). تأثير L-Carnitine على نمو اصبعيات أسماك الكارب الشائع وبعض قياسات الدم. مجلة البصرة للعلوم الزراعية،26 (2): 208-244.

مكي ، ميثم عباس (2013). دراسة بكتريولوجية لمياه بحيرة ساوه و تربتها الشاطئية. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة – جامعة المثنى ، 168 صفحة.

الونداوي ، عباس حميد مشكور و زوين ، لمى عبدالهادي (2020). الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للبكتيريا.دار الكتب والوثائق– بغداد ، الطبعة الأولى ، 130 صفحة.

6-2- المصادر الأجنبية

Aattour, N. ; Bouras, M. ; Tome, D. ; Marcos, A. and Lemonnier, D. (2002).Oral ingestion of Lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon production. Br J 87: 367-73.

Abasali, H. and Mohammad, S. (2010). Effect of Dietary probiotic Level on the Reproductive Performance of Female Platy *Xiphophorus maculates*. Research Journal of Animal Sciences 4(5):112-116.

Abbas, H.H. ; Mohammed, S.A. ;Shawkat, D.S. and Baker, Y.M.(2016). Effect of *Lactobacillus* sp. crude bacteriocin (CB) and cell-free supernatant (CFS) against *E. coli* growth and adherence on vaginal ephitelial cell surface. Int J Adv Res,4:614-20.

Adorian, T.J. ; Jamali, H. ; Farsani, H.G. ; Darvishi, P. ; Hasanpour, S. ; Bagheri,T. and Roozbehfar, R.(2019). Effects of probiotic bacteria Bacillus on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch)." Probiotics and Antimicrobial Proteins .11.1: 248-255.

Ahmed,A.R. ; Al-Zewar, J.M. ; Fawzi, N.A. and Abulhasan, A.A.(2020). Culture of common carp *Cyprinus carpio* L. in Basrah Governorate, southern Iraq; Current status and suggestions for development. Eco. Env. & Cons. 26 (2) : 824-831.

AL-Baadani, H.H. ; Al-Mufarrej ,S.I. ; Al-Garadi , M.A. ; Alhidary, I.A. ; Al-Sagan, A.A. and Azzam, M.M.(2021). The use of gum Arabic as a natural prebiotic in animals: A review. Animal Feed Science and Technology ,Vol. 274, 114894,1-12.

Alberts, B. ; Johnson, A. ; Lewis, J. ; Raff, M. ; Roberts, K. and Walter, P.(2002). Molecular Biology of the Cell, 4th ed.Garland.

Alemayehu, T.A. ; Geremew, A. and Getahun, A.(2018). The Role of Functional Feed Additives in Tilapia Nutrition, Fisheries and Aquaculture Journal.; 9(2): 1-6 pp.

Al-Faisal, A. J. ; Mutlak, F. M. and Abdullah, S. A.(2014). Exotic freshwater fishes in the southern Iraq,Marsh Bulletin 9(1) :65-78.

Al-Faragi, J.K.H. and Sundus A.A.A. (2012). Isolation and identification of *Bacillus subtilus* as probiotic from intestinal microflora of common carp *Cyprinus carpio* L." The Iraqi Journal of Veterinary Medicine 36.2: 355-361.

Al-Ghanim, K.A.(2014). Effect of cypermethrin toxicity on enzyme activities in the freshwater fish *Cyprinus carpio* L. Afr J Biotechnol,13: 1169-1173.

Allameh, S. K. ; Yusoff, F. M. ; Ringo, E. ; Daud, H. M. ; Saad, C. R. ; and Ideris, A. (2015). Effects of dietary mono-and multiprobiotic strains on growth performance, gut bacteria and body composition of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker 1850). Aquaculture Nutrition, 22(2), 367–373.

Allameh, S.K. ; Noaman, V. and Nahavandi, R.(2017). Effects of Probiotic Bacteria on Fish Performance.Advanced Techniques in Clinical Microbiology, . Adv Tech Clin Microbiol. , 1(2) :1-5.

Aly, S.M. ; Ahmed, Y.A.G. ; Ghareeb, A.A.A. ; Mohamed, M.F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica Oreochromis niloticus* to challenge infections. Fish Shellfish Immun, 25(1-2), 128- 136.

Aly, S.M.(2013). A review of fish diseases in the Egyptian aquaculture sector: Working report."

Amalaradjou,M. A. R. and Bhunia,A.K.(2012). Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens.Advances in food and nutrition research , 67 , 185 – 239 pp.

Anonymous, (2010). *Lactobacillus acidophilus*. Wikipedia®. Wikimedia Foundation,Inc.https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists).(1980). official Methods of Analysis, 13th ed Washington, DC . 1018 pp .

Asadian, M. ; Shahsavani, D. and Kazerani, H.R.(2015). Growth promoting effects of a multi-strain probiotic on common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. Iran. J. Vet. Sci. Technol. 7, 63–74.

Asano, Y. ; Hiramoto, T. ; Nishino, R. ; Aiba, Y. ; Kimura, T. ; Yoshihara, K. and Sudo, N.(2012). Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.303:G1288–95.

Ashraf, A. (2000).Probiotics in fish farming evaluation of a candidate bacterial mixture *Vattenbruksinstitutionen.* Report 19, Umea, Ph Licentiate thesis, pp 1–18.

Askarian, F. ; Zhou, Z. ; Olsen, R.E. ; Sperstad, S. and Ringø, E. (2012). Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four pathogens. Aquaculture 1-8: 326-329.

Aslam, M. ; Shahid, M. ; Rehman, F. U. ; Naveed, N. H. ; Batool, A. I. ; Sharif, S. and Asia A.(2011). Purification and characterization of bacteriocin isolated from *Streptococcus thermophilus*. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(18), 2642-2648 pp.

Atgie,M.(2018). Composition and structure of gum Arabic in solution and at oil-water interfaces.Phd. desrtation , THE University of toulouse\ National Polytechnic Institute of Toulouse (INP Toulouse),163 pp.

Atlas, R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. 1St ed. Mosby. USA.565 pp.

Avella, M.A. ; Gioacchini, G. ; Decamp, O. ; Makridis, P. ; Bracciatelli, C. and Carnevali, O.(2010). Application of multi-species of Bacillus in sea bream larviculture. Aquaculture 305, 12–19.

Ayoola,S.O. ; Ajani,E.K. and Fashae,O.F.(2013). Effect of Probiotics Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. on Growth Performance and Hematological Profile of *Clarias gariepinus* Juveniles. World Journal of Fish and Marine Sciences 5 (1): 01-08.

Ayyat,M.S. ; H. M. Labib,H.M. and Mahmoud, H.K.(2014). A Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Aquaculture, 26:208–215.

Azarin, H. ; Aramli, M.S. ; Imanpour, M.R. and Rajabpour, M. (2015). Effect of a Probiotic Containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* and Ferroin Solution on Growth Performance, Body Composition and Haematological Parameters in Kutum (*Rutilus frisii* kutum) Fry. Probiotics Antimicro, 7(1), 31-37.

Badreldin, H.A. ; Amal, Z. and Gerald, B.(2008). Biological effects of gum Arabic: A review of some recent research. Food Chem. Toxicol., 47: 1-8.

Bagheri, T. ; Hedayati, A. ; Yavari, V. ; Alizade, M. and Farzanfar, A. (2008). Growth survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turk J Fish Aquat Sci 8:43–48**.**

Bai, Y. ; Sun, E. ; Shi, Y. ; Jiang, Y.; Chen, Y. ; Liu, S.; Zhao, L. ; Zhang, M. ; Guo, H. ; Zhang, H. ; Mu, Z. and Ren, F. (2016). Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* MN-BM-A01, a

strain with high exopolysaccharides production. Journal of Biotechnology, 224, 45–46.

Balaji, S. ; Balasubramanian, V. ; Baskaran, S. ; Pavaraj, M. and Thangapandian,V.(2013). Evaluation of Immunomodulatory Effect of Dietary Probiotics on the Common Carp, *Cyprinus carpio* L. ,Research Journal of Immunology,Vol. (6) : 1 , 1-6 .

Balcazar, J. L. ; Vendrell, D. ; de Blas, I. ; Ruiz-Zarzuela, I. ; Girones, O. and Muzquiz, J. L. (2006a). Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 29(5-6), 335–343.

Balcazar, J.L. ; de Blas, I. ; Ruiz-Zazuela, I. ; Cunningham, D. ; Vendrell, D. and Muzquiz, J.L.(2006b). The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology,114:173-186.

Balciunas, EM.; Martinez, FAC.; Todorov, SD.; de Melo Franco, BDG.; Converti, A.; de Souza Oliveira, RP.(2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins. Rev. Food. Control. 32:134-142.

Balint, T. ; Ferenczy, J. ; Katai, F. ; Kiss, I. ; Kroazc, L. ; Lang G. ; Polyhos, C. ; Szabo, I. and Nemesok, J.(1977). Similarities and differences between the massive eel (*Aguilla anguilla*) devastation that occurs in lake ablation in 1991 and 1995. Ecotoxicology and Environmental Safety. 37:17-23.

Balon, E. K. (2004). About the oldest domesticates among fishes. Journal of Fish Biology , 65:(1), 1–27.

Bancroft, J. and Gamble, M. F.(2008). Theory and practice of Histological techniques . Churchill Livingstone Elsvier . sixth edition . UK. Pp. : 188-235.

