فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۹۳- ۱۰۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰

بررسی امکان ایجاد تغییر در جوامع باکتریایی دستگاه گوارش ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از پربیوتیک مخمری

رودابه روفچایی *: کارشناس ارشد تغذیه و غذای زنده، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی، ایران، r_rufchaie@yahoo.com
سید حسین حسینی فر: استادیار شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، hoseinifar@gau.ac.ir
منیره فیید: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی، ایران، m_faeed@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده‌ای به جنس‌ها و گونه‌های مختلفی متعلق هستند که بخش زیادی از آن‌ها از دسته باکتری‌های گرم منفی هستند. با این حال در برخی از ماهی‌ها باکتری‌های گرم مثبتی مانند *لاکتوباسیلوس‌ها* به‌عنوان بخش کوچکی از میکروبیوتای روده‌ای مشاهده می‌شوند که اهمیت بسیاری به عنوان پروبیوتیک دارند. هدف از این مطالعه، بررسی امکان تغییر در ترکیب میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید و افزایش سطوح باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از پربیوتیک مخمری بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی، در ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام شد که در آن‌ها بچه ماهی‌های سفید با سطوح صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد پربیوتیک مخمری در جیره به مدت ۶۰ روز تیمار شدند. در انتهای دوره تغییرات ایجاد شده در میکروبیوتای روده‌ای شامل سطوح باکتری‌های اسید لاکتیک، تعداد کل باکتری‌های هوازی، نسبت باکتری‌های اسید لاکتیک به تعداد کل باکتری‌ها و تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی اجباری از طریق کشت روی محیط‌های MRS، TSA، SPS بررسی شد. همچنین برای تشخیص گونه‌ای *لاکتوباسیلوس‌ها* از آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی استفاده شد.

نتایج: بیش‌ترین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در تیمار ۰/۵ درصد و کم‌ترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد (P value<۰/۰۵). همچنین، تیمار بچه‌ماهی‌های سفید با ۰/۵درصد پربیوتیک مخمری به‌طور معناداری تعداد کل باکتری‌ها را افزایش داد (P value<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان باکتری‌های بی‌هوازی اجباری در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان در تیمار ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده شد (P value<۰/۰۵). بررسی‌های تشخیصی حاکی از وجود گونه‌های *Lactobacillus plantarum*، *L. casei* و *L. acidophilous* در میکروبیوتای روده ای پس از مصرف پربیوتیک مخمری در جیره بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از ۰/۵ درصد پربیوتیک مخمری در جیره ماهی سفید سبب تغییرات معناداری در میکروبیوتای روده‌ای به سمت جوامع میکروبی بالقوه مفید و افزایش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پربیوتیک مخمری، میکروبیوتای روده‌ای، ماهی سفید، باکتری‌های اسیدلاکتیک

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

طیف گسترده‌ای از میکروب‌هایی که در محیط‌های آبی، خاکی، رسوبات و غذا یافت می‌شوند در دستگاه گوارش ماهیان نیز متمرکز شده و میکروبیوتای روده‌ای را تشکیل می‌دهند. اگرچه حضور باکتری‌های بومی در دستگاه گوارش ماهیان شناخته شده است، اما اطلاعات محدودی در زمینه جوامع میکروبی، استقرار، تنوع و مهم‌تر از همه امکان تغییر آن به سمت جوامع باکتریایی مفید وجود دارد (۱). ترکیب و ساختار میکروبیوتای روده ای ماهی به گونه‌ای است که تحت تأثیر محیط پیرامون قرارگرفته و گونه‌های مختلف میکروبی بر سر جایگاه‌های محدود اتصال، مواد مغذی و انرژی قابل دسترس با هم رقابت می‌کنند. اگر چه ترکیب میکروبیوتای روده به عواملی چون ژنتیک، تغذیه و محیط بستگی دارد ولی به‌طور کلی دستگاه گوارش ماهی دارای جمعیتی معادل 10^8 تا 10^7 باکتری به ازای هر گرم وزن روده است (۲). حضور طبیعی میکروبیوتای بومی و حفاظتی در دستگاه گوارش از طریق مکانیسم حذف رقابتی، گسترش و تکامل سیستم ایمنی را به همراه داشته و به منزله کلید برای حفظ سلامت ماهی عمل می‌کند (۳).

