تاثیر پربیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش فیل ماهیان انگشت قد پرورشی (*Huso huso*)

محمدرضا صفابخش[۱]
عباس متین فر[۲*]
عباسعلی زمینی[۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، سنندج، ایران
۲. موسسه تحقیقات شیلات ایران، دانشیار بخش آبزی پروری، تهران، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، استادیار گروه شیلات، لاهیجان، ایران

*مسئول مکاتبات:
a_matinfar@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۵

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی تاثیر سطوح متفاوت پربیوتیک دیواره سلولی مخمر بر فلور دستگاه گوارش فیل ماهیان انگشت قد پرورشی (*Huso huso*) به مدت ۸ هفته انجام گرفت. پس از یک هفته سازگاری با شرایط پرورشی و جیره پایه، ۶۰ عدد فیل ماهی با میانگین وزنی ۰/۳۶ ± ۳۵/۶۹ گرم به ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای به ابعاد ۵۰ × ۴۵ × ۵۰ سانتی‌متر با تراکم ۵ عدد در هر آکواریوم در قالب ۴ تیمار (۰، ۱، ۱/۵ و ۲) با ۳ تکرار (طرح کاملاً تصادفی) توزیع شدند. در انتهای دوره شاخص میکروبی، جمعیت کل باکتری و نیز لاکتوباسیل‌های روده و مدفوع بررسی شدند. نتایج نشان داد که در ماهیان تغذیه شده با سطح ۱/۵ درصد پربیوتیک تعداد کل باکتریایی در محیط‌های کشت TSA و MRS در روده ۰/۰۳ ± ۵/۷۴ و در مدفوع ۰/۷۷ ± ۹/۰۴ بوده که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P<0/05$). با استناد به نتایج بدست آمده می‌توان اظهار نمود که سطح ۱/۵ درصد پربیوتیک دیواره سلولی مخمر می‌تواند باعث بهبود میکروفلور روده فیل‌ماهیان انگشت قد پرورشی شود.

واژگان کلیدی: مخمر، فیل‌ماهی، شاخص میکروفلور روده، پربیوتیک، *Huso huso*.

مقدمه

دیواره سلولی مخمر ساکارو‌ماسیس سرویزیه منبع غنی از آنزیم‌ها، نوکلئوتیدهای آزاد، ویتامین‌های گروه B و آمینواسیدها بوده و می‌تواند نیازهای غذایی لاکتوباسیلوس‌ها را فراهم نماید و سبب رشد و افزایش تعداد آن‌ها شود (Hoseinifar *et al*., 2011). پربیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده یا محصولات آن‌ها هستند، که برای بهبود کیفیت رژیم غذایی در صنایع دامپروری و آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند و منجر به ارتقاء سلامتی و بهبود عملکرد دستگاه گوارش دام و آبزیان و افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به بیماری‌ها می‌شوند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۳؛ احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۸۸). در ماهی‌ها استفاده از پروبیوتیک منجر به حفظ توان و بهبود عملکرد دستگاه گوارش می‌شوند. در صورت استفاده از پروبیوتیک زنده، این محصول به عنوان آنتاگونیست میکروب‌های بیماری‌زا عمل کرده و بعضاً منجر به تقویت ایمنی هومورال و سلولار در ماهی می‌شود (اسماعیلی، ۱۳۸۸؛ اکرمی و همکاران، ۱۳۸۷).

فیل‌ماهی (*Huso huso*) یکی از گونه‌های بسیار مهم ماهیان خاویاری است که زیستگاه طبیعی آن دریای خزر است، اما به دلیل صید بی‌رویه و آلودگی پیشرونده آب دریا توسط فعالیت‌های صنعتی، نسل آن رو به کاهش است (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به کاهش

Archive of SID
www.SID.ir

صید فیل ماهی و تقاضای بالا برای گوشت آن، تکثیر و پرورش این ماهی به منظور تولید گوشت از وزن ۳ تا ۵ گرم به منظور تامین بچه ماهی مورد نیاز پرورش دهندگان در ایران ضروری به نظر می‌رسد (سوداگر و همکاران، ۱۳۸۴).