Banda, I.G. ; Lobo, C. ; Chabrillon, M. ; Leon-Rubio, J. ; Arijo, S. ; Pazos, G. ; Lucas, L.M. and Morinigo, M.A.(2012). Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damselae* subsp piscicida. Aquac Res. 43(5):662–69.

Banerjee, G. ; Nandi, A. ; Dan, S.K. ; Gosh, P. and Ray, A.K.(2016). Mode of association, enzyme producing abilityand identification of autochthonous bacteria in the gastrointestinal tract of two Indian air-breathing fish, murrel (*Channa punctatus*) and stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*). Proceedings of the Zoological Society (Calcutta). 70:132–140 p.

Banerjee, G. and Ray, A. K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Research in Veterinary Science, 115: 66–77.

Baron , E. J. and Finegold , S. M.(1990) . Diagnostic Microbiology . 8th ed. Mosby Company, St. Louis, pp. 400-402.

Begum, A. ; Jakaria, D.M. ; Anisuzzaman, S.M. ; Islam, M. and Mahmud, S.A.(2015). Market assessment and product evaluation of probioticc ontaining dietary supplements available in Bangladesh market. J Pharm ,1:1- 5.

Beijerinck, M.W. (1901).Sur les ferments lactiques de l'industrie. Arch. of Ne´er. Sci. (Sect. 2) 6: 212–243.

Bermudez-Brito, M. ; Plaza-Díaz, J. ; Muñoz-Quezada, S. ; Gómez-Liorente, C. and Gil A. (2012). Probiotic mechanisms of action." Annals of Nutrition and Metabolism 61.2: 160-174.

Betts, J. G. ; Desaix, P. ; Johnson, E. ; Johnson, J. E. ; Korol, O. ; Kruse, D. ; Poe, B. ; Wise, J.A. ; Womble, M. and Young, K.A.(2013). Anatomy and Physiology. OpenStax, 1420 pp.

Bilal, S. ; Lie, K.K. ; Karlsen, O.A. and Hordvik, I. (2016). Characterization of IgM in Norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses). Fish Shellfish,Immunol 59:9–17.

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteriaas starter cultures: An update in their metabolism and genetics. Aims Microbiol, 4: 665–684.

Biosphere Reserves: Danube Delta, UNESCO. [Retrieved 2 June 2019].

Black, C.A.(1965). Methods of soil analysis. Part I, American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA. 1572 p.

Blanton, M.L. and Specker, J.L.(2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. Crit. Rev. Toxicol. 37:97–115.

Boes, M.(2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Mol. Immunol. 37, 1141–1149.

Bomba, A. ; Nemcoa, R. ; Gancarc-Ova, S. ; Herich, R. ; Guba, P. Mudron- Ova, D.(2002).Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins fructooligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. Br J Nutr 88(Suppl1):95–99.

Borre, Y. E. ; Moloney, R. D. ; Clarke, G. ; Dinan, T. G. and Cryan, J. F.(2014). The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms and therapeutic potential. In: Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease, 817:373–403.

Brown , M.E. (1957).Experimental studies on growth .In:Fish physiology, M.E. Brown (ed.) New York , N.Y. Academic press Vol . I ,p 361-400 .

Brown, M.(2011). Modes of action of probiotics: resent developments. J Anim Vet Adv. 10(14):1895-1900.

Bunnoy, A. ; Na-Nakorn, U. and Srisapoome, P. (2019). Probiotic E_ects of a Novel Strain, Acinetobacter KU011TH, on the Growth

Performance, Immune Responses, and Resistance against *Aeromonas hydrophila* of Bighead Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864). Microorganisms, 7: 613, 1-30.

Buonocore, F. and Gerdol, M.(2016). Alternative adaptive immunity strategies: coelacanth, cod and shark immunity. Mol Immunol 69:157–169.

Bureau, D.P. ; Hua, K. and Cho, C.Y.(2006). Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) growing from 150 to 600, Aquaculture Research, 37(11):1090–1098.

Burokas, A. ; Moloney, R.D. ; Dinan, T.G and Cryan J.F.(2015). Microbiota regulation of the mammalian gut-brain axis. In: Advances in Applied Microbiology. Cambridge, MA: Academic Press , 91:1-62.

Buxton , A. and Frase , G.(1977) . Animal microbiology : Immunology, Bacteriology, Mycology, Diseases of Fish and Laboratory Methods vol. (1) ,Blackwell scientific publicatios,Oxford London Edinburgh Melbourne,502 pp.

Cahill, M.M.(1990). Bacterial flora of fishes: A review. Microb Ecol, 19(1): 21-41.

Campinho, M.(2019) . Teleost metamorphosis: the role of thyroid hormone, Frontiers in Endocrinology, 10, 383.

Campos, C.A. ; Gerschenson, L.N. and Flores, S.K.(2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. Food and Bioprocess Technology **4**: 849-875.

Cani, P.D. and Knauf, C.(2016). How gut microbes talk to organs: the role of endocrine and nervous routes. Mol Metabol. 5:743–52.

Cano-Chauca, M.; Stringheta, P.C.; Ramos, A.M. and Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder

obtained by spray drying and its functional characterization. Innov. Food Sci. Emerg. Technol.6:420–428.

Carnevali, O. ; Sun, Y. Z. ; Merrifield, D. L. ;Zhou, Z. and Picchietti, S. (2014). Probiotic application in temperate and warm water fish species. In D. Merrifield, & E. Ringø (Eds.), Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics, (pp. 253–289). Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing.

Carol, A.V.R. and Leon, M.T.D.(2010). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. Archives of Microbiology 193(3), 157-168.

Carollina, A. (2015). Determination of Total Plate Count (TPC) Bacterial in Probiotic Drugs**.** Thesis. Medan, Indonesia: Graduate School of the Faculty of Pharmacy, University of Sumatera Utara.

Caspary, W. F. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. American Journal of Clinical Nutrition, 55:(1), 299-308.

Catalan, N. ; Villasante, A. ; Wacyk, J. ; Ramırez, C. and Romero, J. (2017). Fermented soybean meal increases lactic acid bacteria in gut microbiota of Atlantic Salmon *Salmo salar*. Probiot Antimicrob Proteins,10(3):566-576.

Cerezuela, R. ; Fumanal, M. ; Tapia-Paniagua, S. T. ; Meseguer, J. ; Morinigo, M.A. and Esteban, M. A.(2012). Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae.Cell Tissue Res. 350:477–489.

Chandrakala, N.; Soundharanay- Aki, G. (2017). Role of Probiotics in aquaculture- a review. International Journal of Current Innovation Research, 3(2), 577-582.

Chelikani, P. ; Fita, I. and Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences. **61** (2): 192–208.

Chi, C. ; Jiang, B. ; Yu, X. B. ; Liu, T. Q. ; Xia, L. and Wang, G. X. (2014). Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio* L. Fish and Shellfish Immunology, 36(1), 9–18.

Cho, C.Y.(1992). Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. Aquaculture, 100: 107-123.

Christensen,G.D. ; Simpson, W.A. ; Bison, A.L. and Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces .Infect Immum;37:318-26.

Chumchalova, J. ; Stiles, J. ; Josephsen, J. and Plockova, M. (2004). Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. J. Appl. Microbiol. 96: 1082-1089.

Ciesla, B. (2007). Hematology in Practice , FA Davis Company: Philadelphia, PA, USA, 230 p.

Collee, J. G. ; Miles, R. S. and Watt, B. (1996). Tests for the Identification of Bacteria. In : Practical Medical Microbiology 14th ed. Ed. by J. Gerald Collee, Barrie, P, Marmion, Andrew, G. ; Fraser and Anthony Simmons. Churchill Livingstone. New York. P. 132 – 149.

Colombo, M. ; Castilho, N. P. A. ; Todorov, S. D. and Nero, L. A.(2018). eneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production,BMC Microbiology .18:(219),12 pp.

Cowan, S.T.(1977). Cown and steel manual for the identification of medical bacteria .2nded Cambridge University Press, Cambridge,67-83.

Crane. R. K. (1968). Hand Book of Physiology. Section Alimentary Canal. American Physiological Society. Washington. D. C, Vol. 3, 1323 p.

Dabrowski, K. ; Murai, T. and Becker, K. (1986). Physiological and nutritional aspects of intensive feeding of carp. In: Aquaculture of cyprinids (ed. by R. Billard & J. Marcel), INRA, Paris, pp 55–70.

dairy. Academic Press,London ,New York, San Freancisco.362PP.

Das, S. ; Ward, L.R. and Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. Aquaculture 305: 32-41.

Dauqan,E. and Abdullah, A.(2013). Utilization of Gum Arabic for Industries and Human Health, American Journal of Applied Sciences 10 (10): 1270-1279 pp.

Dawood, M. A. O. and Koshio, S.(2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. Aquaculture, 454, 243–251.

Dawood, M.A.O. ; Koshio, S. ; Ishikawa, M. ; Yokoyama, S. ; El Basuini, M.F. ; Hossain,M.D.S. ; Nhu, T. H. ; Dossou, S. and Moss, A.S. (2017). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, Pagrus major. Fish Shellfish Immun 49, 275–285.

De Schrijver, R. and Ollevier,F. (2000). Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. Aquaculture 186: 107-116.

De Souza, P.C. and Bonilla-Rodriguez, G.O.(2007). Fish hemoglobins**.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research , 40(6), 769–778.

Deal, C. and Volkoff, H.(2020). The role of the thyroid axis in fish, Frontiers in Endocrinology, 11, 596585.