پربیوتیک‌ها، ترکیبات غذایی غیر قابل هضمی هستند که باعث تحریک رشد و تکثیر یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های روده شده و بدین ترتیب سلامت میزبان را بهبود می‌بخشند (۴). این ترکیبات غذایی که قابل تخمیر هستند، بستر مناسبی را برای رشد باکتری‌های پروبیوتیکی بخصوص *لاکتوباسیلوس‌ها* و *بیفیدوباکترها* فراهم کرده و سبب افزایش تعداد و غالبیت آن‌ها می‌شوند (۵). گزارش‌های محدودی درباره امکان تغییر میکروبیوتای روده ای آبزیان از طریق به کارگیری پربیوتیک‌ها در جیره غذایی وجود دارد (۶) و هنوز بسیاری از جنبه‌های آن ناشناخته مانده است (۷). از جمله مطالعات انجام شده در این زمینه می‌توان به بررسی آثار پربیوتیک الیگوفروکتوز و اینولین بر میکروبیوتای روده‌ای ماهی توربوت (۸)، فیل ماهی (۹)، ماهی چار قطبی (۱۰) و تاس ماهی سیبری (۱۱) اشاره کرد. با وجود این اطلاعات محدود، امکان ایجاد تغییر در میکروبیوتای روده‌ای ماهی سفید به سمت جوامع بالقوه مفید (*لاکتوباسیلوس‌ها*) با استفاده از پربیوتیک تاکنون بررسی نشده است.

بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین پتانسیل تغییر میکروبیوتای روده ای و سوق دادن آن به سمت جوامع بالقوه مفید با استفاده از سطوح مختلف پربیوتیک مخمری در جیره غذایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه تغذیه و غذای زنده شمال کشور واقع در ساحل بندر انزلی انجام شد. تعداد ۲۵ عدد بچه ماهی سفید بازای هر تانک فایبرگلاس با میانگین وزن اولیه ۰/۰۶ ± ۱/۱۵ گرم تأمین شده و به شکل تصادفی در ۱۵ تانک فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری که تا ۸۰ لیتر آب‌گیری شده بود توزیع شدند. بچه ماهی‌ها با سطوح مختلف پربیوتیک مخمری (صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد به ازای کیلوگرم جیره) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. پربیوتیک مورد استفاده در این مطالعه یک محصول تجاری تولید شده از مخمر خشک بود.

در انتهای دوره به منظور بررسی آثار احتمالی پربیوتیک مخمری بر جوامع باکتریایی میکروبیوتای روده‌ای، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک، تعداد کل

باکتری‌های بی‌هوازی و نیز تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در روده بچه ماهی سفید تعیین شد. بدین ترتیب که در انتهای دوره به‌طور تصادفی نمونه‌برداری از ماهیان انجام شد و برای از بین بردن کامل باکتری‌های موجود در سطح خارجی بدن بچه ماهی‌ها، به مدت ۶۰ ثانیه در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد شسته شده و پس از آن دوباره با آب استریل شستشو داده شد (۱۲).

نمونه‌های روده پس از تخلیه کامل محتویات، توزین و برای هموژن نمودن به هاون چینی استریل منتقل شد. پس از هموژن کردن نمونه‌های روده با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۷}$ تهیه شد. از رقت‌های تهیه شده، تحت شرایط کاملاً ضد عفونی حجمی معادل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته شد و به محیط‌های کشت Tryptic Soy Agar یا TSA (به منظور تعیین تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر موجود در میکروبیوتای روده)، محیط کشت DeMan, Rogosa and Sharpe یا MRS (برای تعیین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک) و محیط کشت Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (برای تعیین تعداد کل باکترهای بی‌هوازی) منتقل و در سطح پلیت پخش شد (۱۰). انکوباسیون پلیت‌ها برای بررسی تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای اتاق و به مدت ۵ روز انجام شد (۱۳). برای کشت باکتری‌های بی‌هوازی اجباری با استفاده از جار بی‌هوازی و کل باکتری‌های زیست‌پذیر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون انجام شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، باکتری‌های هر پلیت توسط دستگاه جدایه شمار[1] شمارش و برحسب لگاریتم واحد جدایه[2] در وزن روده محاسبه شد (۹).

تعیین جنس و گونه از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی: با توجه به اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک، هریک از جدایه‌های به دست آمده در پلیت‌های MRS آگار پس از شمارش، براساس رنگ، شفافیت، اندازه و ظاهر آن‌ها در پلیت‌های MRS آگار کشت مجدد داده شده و در جار بی‌هوازی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از رشد، هر کدام به طور جداگانه در MRS مایع تلقیح، روی آن‌ها پارافین مایع استریل ریخته و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس، در هر یک از لوله‌ها ۰/۲ میلی‌لیتر گلیسرول ۳۰ درصد ریخته شد. محتویات لوله در ویال‌های اپندورف استریل ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای مطالعات تشخیص گونه‌ای نگهداری شد.

آزمون‌های کاتالاز، KOH، حرکت و رنگ‌آمیزی به روش گرم روی جدایه‌ها انجام شد. به منظور مشاهده رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در اسیدیته‌های متفاوت، محیط کشت MRS مایع تهیه شده و قبل از استریل کردن به آن قطره قطره HCL یک نرمال تا رسیدن به اسیدیته ۴/۴ اضافه شد. برای اسیدیته قلیایی هم از هیدروکسید پتاسیم استفاده شد تا زمانی که اسیدیته به ۹/۶ رسید (۱۰). همچنین، محیط کشت MRS مایع با ۶/۵ درصد NaCl تهیه و در آن کشت انجام شد. نمونه‌ها

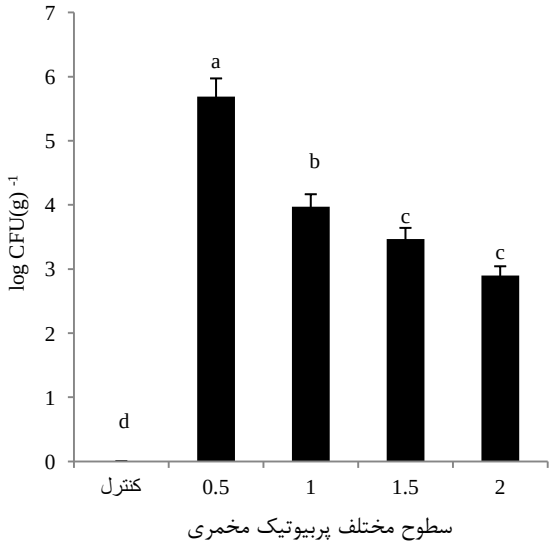
در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و تا ۷ روز رشدشان با لوله شاهد مقایسه و بررسی شد. به‌علاوه رشد جدایه‌ها در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه تا مدت یک هفته بررسی شد (۱۴ و ۱۵). برای انجام آزمایش تخمیر قند از ترکیبات محیط MRS مایع استفاده شد و به جای گلوکز و عصاره گوشت هر بار به آن یک درصد از هر یک از قندهای مورد بررسی اضافه شد. پس از تلقیح، روی محیط‌ها پارافین مایع استریل ریخته شده و در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و نتیجه تا ۷ روز بررسی شد (۱۶- ۱۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با توجه به نرمال بودن داده‌ها برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف از تحلیل واریانس یک‌طرفه[۳] و آزمون توکی استفاده شد. برای رسم نمودارها از برنامه اکسل (۲۰۰۳) و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۳) استفاده شد.

نتایج

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، گونه‌های *L. plantarum*، *casei L* و *L. acidophilus* به ترتیب در ۱۶، ۷ و ۳ کلونی جدا شده تشخیص داده شد؛ و همان‌طور که جدول ۲ ملاحظه می‌شود در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد بیش‌ترین تنوع گونه‌ای جدا شده تشخیص داده شد.

آثار سطوح مختلف پربیوتیک مخمری بر سطوح باکتری‌های اسید لاکتیک (برحسب لگاریتم واحد کلونی در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید در شکل ۱ نشان داده شده است. استفاده از سطح ۰/۵درصد از پربیوتیک مخمری به‌طور معناداری سبب افزایش باکتری‌های لاکتو باسیلوس در میکروبیوتای روده‌ای شد (*P value*< ۰/۰۵). تعداد باکتری‌های لاکتیک در تیمار شاهد کمتر از حد قابل شمارش از نظر آماری (بین ۳۰ تا ۳۰۰ جدایه در پلیت) بود. در تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک مخمری سطوح مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوس مشاهده شد که بیش‌ترین میزان آن در تیمار ۰/۵ درصد و کم‌ترین میزان در تیمارهای ۱/۵ و ۲ درصد به‌دست آمد. از نظر آماری اختلاف معناداری بین تیمارهای ۱/۵ و ۲ درصد از نظر سطوح باکتری‌های اسید لاکتیک مشاهده نشد (*P value*> ۰/۰۵).



شکل ۱- آثار تغذیه با جیره کنترل و جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پربیوتیک مخمری بر سطوح باکتری‌های اسید لاکتیک (بر حسب لگاریتم واحد کلونی در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید. ستون‌های (میانگین ± انحراف معیار) با حروف متفاوت دارای اختلاف معنادار هستند (*P value*< ۰/۰۵).