Del Carmen, S ; LeBlanc, A.D.M.D. ; Martin, R. ; Chain, F. ; Langella, P. ; Bermudez-Humaran,L.G.and Le Blanc, J.G.(2014). Genetically engineered immunomodulatory *Streptococcus thermophilus* strains producing antioxidant enzymes exhibit enhanced anti-inflammatory activities. Appl Environ Microbiol ;80:869–77.

Delorme, C. ; Bartholini, C. ; Bolotine, A. ; Ehrlich, S. D. and Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. Applied and Environmental Microbiology, 76(2), 451–460.

Dennis, E.U. and Uchenna, O.J.(2016). Use of probiotics as first feed of larval African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Annual Research & Review in Biology.9(2):1.

Doan, H. ; Hoseinifar, S.H. ; Khanongnuch, C. ; Kanpiengjai, A. ; Unban, K. ; Kim, V. and Srichaiyo, S. (2018). Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. (491),94-100.

Duncan ، D.B.(1955). Multiple rang and multiple F test . Biometrics ، 11-19.

Duponnois, R., and Garbaye, J.(1990). Some mechanisms involved in growth stimulation of *Ectomycorrhizal* fungi by bacteria. Can. J. Bot. 68:2148–2152.

Eales, J.G. and Brown, S.B.(1993). Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. Rev. Fish Biol. Fish. 3, 299_347.

Eales, J.G.(2006). Modes of action and physiological effects of thyroid hormones in fish. In: Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Endocrinology. Science Publishers, Inc.2,767–808.

Eales, J.G.(2019). The relationship between ingested thyroid hormones, thyroid homeostasis and iodine metabolism in humans and teleost fish. Gen Comp Endocrinol ,280:62–72.

Egerton, S. ; Culloty, S. ; Whooley, J. ; Stanton, C. and Ross, R. P. (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish. Frontiers in Microbiology, 9, 873.

EL-Haroun, E.R. ; Goda, A.M. and Kabir, C.M.A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture Research 37: 1473-1480.

Elli, M. ; Callegari, M. L. ; Ferrari, S. ; Bessi, E. ; Cattivelli, D. and Soldi, S. (2006). Survival of yoghurt bacteria in the human gut. Applied and Environmental Microbiology, 72, 5113–5117.

Erkmen,O.(2022). Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments**,** Academic Press,600 pp. eBook ISBN: 9780323972215

Esmaeili , M. (2021). Blood Performance: A New Formula for Fish Growth and Health ,Biology, 10, 1236.

Faeed, M. ; Kermanshahi, K. R. ; Pourkazemi, M. and Ahmadnezhad, M.(2020). In vivo study on probiotic *Lactobacillus brevis* in *Sander lucioperca* and some of their nonspecific immune parameters, intestinal morphology and survival against *Aeromonas hydrophila*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 21(2) , 387-402 .

FAO,(2009). *Cyprinus carpio*.Linnaeus, 1758**.** Cultured aquatic species fact sheets.15 pp.

FAO,(2016). Probiotics in animal nutrition–Production, impact and regulation. FAO Animal Production and Health Paper No. 179,Rome .

FAO,(2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals.Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Farrell, A.P.(2011) .Cellular Composition of the Blood. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment, 2, 984-991.

Farzanfar, A. (2006).The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol Med Microbiol 48:149–158.

Fazilah, N.F. ; Hamidon, N.H. ; Ariff, A.B. ; Khayat, M.E. ; Wasoh, H. and Halim, M.(2019). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* Gh1 with Gum Arabic and *Synsepalum dulcificum* via Spray Drying for Potential Inclusion in Functional Yogurt. Molecules journal, 24, 1422.

Feliatra, F. ; Elizal, L. ; Lukistyowati, I. ; Melina, D. and Ramadhani, M. (2018) .Effectiveness of Immersion with Probiotic in Improving the Health of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. Asian J Anim Vet. Adv. 13(1), 43-51.

Feltham, K. A. ; Power, A. K. ; Pell, P. A. and Sneath, P. H.(1978). A simple method for the strorage of bacteria.J. App. Bacteriol. 44,313-316.

Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature". International Journal of Environmental Research and Public Health. **11** (5): 4745-4767 p.

Flajnik, M.F. and Kasahara, M.(2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. Nat. Rev. Genet.11, 47–59.

Fricke, R. ; Eschmeyer, W. and van der Laan, R. (2018). Catalog of fishes: genera, species, references. Available: http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp.

Froese, R. and Pauly, D. (eds.).(2011). FishBase. World Wide Web electronic publication, version (02/2011) (available at: www.fishbase.org/summary/speciessummary.php.

Gabriel, U.U. ; Akinrotimi, O.A. and Ariweriokuma, V.S.(2012). Changes in metabolic enzymes activities in selected organs and tissue of *Clarias gariepinus* exposed to cypermethrin. Journal of Chemical Engineering. 1: 25-30.

Gallaugher, P.E.(1994) . The role of haematocrit in oxygen transport and swimming in salmonid fishes. PhD Thesis, August, Simon Fraser University, UK.129 pp.

Gavrila, A. and Hollenberg, A.(2019). The hypothalamic–pituitary–thyroid axis: physiological regulation and clinical implications. In: M Luster, L Duntas and L Wartofsky, editors. The Thyroid and Its Diseases. Chamonix, CH: Springer ,13–23.

Gawlicka, **A. ; Parent, B. ; Horn, M. H. Ross, N. ; Opstad, I, and Torrissenc, O. J.(2000).**Activity of digestive enzymes in yolksac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. Aquaculture 184: 303- 314.

Geng, X. ; Dong, X.H. ; Tan, B.P. ; Yang, Q.H. ; Chi, S.Y.Liu, H.Y. and Liu, X.Q.(2012). Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture Nutrition.18(1):46-55.

Gerking，S.D. (1971). Influence rate of feeding and body weight on protein metabolism of bluegill sunfish. Physiol. Zool，44 : 9-19.

German, D.P. ; Horn, M. H. and Gawlicka, A.(2004). Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, Dietary, and Phylogenetic Effects. Physiol Biochem Zool 77: 789- 804.

German, D.P. ; Nagle, B.C. ; Villeda, J.M. ; Ruiz, A.M. ; Thomson, A.W. ; Balderas, S. C. and Evans, D. H. (2010). Evolution of herbivory in a carnivorous clade of minnows (Teleostei: Cyprinidae): effects on gut size and digestive physiology. Physiol Biochem Zool, 83(1): 1-18.

Geven, E.J.W.(2009). Thyroid Physiology in Fish. Doctoral Dissertation. Radboud University, Nijmegen. Netherlands. 208p.

Ghosh, K. ; Banerjee, S. ; Moon, U. M. ; Khan, H. A. and Dutta, D. (2017). Evaluation of gut associated extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory microbial community as potential probiotics in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. International Journal of Aquaculture, 7(23), 143–158.

Giri, S. S. ; Sen, S. S. and Sukumaran, V.(2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish Shellfish Immunol., 32, 1135–1140.

Giri, S. S. ; Sukumaran, V. and Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology,34(2),660–666.

Giri, S.S. ; Sukumaran, V. ; Sen, S.S. and Jena, P.K.(2014). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. Aquac. Nutr. 20, 163–171.

Gobi, N. ; Vaseeharan, B. ; Chen, J.C. ; Rekha, R. ; Vijayakumar, S. ; Anjugam, M. and Iswarya, A.(2018). Dietary supplementation of

probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*." Fish & Shellfish Immunology. 74 : 501-508.

Godber, G. E. (1989). The bacteriological examination of water supplies, Department of health and social security , London.

Gomez, G.D. and Balcazar, J.L.(2008).A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunol Med Microbiol, 52(2): 145-154,

Gopal, P. K. (2011). Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Elsevier Ltd, 91-95 p.

Gram, L. ; Melchiorsen, J. ; Spanggaard, B. ; Huber, I. and Nielsen, T.F. (1999). Inhibition of Vibrio anguillarum by Pseudomonas fluorescens AH2 a possible probiotic treatment of fish. Appl Environ Microbiol 65: 969–973**.**

Gravier-Hernández,R. and Gil-del Valle, L. (2018). Oxidative Stress and Tuberculosis–Human Immunodeficiency Virus Coinfection , Pedro Kourí Institute of Tropical Medicine (IPK), La Habana, Cuba. DOI: 10.1016/B978-0-12-809853-0.00002-X.

Gul, A.; Yilmaz, M.; Kuşçu, A. and Benzer, S.(2010). Feeding properties of common carp *Cyprinus carpio* L., 1758 living in Hirfanli dam lake. Kastamonu Eğitim Derg., 18(2): 545-556.

Guzman-Villanueva, L. T. ; Tovar-Ramírez, D. ; Gisbert, E. ; Cordero, H. ; Guardiola, F. A. ; Cuesta, A. ; Meseguer, J. ; Ascencio-Valle, F. and Esteban, M. A.(2014). Dietary administration of b-1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression . Fish and Shellfish Immunology 39, 34-41.

Hadley, M.E.(1992). Endocrinology, 3rd ed. Prentice-Hall International, London.

Hai, N.(2015). The use of probiotics in aquaculture. J Appl Microbiol, 119: 917-935.

Hamdan, A. M., El-Sayed, A. F. and Mahmoud, M. M. (2016). Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Microbiology, 120(4), 1061–1073.

Hamka, M. S. ; Meryandini, A. and Widanarni, W.(2020). Growth performance and immune response of catfish Clarias sp. given probiotics *Bacillus megaterium* PTB 1.4 and Pediococcus pentosaceus E2211. Journal Akuakultur Indonesia. 19. 50-60.10.19027/jai.19.1.50-60.

Han, B. ; Long, W. Q. ; He, J. Y. ; Liu, Y. J. ; Si, Y. Q. and Tian, L. X. (2015). Effects of dietary *Bacillus licheniformison* growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology, 46(2), 225–231.

Hansen, J. D. ; Landis, E. D. ; Phillips, R. B.(2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish.Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 6919–6924.

Harnett, J. ; Davey, G. ; Patrick, A. ; Caddick, C. and Pearce, L.(2011). Lactic Acid Bacteria *Streptococcus thermophilus*, Elsevier Ltd.Vol. 4, pp 2577–2582.

Harrigan, W.F .and McCance,D.(1976). Laboratory method in food and

Hasan, K. N. ; Moniruzzaman, M. and Maitra, S. K. (2014). Melatonin concentrations in relation to oxidative status and oocyte dynamics in

the ovary during different reproductive phases of an annual cycle in carp *Catla catla*. Theriogenology, 82(8), 1173–1185.

Hasan, K. N. ; Pal, P. K. and Maitra, S. K. (2020). Temporal relationship between the levels of melatonin and different antioxidants in the liver of a surface feeding carp *Catla catla*. Biological Rhythm Research, 51(3), 373–391.

Hasan, K. N. and Banerjee, G.(2020). Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review.The Journal of Basic and Applied Zoology, 81:53,16 pp.

Hassanien, A. E. ; El-Moghazy,G.M. ; Iraqi, M. M. ; Soltan,M.A. and Elsayad,G.A.(2017). Physiological and haematological responses of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus)* fed on diets supplemented with probiotics. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries,Vol. 21(1): 25-36.

Hati, S. ; Patel, M. ; Birendra, K. ; Mishra, B.K. and Sujit Das,S.(2019). Short-chain fatty acid and vitamin production potentials of Lactobacillus isolated from fermented foods of Khasi Tribes, Meghalaya, India. Ann Microbiol ,69:1191–1199.

Hati, S.; Mandal, S.; Prajapat, J.B. (2013). Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products. Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.1, 83–91.

Hayati,A. ; Pramudya, M. ; Supriyanto,A. ; Nurhariyati,T. Zahra,P.F. and Hayaza,S.(2021). The effect of diet supplement on *Oreochromis niloticus* (L.) morphometrics in environments contaminated with Cadmium. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science ,718 ,012005.

Hayek, S.A.; Gyawali, R.; Aljaloud, S.O.; Krastanov, A.; Ibrahim, S.A. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. J. Dairy Res, 86, 490–502.

Hepher, B. ; Liao, I.C. ; Cheng, S.H. and Hsieh, C.S.(1983). Food utilization by red tilapia -effects of diet composition, feeding level and temperature on utilization efficiencies for maintenance and growth. Aquaculture. 32(3–4):255–75.

Hernandez-Gonzalez, J. C. ; Martinez-Tapia, A. ; Lazcano-Hernandez, G. ; Garcia-Perez, B. E. and Castrejon-Jimenez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. Animals, 11(4), 979.

Hertam, S. C. (2010). The Effects of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) on Water Quality, Algae and Submerged Vegetation in Delta Marsh, Manitoba, Msc thesis , University of Manitoba\ Biological Sciences, 187 pp.

Hikima, J. I. ; Jung, T. S. and Aoki, T.(2011). Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts.Dev. Comp. Immunol., 35, 924–936.

Hnatiuk, S. D.(2006). Experimental manipulation of ponds to determine the impact of carp (*Cyprinus carpio* L.) in Delta Marsh, Manitoba: effects on water quality, algae, and submersed vegetation. M. Sc. Thesis. University of Manitoba. Winnipeg, Manitoba.1-192.

Honda, Y. ; Kondo, H. ; Caipang, C.M. ; Hirono, I. and Aoki, T.(2010). cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain genes in banded houndshark *Triakis scyllium*. Fish Shellfish Immunol. 29, 854–861.

Hooper, L.V.and Macpherson, A.J.(2010). Immune Adaptations That Maintain Homeostasis with the Intestinal Microbiota. Nat. Rev. Immunol, 10, 159–169.

Hosain, M.A. and Liangyi, X.(2020). Impacts of probiotics on feeding technology and its application in aquaculture,Journal of Aquaculture, Fisheries & Fish Science,Vol. 3, p 174-185.

Hoseinifar, S. H. ; Roosta, Z. ; Hajimoradloo, A. and Farzaneh Vakili, F.(2014). The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & Shellfish Immunology. Vol.(42), No.(2) : 1-6 pp.

Hoseinifar, S. H. ; Ringø, E. ; Shenavar Masouleh, A. and Maria,A.E. (2016). Probiotic, prebiotic and synbiotic supple-ments in sturgeon aquaculture: a review. Rev. Aqua-cult. 8, 89-102.

Hoseinifar, S.H. ; Hosseini, M. ; Paknejad, H. ; Safari, R. ; Jafar, A. ; Yousefi, M. ; Doan, H.V. and Mozanzadeh, M.T.(2019). Enhanced mucosal immune responses, immune related genes and growth performance in common carp *Cyprinus carpio* L. juveniles fed dietary *Pediococcus acidilactici* MA18/5M and raffinose. Dev. Comp. Immunol. 94, 59–65.

Hrubec, T.C., Smith, S.A.(2010). Hematology of Fishes. In: Schalm‘s Veterinary Hematology, 6th ed. Douglas J. ed. Singapore: Blackwell Publishing Ltd., 994 – 1003.

Huser, B.J. ; Bajer, P.G. ; Chizinski, C.J. and Sorensen, P.W.(2016). Effects of common carp *Cyprinus carpio* L. on sediment mixing depth and mobile phosphorus mass in the active sediment layer of a shallow lake. Hydrobiologia 763: 23–33.

Iman, M.K.A. ; Amani, M.K. ; Taghreed, P.E. ; Magdy, A.H. and Suleiman, W.S. (2014). *Enterococcus faecalis* probiotic as a growth stimulator and its effect on the expression of host innate immunity in cultured *Oreochromis niloticus*. Journal of Research in Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 5(2):1747-1761.

Imanpoor, M.R. and Roohi, Z.(2015). Influence of Primalac Probiotic on Growth Performance , Blood Biochemical Parameters , Survival and

Stress Resistance in the Caspian Roach *Rutilus rutilus* Fry. Turk J. Fish Aquat Sc 15, 917-922.

ITIS (Integrated Taxonomic Information System).(2018). Cyprinus carpio Linnaeus, 1758. Integrated Taxonomic Information System, Reston, Virginia.Available:https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=163 344#null.

Ivanova, I. ; Kabadjova, P. ; Pantev, A. ; Daanova, S. and Dousse, X. (2000). Detection, purification and characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactobacillus lactis* subsp. lactis B14 isolated from boza-bulgarian traditional cereals beverage. Proceeding of the international conference on Biocatalysis-2000: Fundamental and Application, Moscow Russia Jun 10-15;. 41: 47-53.

Iwashita, M. K. ; Nakandakare, I. B. ; Terhune, J. S. ; Wood, T. and Ranzani-Paiva, M. J. T. (2015). Dietary supplementation with *Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish. Shellfish. Immunol. 43, 60–66.

Jamali, H. ; Moghadam, H.; Pariche, N. and Hojatollah, J. (2015). Effects of probiotic bacteria on survival, growth and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae fed diets with various fish meal. Coastal Journal of Life Medicine (English Edition), 3(2):91-97 .

James, C. S. (1996). Analytical chemistry of foods. New York, NY: Chapman and Hall.

Jan, K. ; Ahmed, I. and Dar, N. A. (2020). Haematological and serum biochemical reference values of snow trout, *Schizothorax labiatus* habiting in river Sindh of Indian Himalayan region. J. Fish Biol., 98, 1289–1302.

Jauncey, K. and Ross, B.(1982). A guide to tilapia feeds and feeding Ins. Aquaculture, Univ. Sterling, FK94 La, Scotland, U. K.111.

Je, W. ; Min, J. ; Hasan, T. ; Lee, B. ; Gu, S. and Kong, I.(2019). Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 92, 719–727.

Jha, D. ; Bhujel, R. and Anal, A.(2014). Dietary supplementation of probiotics improves survival and growth of Rohu (*Labeo rohita* Ham.) hatchlings and fry in outdoor tanks. Aquaculture. 435. 10.1016/j.aquaculture.2014.10.026.

John, S. ; Dimitroglou, A. ; Simon, D. and Silva, T.(2008). Nutrient Uptake. Gut morphology a key to efficient nutrition. International Aquafeed, 11, 26–30

Johnson, J. L. ; Phelps, C. F. ; Cummins, C. S. ; London, J. and Gasser. F. (1980). Taxonomy of the *Lacto bacillus acidophilus* Group. Inter. J. Sys. Bacteriol. 30: 53-68.

Jonathan E. T.(2006). Pediatric gastrointestinal and liver disease (third edition), 35-50 pp.

Kamgar, M. and Ghane, M.(2014) . Studies on *Bacillus subtilis*, as Potential Probiotics, on the Hematological and Biochemical Parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Appl Env Microbiol 2(5), 203-207.