جدول ۱- تقسیم بندی بیوشیمیایی گونه‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از روده بچه ماهی سفید

گونه‌های احتمالی جنس لاکتوباسیلوس	*L. acidophilus*	*L. casei*	*L. plantarum*
تعداد کلونی جدا شده	۳	۷	۱۶
حضور دی آمینوپیملیک اسید	+	+	+
تولید دی اکسید کربن از گلوکز	−	−	−
تولید آمونیاک از آرژنین	−	−	−
رشد در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد	+	+	+
رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد	+	+	+
رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد	−	+	−
گلیسرول	+	−	+
ال - آرابینوز	−	−	+
ریبوز	+	+	−
دی - گزیلوز	−	−	−
گالاکتوز	+	+	−
رامنوز	+	+	−
اینوزیتول	+	+	+
مانیتول	+	+	+
سوربیتول	+	+	+
۱- متیل —دی- مانوزید	−	−	+
۱- متیل —دی- گلوکوزید	−	−	+
ان —استیل - گلوکوزآمین	+	+	+
آمیگدالین	+	+	+
آربوتین	+	+	+
ایزولین	+	+	+
سالیسین	+	+	+
سلوبیوز	+	+	+
مالتوز	+	+	+
لاکتوز	+	+	+
ملیبیوز	−	−	+
سوکروز	+	+	+
تری هالوز	+	+	+
ملیزیتوز	+	+	+
دی- رافینوز	−	−	−
نشاسته	+	+	−
گزیلیتول	−	−	−
۲- جنتیبیوز	+	+	+
دی- تورانوز	−	−	−
دی- تاگاتوز	+	+	−
دی- ارابیتول	−	−	+
گلوکونات	+	+	−
۲- کتو - گاوکونات	−	−	−
۵- کتو - گلوکونات	+	+	−

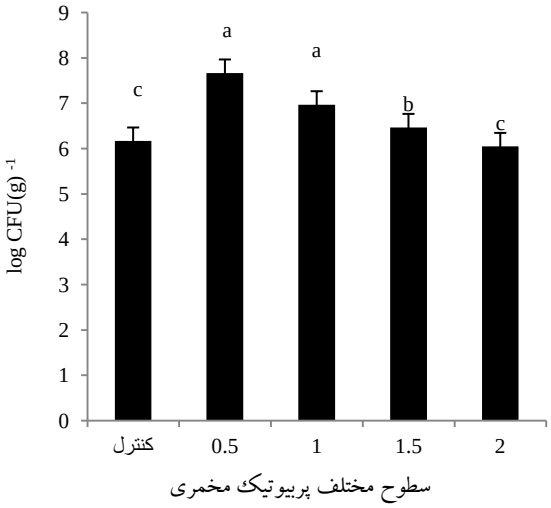
جدول ۲- گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از میکروبیوتای روده ای بچه ماهی سفید تغذیه شده با جیره کنترل و جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پربیوتیک مخمری

تیمار	درصد پربیوتیک مخمری	*L. plantarum*	*L .casei*	*L. acidophilus*
۱	صفر	–	–	–
۲	۰/۵	+	+	+
۳	۱	+	+	–
۴	۱/۵	+	–	–
۵	۲	+	–	–

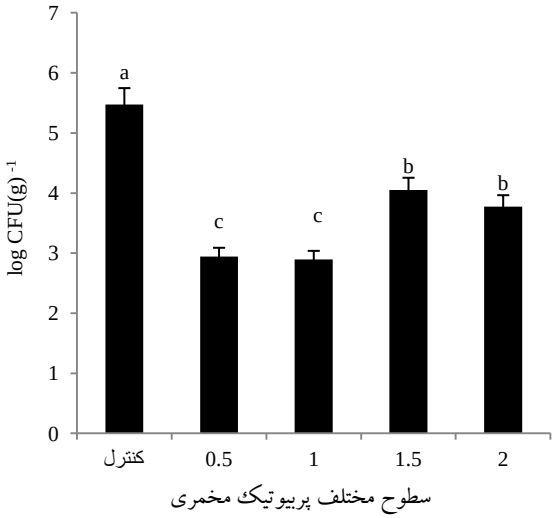
مقادیر تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر[۴] (بر حسب لگاریتم واحد کلونی در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده ای بچه ماهی سفید در اثر تغذیه با سطوح مختلف پربیوتیک مخمری در شکل ۲ نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد پربیوتیک مخمری سبب افزایش معناداری تعداد کل باکتری‌ها در میکروبیوتای روده ای شدند (*P value*< ۰/۰۵). از نظر آماری اختلاف معناداری بین تیمارهای یاد شده و تیمارهای شاهد و ۲ درصد پربیوتیک مخمری مشاهده شد (*P value*< ۰/۰۵). بیش‌ترین میزان تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر مربوط به تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد پربیوتیک مخمری بود که بین آن‌ها اختلاف معناداری وجود نداشت (*P value*> ۰/۰۵). به همین ترتیب کم‌ترین میزان تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر مربوط به تیمارهای شاهد و ۲ درصد پربیوتیک مخمری بود که اختلاف معناداری بین این دو تیمار مشاهده نشد (*P value*> ۰/۰۵).