Kelly, C. and Salinas, I. (2017). Under pressure: Interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. Frontiers in Immunology, 8, 559.

Kenneth. T. (2009). Diversity of metabolism in prokaryotes. In: Todars online book of bacteriology. Madison, Wisconsin.

Khalafalla, M.M.(2013). Nutritive value of diets containing digeston-1 as a feed additive for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. Journal of Aquaculture Research and Development.**4**(5):2-5p.

Kim, B.(2008). Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. Thyroid ,18(2):141–4.

Kim, D.H. ; Brunt, J. and Austin, B.(2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Appl Microbiol,102 (6): 1654-1664.

Kiron, A.P.V. and Watanabe, S.S.T.(2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Physiol Biochem 36(4), 969-977.

Krishna, ; Vadher, K. H. ; Harika, N. ; Ishakani, A. H. and Ayaz , S. M. K.(2018). Application of probiotics in Aquaculture . International Journal of Agriculture Innovations and Research , Vol. 6 : No. (5) , 2319-1473.

Kristiansen, M. ; Merrifield, D. L. ; Vecino, J. L. G. ; Myklebust, R. and Ringo, E.(2011). Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Aquaculture Research & Development,1,1–8.

Kumar, R. ; Mukherjee, S. C. ; Ranjan, R. ; Nayak, S. K.(2008). Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish Shellfish and Immunology, 24:168–172.

Landini, G.F. ; Schwantes, A.R. and Schwantes, M.L.(2002). *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae) haemoglobins: structure and function. Braz. J. Biol 62, 595-599.

Lara-Flores, M. ; Olvera-Novoa, M. A. and Olivera-Castillo, L. (2010). Effect of inclusion of a bacterial mix *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidopilus* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Fisheries and Aquaculture.;2:93-101.

Lara-Flores, M. ; Olvera-Novoa, M.A. ; Guzman-Mendez, B.E. and Lopez-Madrid, W.(2003).Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216: 193-201.

Lazado, C.C. ; Caipang,C.M. and Estante, E.G.(2015). Prospects of host associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. Fish Shellfish Immunol. 45(1):2-12.

Lazado, C.C. and Caipang, C.M.(2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. Fish & Shellfish Immunology. 39(1):78-89.

Leblanc, J. G. ; Milani, C. ; De Giori, G. S. ; Sesma, F. ; Van Sinderen, D. and Ventura, M.(2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective.Current Opinion in Biotechnology, 24:(2), 160–168.

Lenfant, C., and Johansen, K. (1972). Gas exchange in gill, skin, and lung breathing. Respiration Physiology, 14:(1-2), 211–218.

Li, H. ; Zheng, Z. ; Cong-xin, X. ; Bo, H. ; Chao-yuan, W. and Gang, H.(2009) . Isolation of cellulose-producing microbes from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. Environ Biol Fishes 86:131–135.

Li, X. ; Ringo, E. ; Hoseinifar, S. H. ; Lauzon, H. L. ; Birkbeck, H. and Yang, D.(2019). The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract. Reviews in Aquaculture, 11(3):603-618.

Li, Z. ; Bao, N. ; Ren, T. ; Han, Y. ; Jiang, Z. ; Bai, Z. ; Hu, Y. and Ding,J.(2019). The effect of a multi-strain probiotic on growth performance, non-specific immune response, and intestinal health of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. Fish Physiol. Biochem. 454 (45), 1393–1407.

Liong, M. T. and Shah, N. P. (2005). Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. J. Appl. Microbiol. 99: 783-93.

Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis,N.(2014). Fermenated milks : Range of Products. Encyclopedia of Food Microbiology, Vol. 1, 884-894 p.

Liu, H. ; Guo, X. ; Gooneratne, R. ; Lai, R. ; Zeng, C. ; Zhan, F. and Wang, W. (2016).The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. Sci Rep 6:24340.

Liu, W. ; Pang, H.; Zhang, H. and Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In Lactic Acid Bacteria; Zhang, H., Cai, Y., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands,pp. 103–203.

Liu, Z.; Li, L. ; Fang, Z. ; Lee, Y. ; Zhao, J. ; Zhang, H. ; Chen, W. ; Haitao Li, H. and Wenwei Lu, W.(2021). Integration of Transcriptome and Metabolome Reveals the Genes and Metabolites Involved in *Bifidobacterium bifidum* Biofilm Formation. Int. J. Mol. Sci, 22:(14) 2-16.

Lo Bianco, G. ; Mangiapane, E. ; Cirrincione, S. and Pessione, E.(2015). Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria isolated from olives: evaluation of short chain fatty acids production and

analysis of the extracellular proteome. Food Research International 67, 247-254.

Lopez, N. ; Cuzon, G. ; Gaxiola, G. ; Taboada, G. ; Valenzuela, M. ; Pascual, C. ; Sanchez, A. and Rosas, C.(2003). Physiological, nutritional, and immunological role of dietary b-1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture,224 : (1-4):223-243.

Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of armed forces institute of pathology . 3rd ed. New York .

MacKenzie, D.S. ; Jones, R.A. and Miller, T.C. (2009). Thyrotropin in teleost fish. Gen Comp Endocrinol ,161(1):83–9.

Marchalonis, J. and Edelman, G. M.(1966). Polypeptide Chaini of Immunoglobulins from the Smooth Dogfish *Mustelus canis*. Science, 154, 1567–1568.

Marks, L. R. ; Reddinger, R. M. and Hakansson, A. P. (2014). Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Infection and immunity.82(3):1141–6.

Maugars, G. ; Dufour, S. ; Cohen–Tannoudji, J. and Querat, B.(2014). Multiple thyrotropin b–subunit and thyrotropin receptor–related genes arose during vertebrate evolution. PloS One ,9(11):1-13.

McAninch, E.A. and Bianco, A.C. (2014). Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. Ann New York Acad Sci ,1311:77–87**.**

Mehdi, K. ; Hadadji, M. ; Benkaddour, B. ; Guessas, B. and Kihal, M.(2015). Resistance at Low Ph Values and Bile Tolerance for Selection of Bifidobacterium Strains Isolated from New Born Feces

as Potential Probiotic. Advances in Environmental Biology, 9(14) ,122-128 pp.

Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., & Hernández-Sánchez, H. (2012). *Lactobacillus plantarum*: An Overview with Emphasis in Biochemical and Healthy Properties. *Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications. Nova Publishing*, 1-31.

Melo, J. ; Ruiz-Pardo, R. ; Hume, M. ; Sidjabat, H. and Villamil-Diaz, L. (2020). Probiotics for cultured freshwater fish. Microbiology Australia.10.1071/MA20026.

Merrifield, D. L. and Carnevali, O. (2014). Probiotic modulation of the gut microbiota of fish. In D. L. Merrifield, & E. Ringø (Eds.), Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics, (pp. 185–222). Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing.

Merrifield, D. L. and Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues, in Mucosal Health in Aquaculture, ed. E. Peatman (San Diego, CA: Academic Press), 273–295.

Merrifield, D.L. ; Harper, G.M. ; Dimitroglou, A. ; Ringo, E. and Davies, S.J.(2010).Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Aquac Res,41:1268–1272.

Metchnikoff, E. (1907).The prolongation of life: Optimistic studies. G. P. Putnam & Sons, London , 376 pp.

Mhaisen, F. T. (1993). A review on the parasites and diseases in fishes of ponds and farms of Iraqi J. Vet. Sci., 6(2): 20-27.

Mohammadian, T. ; Alishahi, M. ; Tabandeh, M.R. ; Ghorbanpoor, M. and Gharibi, D.(2017). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii subsp . bulgaricus* on growth performance, gut microbial flora and digestive enzymes activities in *Tor grypus*

(Karaman, 1971) . Iranian Journal of Fisheries Sciences,16(1):296 – 317.

Mohapatra, S. ; Chakraborty, T. ; Prusty, A. K. ; PaniPrasad, K. and Mohanta, K. N.(2014). Beneficial Effects of Dietary Probiotics Mixture on Hemato-Immunology and Cell Apoptosis of *Labeo rohita* Fingerlings Reared at Higher Water Temperatures. PLoS One ,9(6):1-6.

Mohapatra, S. ; Chakraborty, T. ; Prusty, A.K. ; Das, P. ; Paniprasad, K. and Mohanta, K.N. (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of Rohu, *Labeo rohita* fingerling: Effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. Aquaculture Nutrition 18: 1-11.

Mukherjee, A. ; Chandra, G. and Ghosh, K.(2019). Single or conjoint application of autochthonous Bacillus strains as potential probiotics: effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquaculture 512, 734302.

Munir, M. B. ; Hashim, R. ; Nor, S. A. M. and Marsh, T. L.(2018). Effect of dietary prebiotics and probiotics on snakehead *Channa striata* health: Haematology and disease resistance parameters against Aeromonas hydrophila. Fish Shellfish Immun 75, 99-108.

Munoz-Atienza, E. ; Gomez-Sala, B, ; Araujo, C. ; Campanero, C. ; Del Campo, R. ; Hernández, P.E. ; Herranz, C. and Cintas, L. M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. BMC Microbiology. 13(1):1-15.

Mustafa, L.B.(2016). Inhibition Effect of *Bifidobacterium bifidus* Against Some Locally Isolates of Pathogenic Fungi Species, Tikrit Journal for Agricultural Sciences,16(4):176-183.

Nates, S.(2016). Aquafeed Formulation. 1st ed. Amsterdam: Academic Press; 2016 eBook ISBN: 9780128009956. Hardcover ISBN: 9780128008737.

Nayak, S. K. (2010a). Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, 41(11), 1553–1573.

Nayak, S.K. (2010b). Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish Shellfish Immunol 29: 2-14.

Newaj-Fyzul, A. ; Al-Harbi, A. H. and Austin, B. (2014). Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, 431:1–11.

Nikiforov-Nikishin, A. ; Nikiforov-Nikishin, D. ; Kochetko, N. ; Smorodinskaya, S. and Klimov, V.(2021). The influence of probiotics of different microbiological composition on histological structure of the organs of the gastrointestinal tract of juvenile *Oncorhynchus mykiss*. Microscopy Research and Technique, 85: (2):538-547.

Nikoskelainen, S. ; Ouwehand, A. C. ; 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.

Nikoskelainen, S. ; Salminen, S. ; Bylund, G. and Ouwehand, A.C.(2001). Characterization of the properties of human and dairy–derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Applied and Environmental Microbiology.;**67**(6):2430-2435.

Nimrat, S. ; Suksawat, S. ; Boonthai, T. and Vuthiphandchai. V. (2012). Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Veterinary Microbiology, 159:443-450.

Nopchinda, S. ; Varavithya, W. ; Phuapradit, P. ; Sangchai, R. ; Suthutvoravut, U. ; Chantraruksa, V. and Haschke, F.(2002). Effect of *bifidobacterium* Bb12 with or without *Streptococcus thermophilus* supplemented formula on nutritional status. J Med Assoc Thai. Vol. 85. No. 4. 1225–1231 pp.

NRC,(1993). Nutrient requirements of fish. Washington (DC):National Academic Press, Washington, DC, USA.114pp.

Nunez-Ortiz, N. ; Gerdol, M. ; Stocchi, V. ; Marozzi, C. ; Randelli, E. ; Bernini, C. ; Buonocore, F. Picchietti, S. ; Papeschi, C. ; Sood, N. ; Pallavicini, A. and Scapigliati, G. T.(2014). cell transcripts and T cell activities in the gills of the teleost fish sea bass *Dicentrarchus labrax*. Developmental and Comparative Immunology.47:309-318.

Oblinger, J.L. and Koburger, J.A. (1975). Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique." J. Milk Food Technol. 38(9), 540–545.

Olesen, N.J. and Jorgensen, P.E.V.(1986). Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. Dis. Aquat. Org. 1, 183–189.

Oluah, N.S.(1999). Plasma aspartate amino transferase activity in the catfish *Clarias albopunctatus* exposure to sublethal zinc and mercury. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 1999. 63:343 – 349.

Pannu, R. ; Dahiya, S. ; Sabhlok, V.P. ; Kumar, D. ; Sarsar, V. and Gahlawat, S.(2014). Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens. Ecotoxicol. Environ. Contam.9. 13-20.

Parra, D. ; Korytar, T. ; Takizawa, F. and Sunyer, J.O.(2016). B cells and their role in the teleost gut. Dev. Comp. Immunol. 64:150–166.

Pavli, F.; Tassou, C.; Nychas, G.J.E. and Chorianopoulos, N. (2018). Probiotic Incorporation in Edible Films and Coatings: Bioactive Solution for Functional Foods. Int. J. Mol. Sci.,19, 150.

Pech-Canul, A. D.L.C. ; Ortega,D. ; Garcia-Triana,A. ; Gonzalez-Silva,N. and Solis-Oviedo, R.L.S.(2020). A Brief Review of Edible Coating Materials for the Microencapsulation of Probiotics, journal of coatings and surface engineering, 10, 197,34pp.

Peyghan, R. and Jalaly, M.R.(2008). Study of normal serum enzyme (ALT,AST,ALP,LDH) levels in common carp , grass carp and silver carp.pajouhesh and sazandegi, 58 :90-93.

Pillay, T.V.R. and Kutty, M.N.(2005). Aquaculture: Principles and Practices. 2nd Blackwell Publishing, pp 321-351.

Pirarat, N. ; Pinpimai, K. ; Endo, M. ; Katagiri, T. ; Ponpornpisit, A. ; Chansue, N. and Maita, M.(2011). Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus GG*. / Research in Veterinary Science, 91:92–97.

Power, D.M. ; Elias, N.P. ; Richardson, S.J. ; Mendes, J. ; Soares, C.M. and Santos, C.R.A.(2000). Evolution of the thyroid hormone binding protein, transthyretin. Gen.Comp. Endocrinol. 119 (3):241-255.

Power, D.M. ; Llewellyn, L. ; Faustino, M. ; Nowell, M.A. ; Bjornsson, B.T. ; Einarsdottir, I.E. ; Canario, A.V.M. and Sweeney, G.E.(2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. Comp. Biochem. Physiol. 130 (4): 447-459.

Puvanasundram, P. ; Chong, C. M. ; Sabri, S. ; Yusoff, M. S. and Karim, M.(2021). Multi-strain probiotics: Functions, effectiveness and formulations for aquaculture applications.Aquaculture Reports, 21 ,100905, 1-14 pp.

Puvanendran, V.; Rud, I.; Msw, B.; Arnesen, J. and Axelsson, L. (2021). Probiotic *Carnobacterium divergens* increase growth parameters and disease resistance in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae without influencing the microbiota. Aquaculture, 532, 736072.

Rabah, S.A. ; Gowan, I.L. ; Pagnin, M. ; Osman, N. and Richardson, S.J.(2019). Thyroid hormone distributor proteins during development in vertebrates. Front Endocrinol ,10:506.

Rahman, A. ; Shefat, S.H.T. ; Chowdhury, M.A. and Khan,S.U.(2021). Effects of Probiotic *Bacillus* on Fish Growth Performance, Immune Response and Disease Resistance in Aquaculture. Preprints (www.preprints.org), doi:10.20944/preprints202103.0075.v1.

Ramos, M.A. ; Goncalves, J.F. ; Costas, B. ; Batista, S. ; Lochmann, R. Pires, M.A. ; Rema,P. and Ozório, R.O.A.(2017). Commercial Bacillus probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. Aquac. Res. 48: 2538-2549.

Rauta, P.R. ; Nayak, B.N. and Das, S.(2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Immunol. Lett.148, 23–33.

Rawls, J. F. ; Samuel, B. S. ; Gordon, J. I.(2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. Proc. Natl Acad Sci 101,(13):596–601.

Rebl, A. ; Seibel, H. ; Babmann, B.(2021). Blood Will Tell: What Hematological Analyses Can Reveal About Fish Welfare. Front. Vet. Sci. 8, 194.

Reda, R. M. ; .Ibrahim, R. E. ; Ahmed, E. G. and El-Bouhy, Z. M.(2013). Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the

health status of cultured *Oreochromis niloticus*." The Egyptian Journal of Aquatic Research 39.4 : 241-248.

Rhody, N. R. ; Puchulutegui, C. ; Taggart, J. B. ; Main K.L. ; Migaud, H. (2014). Parental contribution and spawning perfor-mance in captive common snook Centropomus undec-imalis broodstock. Aquaculture 432, 144-153.

Richards, G.P. ; Watson, M.A. ; Needleman, D.S. ; Uknalis, J. ; Boyd, E.F. and Fay, J.P.(2017). Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-induced killing of vibrios and other bacterial pathogens. Applied and Environmental Microbiology.83(11):17-175.

Ringo, E. ; Hoseinifar, S. H. ; Ghosh, K. ; Van Doan, H. ; Beck, B. R. and Song, S. K. (2018). Lactic acid bacteria in finfish-an update. Frontiers in Microbiology, 9,1818,1-37.

Ringo, E. ; Van Doan, H. ; Lee, S.H. ; Soltani4, M. ; Hoseinifar, S.H. ; Harikrishnan, R. and Song, S.K.(2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture, Journal of Applied Microbiology.129,116-136 .

Ringo,E.(2019). Probiotics in shellfish aquaculture. Aquaculture and Fisheries,Vol. 5 (1) : 1-27.

Rohyati, I. S. (2015). Improved of growth rate of abalone haliotis asinine fed pudding probiotic-enriched protein. Procedia Environ. Sci. 23, 315–322.

Rombout, J. H. ; Abelli, L. ; Picchietti, S. ; Scapigliati, G. and Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. Fish Shellfish Immunol. 31, 616–626.

Sadaghdar, Y. ; Mortazavian, A.M. and Ehsani, M.R.(2012). Survival and activity of 5 probiotic lactobacilli strains in 2 types of flavored fermented milk , Food Sci. Biotechnol, 21, 151-157 pp.

Sahandi,J. ; Jafaryan,H. ; Soltani, M. and Ebrahimi, P. (2018). The Use of Two Bifidobacterium Strains Enhanced Growth Performance and Nutrient Utilization of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Fry. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11(3):966-972.

Sahoo, M. ; Edholm, E.S. ; Stafford, J.L. ; Bengten, E. ; Miller, N.W. and Wilson, M.(2008).B cell receptor accessory molecules in the channel catfish, Ictalurus punctatus. Dev. Comp. Immunol.32, 1385–1397.

Salminen, S. ; Isolauri, E. and Salminen, E.(1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains for future challenges. Anton van Leeuwenhoek,70:347-358.

Sandrini, S. ; Aldriwesh, M. ; Alruways, M. and Freestone, P.(2015). Microbial endocrinology: host-bacteria communication within the gut microbiome.J Endocrinol,225 (2):21–34.