تعداد کل باکتری‌های بی هوازی اجباری نیز در اثر تغذیه با پربیوتیک مخمری تغییراتی نشان داد (شکل ۳). بیش‌ترین میزان باکتری‌های بی‌هوازی اجباری در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف معناداری با سایر تیمارها داشت (*P value*< ۰/۰۵). کم‌ترین میزان باکتری‌های بی‌هوازی اجباری مربوط به تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد بود که اختلاف معناداری بین آن‌ها وجود نداشت (*P value*> ۰/۰۵). اگرچه تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی در تیمارهای ۱/۵ و ۲ درصد بیشتر از دو تیمار فوق بود ولی کاهش معناداری نسبت به تیمار شاهد در این دو تیمار مشاهده شد (*P value*< ۰/۰۵).

نتایج مربوط به محاسبه سهم باکتری‌های اسید لاکتیک (باکتری‌های بالقوه مفید پروبیوتیکی) در میکروبیوتای روده‌ای در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده شد نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک به تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در تیمار ۰/۵ درصد به‌طور معناداری بیشتر از سایر تیمارها بود (*P value*< ۰/۰۵). با توجه به این‌که هیچ باکتری لاکتوباسیلوسی در تیمار شاهد مشاهده نشد سهم آن‌ها در میکروبیوتای روده‌ای صفر بود. کم‌ترین سهم باکتری‌های اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای مربوط به تیمار ۲ درصد بود که اختلاف معناداری با سایر تیمارها داشت (*P value*< ۰/۰۵).



شکل ۲- آثار تغذیه با جیره کنترل و جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پربیوتیک مخمری بر تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر (برحسب لگاریتم واحد کلونی در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید. ستون‌ها (میانگین ± انحراف معیار) با حروف متفاوت دارای اختلاف معنادار هستند (*P value*< ۰/۰۵).



شکل ۳- آثار تغذیه با جیره کنترل و جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پربیوتیک مخمری بر تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی اجباری (بر حسب لگاریتم واحد کلونی در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید. ستون‌های (میانگین ± انحراف معیار) با حروف متفاوت دارای اختلاف معنادار هستند (*P value*< ۰/۰۵).

جدول ۳- نسبت (درصد) باکتری‌های *لاکتوباسیل* به تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید در اثر تغذیه با جیره کنترل و جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پربیوتیک مخمری

	شاهد	۰/۵ درصد	۱ درصد	۱/۵ درصد	۲ درصد
نسبت LAB به TVC	۰/۰۰ ± ۰/۰۰۰ d	۱/۱۰۶ ± ۰/۲۴ a	۰/۱۰ ± ۰/۰۹ b	۰/۱۱ ± ۰/۳۰ ab	۰/۰۴ ± ۰/۰۷ c

اعداد (میانگین ± انحراف معیار) در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنادار هستند (*P value*< ۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های میکروبیوتای دستگاه گوارش آبزیان تنوع گونه‌ای است به‌طوری‌که گستره وسیعی از جوامع باکتریایی در آن وجود دارند (۷). مطالعات انجام شده نشان داده است که عواملی چون تغذیه، محیط روده، سن، موقعیت جغرافیایی، عوامل محیطی و استرس بر تنوع و ترکیب میکروبیوتای روده‌ای اثر دارند (۱۹ و ۲۰). از بین موارد بیان شده، تغذیه یکی از مهم‌ترین عواملی است که می‌تواند به تغییر در میکروبیوتای روده ای منتج شود (۷). ازاین رو تا به امروز آثار کاربرد مواد مختلف در جیره از جمله مکمل‌های غذایی چون پرو و پربیوتیک‌ها بر ترکیب جوامع باکتریایی در میکروبیوتای روده‌ای بررسی شده است (۲۱). با وجود این‌که این تغییر، فرآیندی پیچیده بوده که روند آن به‌طور کامل مشخص نشده است ولی شناخت هرچه بیشتر آن می‌تواند استفاده از روش‌های مبتنی بر دستکاری میکروبیوتای دستگاه گوارش آبزیان را به عنوان یک راهبرد برای جلوگیری از بروز بیماری‌های باکتریایی و به تبع آن کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک میسر سازد (۹).

در مطالعه حاضر مشخص شد که تعداد *لاکتوباسیلوس‌ها* (شکل ۱) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۰/۵ درصد پربیوتیک مخمری به طور معناداری نسبت به تیمارهای شاهد، ۱/۵ و ۲ درصد افزایش یافت. در حالی که در تیمار شاهد اثری از رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک مشاهده نشد. نتایجی مشابهی در مطالعه حسینی فر[۵] و همکاران گزارش شده است که حاکی از افزایش معنادار سطوح باکتری‌های اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی فیل[۶] پس از به‌کارگیری سطوح مختلف (صفر، ۱ و ۲ درصد) پربیوتیک مخمری به‌دست آمده از مخمر نانوایی غیرفعال[۷] بود (۹). همچنین، در مطالعه دیگری روی ماهی سفید افزایش معناداری در تراکم *لاکتوباسیلوس‌ها* در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک و ویتامین ث مشاهده شد (۲۲). ایری[۸] و همکاران نیز در بررسی تغذیه‌ای روی بچه ماهی ازون برون مشاهده کردند که فروکتوالیگوساکارید (به عنوان پربیوتیک) سبب افزایش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود (۲۳). همچنین، استفاده از گالاکتوالیگوساکارید (پربیوتیک) به‌طور معناداری سبب افزایش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی نورس کلمه شد (۲۴).

همان‌طور که شکل‌های ۱ تا ۳ نشان می‌دهند تعداد کل باکتری‌ها به‌طور معناداری در تیمار ۰/۵ و ۱ درصد افزایش یافته و در همین تیمارها کاهش معنادار تعداد باکتری‌های بی‌هوازی اجباری و افزایش معنادار باکتری‌های اسیدلاکتیک دیده می‌شود ($P\ value<$ ۰/۰۵). در تایید این نتایج رولو[۹] و همکاران کاهش تعداد باکتری‌های بی‌هوازی اجباری میکروبیوتای روده ای را در اثر استفاده از پروبیوتیک گزارش کرده‌اند (۲۵).

افزایش سطوح لاکتوباسیلوس‌ها در میکروبیوتای روده‌ای پس از به‌کارگیری پربیوتیک مخمری در جیره به‌عنوان پربیوتیک احتمالاً به علت تأمین نیازهای غذایی است؛ زیرا *لاکتوباسیلوس‌ها* قادر نیستند آنزیم‌های تجزیه کننده خارج سلولی تولید کنند و به همین علت برای رشد به میکروارگانیسم‌های دیگری وابسته‌اند. با توجه به این‌که پربیوتیک استفاده شده در این مطالعه محصولی مخمری است، ممکن است فراهم شدن آنزیم‌ها، RNA، نوکلئوتیدهای آزاد، متابولیت‌های مختلف، ویتامین‌ها و آمینواسیدها بوده که بستر رشد *لاکتوباسیلوس‌ها* را فراهم آورده است (۲۶).

بررسی‌های تشخیصی بیوشیمیایی انجام شده نشان داد گونه‌های غالب *لاکتوباسیلوس* جدا شده از میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید پس از تغذیه با پربیوتیک مخمری شامل *L. plantarum*، *L. casei* و *L. acidophilus* بودند. در مطالعه انجام شده در زمینه بررسی میکروبیوتای دستگاه گوارش کپور ماهی پرورشی نیز این گونه‌ها به‌عنوان *لاکتوباسیلوس‌های* غالب جدا شده اند (۲۷). با این وجود قمی[۱۰] و همکاران گونه‌های *L. brevis*، *L. plantarum*، *Lactococcus lactis* را به‌عنوان گونه‌های غالب *لاکتوباسیلوس* جدا شده از میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید پس از مکمل‌سازی جیره غذایی با پروبیوتیک و ویتامین ث گزارش کردند (۲۲).

شاخص‌های داخلی و خارجی بسیاری از جمله فرم دستگاه گوارش، دمای آب، روش پرورش، نوع جیره غذایی نوسانات فصلی و طول روز می‌توانند بر ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش اثر گذار باشند (۱).