Saravanan, K. ; Sivaramakrishnan, T. ; Praveenraj, J. ; Kiruba-Sankar, R. ; Haridas, H. ; Shailesh Kumar, S. and Varghese, B. (2021). Effects of single and multi-strain probiotics on the growth, hemato-immunological, enzymatic activity, gut morphology and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* . Aquaculture 540 :736749, 1-8 pp.

Schmalhousen ، L.(1926). Studien uber washtum and differenzierung III.Die embryonale wachsturm skurve des hiichens.Wilhem roux.Arch entwic klungsmech.Org 322-387.

Semova, I. ; Carten, J.D. ; Stombaugh, J. ; Mackey, L.C. ; Knight, R. ; Farber, S.A. and Rawls, J.F.(2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. Cell Host Microbe 12, 277–288.

Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. Int. Dairy J., 17:1262–77.

Shah,P.N.(2011). Encyclopedia of Dairy Sciences.Elsevier Ltd,Vol.1, 381–387 pp.

Sharma, P., Sihag, R.C Gahlawat, S.K. (2013). Effect of probiotic on haematogical paramaters of diseased fish (*Cirrihinus mrigal*). J Fish Sci 7(4), 323-328.

Shefat,T. and Hossain, S.(2018). Probiotic Strains Used in Aquaculture. International Research Journal of Microbiology, Vol. 7(2) , 43-55pp.

Shori, A.B.(2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival during Gastric Transit. HAYATI J. Biosci.24, 1–5.

Silarudee, S. ; Tongpim, S. ; Charoensri, N. and Doolgindachbaporn, S. (2019). Effect of a Probiotic *Lactobacillus plantarum* CR1T5 Dietary Supplements on Non-specific Immunity in Black Eared Catfish *Pangasius larnaudii*. Journal of Pure and Applied Microbiology. 13. 289-296.

Silva,M. ; Tulini, F.L. ; Matos, F.E. ; Oliveira, M.G. ; Thomazini, M. and Favaro-Trindade, C.S. (2018). Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions. Food Hydrocoll, 83, 109–117.

Solem, S.T. and Stenvik, J.(2006). Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. Dev.Comp. Immunol. 30, 57–76.

Sreekumar, O. and Hosono, A.(2000). Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of *Escherichia coli* in Co-culture. Journal of Dairy Science, 83, 931–939.

Standen, B. T. ; Peggs, D. L. ; Rawling, M. D. ; Foey, A. ; Davies, S. J. ; Santos, G. A. and Merrifield, D. L. (2016). Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*.Fish & Shellfish Immunology, 49,427-435.

Standen, B. T. ; Rodiles, A. ; Peggs, D. L. ; Davies, S. J. G. A. Santos, G. A. and Merrifield, D. L.(2015). Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99 , 8403-8417.

Strandwitz, P.(2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. Brain Res.1693:128–33.

Subedi, B. and Shrestha, A.(2020). Application of probiotics in Aquaculture. International Journal of Forest, Animal and Fisheries Research,Vol.4 : 5,52-60.

Sumi, C.D. ; Yang, B.W. ; Yeo, I.C. and Hahm, Y.T.(2015). Antimicrobial peptides of the genus Bacillus: a new era for antibiotics. Can J Microbiol.61:93–103.

Susmita, D. ; Kausik, M. and Haque, S. (2017). Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture,422-429.

Suzer, C. ; Coban, D. ; Kamaci, H.O. ; Saka, S. ; Firat, K. ; Otgucuoglu, O. and Kucuksari, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture 280: 140-145.

Swarnendu, C. ; Urmimala, C. and Rajarshi, B.(2010). Development and assessment of a pofish feed to assist in aquaculture nutrition management. Research,2(5):63-75.

Tallapragada, P. ; Rayavarapu, B. ; Rao, P. P. ; Ranganath, N. N. and Veerabhadrappa, P. P.(2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,16 ,357–362.

Talwar, C. ; Nagar, S. ; Lal, R. and Negi, R. K. (2018). Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. Indian J Microbiol , 58(4):397–414.

Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. (1999). Yoghurt Science and Technology, 2 Eds., Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.

Tan, L. T. ; Chan, K. G. ; Lee, L. H. and Goh, B. H. (2016). *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. Frontiers in Microbiology, 7, 79.

Tan, H.Y. ; Chen, S.W. and Hu, S.Y.(2019). Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol. 92: 265-275.

Tannock, **G. (2010).**Analysis of Bifidobacterial populations in bowel ecology studies. In B. Mayo and D. van Sinderen .ed. Bifidobacteria. Genomics and Molecular Aspects Caister Academic Press, Illustrated edition. ISBN-10 :1904455689,274 pp.

Tarnecki, A. M. and Rhody, N. R. (2017). Microbiota of common snook Centropomus undecimalis larvae exhibiting high mortality. Aquac Res 48, 5693-5698.

Volkoff,H. and Rønnestad,I.(2020). Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. Temperature,23328940-1765950. doi:10.1080/23328940.2020.1765950

Terraf, M. C. ; Juarez, M. S. ; Nader-Macias, M. E. and Silva, C.(2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components.Journal of Applied Microbiology, 113(6), 1517–1529.

Timmerman, H.M. ; Koning, C.J.M. ; Mulder, L. ; Rombouts, F.M. and Beynen, A.C.(2004). Monostrain, multistrain and multispecies

probiotics—A comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol. 96, 219–233.

Tissier, H. (1899). Recherches sur la flora intestinale normale et pathologique du nourisson. Thesis, University of Paris, Paris, France. 253.

Trisnawita, Y. ; Silalahi, J. And Sinaga,S.M.(2018). The Effect of Storage Condition on Viability of Lactic Acid Bacteria in Probiotic Product. Asian J Pharm Clin Res, 1 : (11),84-86 pp.

Tuan, T. ; Pham Minh, D. and Hatai, K. (2013). Overview of the use of probiotics in aquaculture. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture. 3. 89-97.

Ullah, A. ; Zuberi, A. ; Ahmad, M. ; Shaha, A.B. ; Younus, N. ; Ullah, S. and Khattak,M.N.K.(2018). Dietary administration of the commercially available probiotics enhanced the survival, growth, and innate immune responses in Mori (*Cirrhinus mrigala*) in a natural earthen polyculture system . Fish and Shellfish Immunology 72 ,266–272.

Uriot a b, O. ; Denis a, S. ; Junjua b, M. ; Roussel b, Y. ; Dary-Mourot b, and Blanquet-Diot, S.(2017). *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? . Journal of Functional Foods 37 , 74–89 p.

Utami, F.(2013). The Effect of Temperature on Life Resistance of Bacteria on Probiotic Preparations. Thesis. Jakarta, Indonesia: Graduate School of the Faculty of Pharmacy,Islamic University of Syarif Hidayatullah.

Uten ، F. (1978). Standard methods and terminology in finfish nutritions from: proc.World symp on finfish nutrition and fish feed technology. Hamburg، 20-23 June 1978. Vol. II Berlin.

Van de Pol, I. ; Flik, G. and Gorissen, M.(2017). Comparative physiology of energy metabolism:fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool, Frontiers in Endocrinology, 8, 36.

Verschuere, L. ; Rombaut, G. ; Sorgeloos, P. and Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Review 64, 655–671.

Vieco-Saiz, N. ; Belguesmia ,Y. ; Raspoet , R. ; Auclair, E. ; Gancel , F. ; Kempf, I. and Drider, D.(2019). Benefits and Inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production,Front. Microbiol., 10 (57),1-17pp.

Villamil, L. ; Figueras, A. ; Planas, M. and Novoa, B.(2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture.**219**:43-56.

Vinderola, C. G. and Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘‘in vitro’’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36, 895–904.

Wang, A.R. ; Ran, C. ; Ringo, E. and Zhou, Z.G.(2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. Rev Aquacult, 10(3): 626-640.

Wang, X. ; Li, H. ; Zhang, X. ; Li, Y. ; Ji, W. and Xu, H.(2000). Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). J Ocean Univ Qingdao. 30:493-498.

Wanka, K. M. ; Damerau, T. ; Costas,B. ; Krueger, A. ; Schulz, C. and Wuertz, S.(2018). Isolation and characterization of native probiotics for fish farming. BMC Microbiology, 18:119,1-13 pp.

Watson, R.R. and Preedy, V.R.(2013). Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease, 1st. edition Elsevier science, 465-483 pp.

Watts, J.E.M. ; McDonald, R. ; Daniel, R. and Schreier, H.J.(2013) Examination of a culturable microbial population from the gastrointestinal tract of the wood-eating loricariid catfish Panaque nigrolineatus. Diversity 5:641–656.

Welker, T. L. and Lim, C.(2011). Use of Probiotics in Diets of Tilapia. J . Aquac Res. Development, S1:0,14.2-8 pp.

Wu, Z. Q. ; Jiang, C. ; Ling, F. and Wang, G. X. (2015). Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate immunity and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture, 438, 105–114.

Yan, Q. ; Li, J. ; Yu, Y. ; Wang, J. ; He, Z. ; Nostrand, J.D.V. ; Kempher, M. L. ; Wu, L. ; Wang, Y. ; Liao, L. ; Li, X. ; Wu, S. ; Ni, J. ; Wang, C. ; Zhou, J. (2016). Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. Environ Microbiol, 18(12): 4739-4754.