اطلاعات محدودی در ارتباط با آثار این عوامل وجود دارد. از جمله این بررسی‌ها می‌توان به مطالعه حاجی[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۰۴ اشاره کرد. که مؤید اثر دمای آب بر حداکثری لاکتوباسیلوس‌های دستگاه گوارش کپور بود به‌طوری‌که در دمای بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر گونه *L. lactis* و در دمای ۴ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر *Lactococcus ranolactis* مشاهده شد (۲۸). با این حال مطالعه‌ای تاکنون درخصوص تعیین اثر عوامل یاد شده بر ترکیب گونه‌ای لاکتوباسیلوس‌ها در میکروبیوتای روده ای ماهی سفید و حداکثر شدن آن‌ها انجام نشده است.

مطالعات انجام شده نشان داده است که گونه‌های لاکتوباسیلوس تشخیص داده شده در بررسی حاضر زمانی‌که با مدیریت تغذیه‌ای در میکروبیوتای دستگاه گوارش غالب می‌شوند موجب افزایش رشد و افزایش ایمنی ماهی می‌شوند (۲۹- ۳۱) در نتیجه استفاده از سطح ۰/۵ درصد پربیوتیک مخمری برای تغییر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای به‌سمت جوامع بالقوه مفید با خواص پروبیوتیکی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از همه کارکنان محترم ایستگاه تحقیقاتی تغذیه و غذای زنده بندر انزلی و جناب آقای مهندس مهران الماسی برای حمایت مالی از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 2010; 41 (11): 1553- 73.

(2) Pérez T., Balcazar JL ., Ruiz-Zarzuela I., Halaihel N., Vendrell D., De Blas I et al. Host –microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology* 2010; 3 (4): 355- 60

(3) Go´mez GD., Balca´zar JL. A review on the interactions between gut microbiota and innate Immunity of fish. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2008; 52 (2): 145- 54.

(4) Collins MD., Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Society for Clinical Nutrition* 1999; 69 (5): 1052- 7.

(5) Marteau P., Flourie B. Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *British Journal of Nutrition* 2001; 85: S17– 21

(6) RingØ E., Olsen RE., Gifstad TØ., Dalmo RA., Amlund H., Hemre G et al. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 2010; 16 (2): 117- 36.

(7) Bur G., Gatlin D., Rick S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 2005; 36 (4): 425- 36.

(8) Mahious AS., Gatesoupe FJ., Hervi M., Metailler R., Ollevier F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture* 2006; 14 (3): 219- 29.

(9) Hoseinifar SH., Mirvaghefi A., Mojazi Amiri B., Rostami HK., Merrifield DL. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 2011; 17 (5): 498- 504

(10) Ringo E., Sperstad S., Myklebust R., Mayhew TM., Olsen E. The effect of dietary inulin on bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Res*earch 2006; 37 (9): 891- 7.

(11) Mahious AS., Van Loo J., Ollevier F. Impact of the prebiotics, inulin and oligofructose on microbial fermentation in the spiral valve of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aqua* 2006; World Aquaculture Society, Florence, Italy, May 9-13.

(12) Olsen R., Myklebust R., Kryvi H., Mayhew T., Ringø E. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). *Aquaculture Research* 2001; 32 (11): 931- 4.

(13) Azizpour K., Tokmechi A., Agh N. Charectrization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp of west Azarbaijan, Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 8 (6): 1162-4.

(14) Cai Y., Suyanandana P., Saman P., Benno Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *The Journal of General and Applied Microbiology* 1999; 45 (4): 177- 84.

(15) Mac Faddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins Publication; 2000.

(16) Nair P and Surendran P. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. *Journal of Culture Collections* 2004- 2005; 4: 48- 52.

(17) Patil M., Pal A., Pal V., Kumariyaddula R. Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacreria from rat intestine. *Journal of Culture Collections* 2006- 2007; 5 (1): 58-63.

(18) Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Josei Lategan M., Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 2008; 274 (1): 1- 14.

(19) Skrodenyte-Arbaciauskiene V., Sruoga A., Butkauskas D. Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial *16S rRNA* gene sequence analysis. *Fisheries Sci*ence 2006; 27 (3): 597- 602.

(20) Denev S., Staykov Y., Moutafchieva R., Beev G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research* 2009; 1 (1): 1- 29.

(21) Romero J., Navarrete P. *16S rDNA*-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* 2006; 51 (4): 422- 30.

(22) Ghomi M., Heshmatipour R., Nazari R., Sohrabnejad M., Zarei M., Nikoo M., et al. Intestinal microflora of *Rutilus Frisii* kutum under dietary supplementation with probiotic and vitamin C. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2000; 16 (5): 635-42.