Yang, G. ; Cao, H. ; Jiang, W. ; Hu, B. ; Jian, S. ; Wen, C. ; Kajbaf, K. ; Kumar, V. ; Tao, Z. and Peng, M.(2019). Dietary supplementation of Bacillus cereus as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. Aquaculture Research, 50, 2207–2217.

Yang, N.J. and Chiu, I.M.(2017). Bacterial signaling to the nervous system through toxins and metabolites. J Mol Biol. 429:587–605.

Yano, J. M. ; Yu, K. ; Donaldson, G. P. ; Shastri, G. G. ; Ann, P. ; Ma, L. ; Nagler, C. R. ; Ismagilov, R. F. ; Mazmanian, S. K. and Hsiao, E. Y.(2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. Cell,161:264–76.

Yassine, T. ; Khalafalla, M. M. ; Mamdouh, M. ; Elbialy, Z.I. ; Salah, A.S. ; Ahmedou, A. ; Mamoon, A. ; El-Shehawi, A.M. ; Doan, H.V. ; Dawood, M.A.O.(2021). The enhancement of the growth rate, intestinal health, expression of immune-related genes, and resistance against suboptimal water temperature in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by dietary paraprobiotics. Aquaculture Reports ,20 ,100729.

Ye, J. ; Kaattari, I. M. ; Ma, C. and Kaattari, S.(2013). The teleost humoral immune response. Fish Shellfish Immunol, 35:1719–1728.

Yousefi, S. ; Hoseinifar, S.H. ; Paknejad, H. and Hajimoradloo, A. (2018). The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish *Danio rerio*, Fish & shellfish immunology.; 73:192-196.

Zhang, L.S. and Davies, S. S.(2016). Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. Genome Med,8:46, 1-18.

Zhang, Q. ; Ma, H. ; Mai, K. ; Zhang, W. ; Liufu, Z. and Xu, W.(2010). Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Fish Shellfish Immunol. 29, 204–211.

Zhou, Q. C. ; Buentello, J. A. and Gatlin, D. M. (2010). Effects of dietary probiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture, 309(1-4), 253–257.

Zolotukhin, P. V., Prazdnova, E. V., and Chistyakov, V. A. (2018). Methods to assess the antioxidative properties of probiotics. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(3), 589–599.

Zuo, Z. H. ; Shang, B. J. ; Shao, Y. C. ; Li, W.Y. and Sun, J. S. (2018). Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 86, 160–168.

Abstract

This study was conducted to determine the effect of using three bacterial isolates from lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* 4453, *Bifidobacterium bifidum* 5144, and *Streptococcus thermophilus* 5935 in form single and multiple bacterial isolates probiotics with two dilutions 10^{-6} and 10^{-7} of each probiotic on growth performance, blood, immunity,the histomorphometrics parameters of mid intestine,and the chemical and microbial composition of common carp fingerlings that were reared in experimental floating containers for a period of 12 weeks from 3/3/2022 to 6/3/2022 in Al-Muthanna Governorate in the first agricultural research and experiments station in Umm Al-Akaf region, which is far about 570 m from the Euphrates River. according to the coordinates E 45.189309 N,31.321394.

288 fish with an average weight of 44±0.69 g were used and randomly distributed into 16 treatments. Control treatment A was without any additives, control treatment B contained a suspension of gum Arabic and phosphate buffer salt, and 7 probiotic treatment, The first treatment contained the bacterial isolate *Lactobacillus acidophilus* 4453, the second treatment contained *Bifidobacterium bifidum* 5144, the third treatment contains the bacterial isolate *Streptococcus thermophilus* 5935, the fourth treatment contains the two isolates *Lactobacillus acidophilus* 4453 and *Bifidobacterium bifidum* 5144, the fifth treatment contains *Lactobacillus acidophilus* 4453 and *Streptococcus thermophilus* 5935, and the sixth treatment contains *Bifidobacterium bifidum* 5144 and *Streptococcus thermophilus* 5935, As for the seventh treatment, it contains *Lactobacillus acidophilus* 4453, *Bifidobacterium bifidum* 5144, and *Streptococcus thermophilus* 5935 at a dilution of 10^{-7}, and the same seven treatments at a dilution of 10^{-7}, with three replicates of each treatment, and each replicate contains 6 fish. A standard diet was prepared with a protein content of 29.14% and a gross energy of 417.95 kcal/g. Probiotics were added at a rate of 10 ml per 100 g of the experimental diet as a carrier for the probiotics for both dilutions. The fish were fed experimental diets at rate %3, %4, and %5 from their weight daily.

The results of the statistical analysis showed that all probiotic treatments were better than the Control treatments A and B, and the seventh probiotic treatment considered the best among the other experimental treatments, as the results indicated that there were significant differences ($p \leq 0.05$) between it and all treatments of most studied parameters, as it was recorded of the two dilutions 10^{-6} and 10^{-7}, the highest values of weight gain attained 196.34±2.63 and 189.82±0.31 g, and it recrded the highest values of the daily growth rate attained 2.33±0.03 and 2.25±0.003g/day. the highest values of the relative growth rate attained %448.98±8.29 and 426.92±2.60

and these values did not differ significantly from the values of the the sixth probiotic treatment %432.31±3.12 and 426.02±3.69, the seventh probiotic treatment recorded the highest values of the specific growth rate 2.02±0.01 and 1.97±0.005 %/day which dosenot differ significantly from the sixth probiotic treatment which recorded values attained 1.99±0.007 and 1.97±0.008%/day.
The sixth probiotic treatment recorded the highest values of the thermal growth coefficient attained %0.12±0.00 and 0.13±0.00 and these values did not differ significantly from the values of the seventh probiotic treatment %0.13±0.001 and 0.13±0.00. As for metabolic growth rate ,the seventh probiotic treatment was significantly exceeded ($p \leq 0.05$) on the other experimental traetments, as it recorded the highest values of mentioned parameter attained 11.65±0.09 and 11.41±0.02 g/kg/day. The best feed conversion rate was calculated of fish fed the diet of the sixth probiotic treatment, which recorded values attained 1.74±0.04 and 1.73±0.04 with a feed conversion efficiency of 57.30±1.56 and 57.81±1.58 and the highest protein efficiency ratio1.96±0.05 and 1.98±0.05

There were significant differences recorded of Red blood cells (RBC) between the experimental treatments as the seventh and sixth probiotic treatments achieved the highest values attained 2.45 ± 0.39 and 2.07 ± 0.36 $*10^6$ cells/mm3, and 2.36 ± 0.35 and 1.83 ± 0.27 $*10^6$ cells/ mm3 respectively without any significant difference between them. The seventh treatment also achieved the highest values of hemoglobin attained 9.55 ± 0.45 and 8.26 ± 0.14 g/dL, and the highest values of hematocrit attained 28.42 ± 0.66 and 26.50 ± 0.99%. There were significant differences found among the values of white blood cells of the experimental treatments as the seventh probiotic treatment was exceeded and recorded the highest values of mentioned parameter attained 214.05 ± 1.83 and 209.18 ± 1.18 $*10^3$ cells/mm3 and it was achieved the highest values of Immunoglobulin (IgM) attained 0.0061 ± 0.001 and 0.0072 ± 0.0003 g/L.

The seventh probiotic treatment achieved the highest values of Thyroid-stimulating hormone (TSH) attained 0.65 ± 0.05 and 0.62 ± 0.04 mcIU/ml, and thyronine (T3) attained 5.80 ± 0.30 and 5.10 ± 0.10 nmol/L, and thyroxine attained 9.09 ± 0.90 and 8 0.76±0.46 nmol/L. as for blood performance The seventh probiotic treatment achieved the highest values attained 13.42±0.24 and 12.98±0.15 which doesn't differ significantly from the sexth probiotic treatment which attained 13.29±0.32 and 12.71±0.24 respectively.The seventh probiotic treatment achieved the highest values of all histolomorphometric parameters, such as the thickness of the mucous layer 822.50±2.50 and 787.50±2.50 µm, the thickness of the submucosal layer 126.00±0.00 and 120.25±0.75 µm, the thickness of the muscular layer 186.25±1.25 and 183.12±0.62 µm, and the thickness of the serosa layer 66.50±1.50. And 61.50 ± 1.50 µm, the number of goblet cells 56.50 ± 0.50 and 55.00 ± 1.00 and the number of micro villi per segment 13.75 ± 0.00 and 12.37 ± 0.62 and the length of the micro villi 722.50

± 0.00 and 718.12 ± 3.12 µm and the width of micro villi 215.00 ± 0.00 and 205.00 ± 0.00 µm, It also achieved the highest values for the total microbial count of the intestinal tract, 2.35±0.15 and 1.75±0.05 $*10^{-9}$.

We conclude from this study that the use of probiotics with double and triple combinations with dilutions 10^{-6} and 10^{-7} in the diet of fingerlings of common carp fish enhanced growth,some blood,immunolo, thyroid hormones and histological parameters of experimental fish.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

AL-Muthanna university/Agriculture college

Animal Production Department

Effect of using of Probiotics on some productive, Immunological and Physiological characteristics of Common carp *Cyprinus carpio* L.

A dissertation

Submitted to the Council of the College of Agriculture /
University of Al-Muthanna
As partial fulfillment of the requirement for the degree of
philosophy doctorate in
agriculturist science - Animal production - fish nutrition

Preparation

Ahmed Radhi Jabbar

Supervised By

Prof. Dr. Ali Hussein Salman

2023 AM **1445 AH**