(23) Irii Y., Khoshbavar Rostami H., Akrami R. Effect of dietary fructooligosaccharide as a prebiotic on the growth and density of Lactobacillus in intestine of stellate (*Acipenser stellatus*) fingerling. *Fisheries Science and technology* 2013; 1 (1): 1- 11.

(24) Hoseinifar S., Khalili M., Khoshbavar Rostami H., Esteban A. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology* 2013; 35 (5): 1416- 20.

(25) Rollo A., Sulpizio R., Nardi M., Silvi S., Orpianesi C., Caggiano M., et al. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology Biochemistry* 2006; 32 (2): 167-77.

(26) Rufchaie R., Hoseinifar S., Zamini A., Saiad Borani M., Maghsodie Kohan H., et al. Effects of glucan on growth performance, carcass composition and intestinal microbiota in *Rutilus frisii* kutum fingerling. *Fisheries Science and technology* 2013; 2 (1): 43- 54.

(27) Faeed M., Ahmadnegad M., Amiri SA. *The study effect of antagonism endemic lactobacillus intestinal fingerling carp.* Kuala Lumpur, Malaysia: Asian pacific aquaculture; 2009.

(28) Hagi T., Tanaka D., Iwamura Y., Hoshino T. Dietary and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 2004; 234 (1- 4): 335- 46.

(29) Aly SM., Ahmed YA., Gharee A., Mohamed M. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus* ,as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oerochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 2008; 25 (1- 2): 128-36.

(30) Hernandez LH., Barrera TC., Mejia JC., Mejia GC., Delarmen M., Dosta M., et al. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poecilopsis gracilis* (Poecilidae). *Aquaculture Nutrition* 2010: 16 (4): 407- 11.

(31) Panigrahi A., Kiron V., Puangkaew J., Kobayashi T., Satoh S., Sugita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2005; 243 (1- 4): 241- 54.

---

[1]- SSGMP-671M ساخت آلمان

[2]- Log CFU/g
[3]- One-Way ANOVA
[4]- Total viable counts (TVC)
[5]- Hoseinifar
[6]- *Huso huso*
[7]- *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*
[8]- Iri
[9]- Rollo
[10]- Ghomi
[11]- Hagi

The study of modulation of gut microbiota of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) through administration of yeast based prebiotic

Rudabeh Rufcahei *
M.Sc. of Fish Nutrition, Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali. Iran, r_rufchaie@yahoo.com
Seyed Hossein Hoseinifar
Assistant Professor of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, hoseinifar@gau.ac.ir
Monireh Faeed
Ph.D. Student of Microbiology, Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali. Iran, m_faeed@yahoo.com

Abstract

Introduction: The intestinal microbiota of fish belongs to different species compare to terrestrial animals, mainly Gram-negative bacteria are predominant. Despite importance as probiotic, gram-positive bacteria like *Lactobacillus* Sp. are minor constitutes of gut microbiota. The aim of this study was to investigate the possibility of modulation of Kutum intestinal microbiota and elevation of lactic acid bacteria (LAB) levels through administration of yeast based prebiotic.

Materials and methods: The study was performed as randomized design with 5 treatments and 3 replications in which kutum were fed different levels, 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 % of yeast based prebiotic for 60 days. At the end of the trial, culture based analysis of intestinal microbiota include lactic acid bacteria levels, total bacteria and obligatory anaerobic bacteria were performed by using MRS, TSA, SPS media. Also, the isolated lactic acid bacteria species were determined by biochemical test.

Results: The highest and lowest lactic acid bacteria levels observed in 0.5 % treatment and control treatment, respectively (*P value* < 0.05). Also, administration of 0.5 % yeast based prebiotic significantly increased total viable bacteria (*P value* < 0.05). The highest and lowest obligatory anaerobic bacteria were recorded in control and 0.5 and 1 % treatment (*P value* < 0.05). The biochemical test revealed isolation of three species *Lactobacillus plantarum*, *L. caseie*, *L. acidophilous* in the intestinal microbiota after administration of yeast based prebiotic.

Discussion and conclusion: The results of this study determined that administration of 0.5 % yeast based prebiotic significantly modulates the intestinal microbiota of kutum fry toward potentially beneficial communities (i.e LAB).

Key words: Yeast based prebiotic, Intestine microbiota, Rutilus frisii kutum, Lactic acid bacteria

* Corresponding author
Received: December 2, 2013 / **Accepted:** March 1, 2014