مخمر آبجو (*Saccharomyces cerevisiae*) پایه بسیاری از پربیوتیک‌ها را تشکیل می‌دهند چون در ساختمان خود حاوی ترکیبات محرک سیستم ایمنی، بتاگلوکان‌ها، اسیدهای نوکلئیک و الیگوساکاریدهایی مانند مانان هستند. مانان الیگوساکارید منبع تغذیه‌ای مناسب برای رشد و فعالیت باکتری‌های دستگاه گوارش مثل باکتری‌های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکترها می‌باشد (Ringo *et al.*, 1998). تحقیقات متعددی در خصوص استفاده از مکمل‌های غذایی مانند ویتامین‌ها، پربیوتیک‌ها و محرک‌های سیستم ایمنی در پرورش فیل‌ماهی انجام شده است (آذری تاکامی، ۱۳۸۸).

اکرمی و همکاران (۱۳۸۸) تاثیر مانان الیگوساکارید را بر شاخص‌های رشد، ترکیب لاشه و مقاومت به نوسانات شوری در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*) مطالعه کردند. شاخص‌های رشد بین گروه شاهد و گروه تغذیه شده با سطح ۰/۳ درصد مانان الیگوساکارید در تاس ماهی خلیج مکزیک (*Acipenser oxyrinchus*) مورد بررسی قرار گرفت (Pryor *et al.*, 2003). Staykov و همکاران (۲۰۰۷) اثر سطح ۰/۲ درصد مکمل مانان الیگوساکارید به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را بر فاکتورهای رشد در دو محیط پرورشی قفس و کانال‌های دراز ارزیابی نمودند. Taati و همکاران (۲۰۱۲ و ۲۰۱۱) به مطالعه اثرات دوزهای ۱ درصد و ۳ درصد پربیوتیک‌های ایمنواستر و ایمنووال (حاوی MOS و بتاگلوکان) بر شاخص‌های رشد، آنالیز لاشه و فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی و ایمنی بچه فیل ماهیان طی ۸ هفته پرداختند و مشاهده کردند که سطح ۳ درصد ایمنواستر و ایمنووال دز مطلوبی برای پرورش بچه فیل ماهیان به شمار می‌روند، چرا که باعث افزایش معنی‌داری در کلیه شاخص‌های رشد شده‌اند. همچنین این دو پربیوتیک باعث بهبود بسیاری از شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی در بچه فیل ماهیان پرورشی شدند. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر نوعی پربیوتیک تجاری با نام Byonic حاوی دیواره سلولی مخمر بر شاخص میکرو فلور باکتریایی سیستم گوارش بچه فیل‌ماهی پرورشی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه شیلات و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان در شش ماه اول سال ۱۳۹۱ انجام گردید. تعداد ۶۰ عدد بچه فیل ماهی (*Huso huso*) پس از زیست‌سنجی (اندازه‌گیری وزن و طول کل) با میانگین وزنی ۰/۳۶ ± ۳۵/۶۹ گرم انتخاب و با تراکم ۵ عدد به ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای با ابعاد ۵۰×۳۵×۵۰ سانتی‌متر معرفی شدند. سپس سازگاری بچه ماهیان با جیره پایه که غذای استاندارد (Biomar) بود، براساس ۵-۳ درصد وزن بدن در ۳ نوبت در روز (۸ صبح، ۱۵ عصر و ۲۳ شب) به مدت یک هفته صورت گرفت. پس از طی دوره سازگاری بچه فیل‌ماهیان و زیست‌سنجی تمام جمعیت مورد مطالعه، این تحقیق در سه گروه تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد هر کدام با سه تکرار انجام شد که شامل ۳ آکواریوم (شاهد) بدون پربیوتیک،۳ آکواریوم حاوی جیره ۱ درصد پربیوتیک YCW (تیمار اول) ۳ آکواریوم حاوی جیره ۱/۵ در صد پربیوتیک YCW (تیمار دوم) و ۳ آکواریوم حاوی جیره ۲درصد پربیوتیک YCW (تیمارسوم) بوده است.

از آنجایی که پربیوتیک مصرفی می‌بایست از طریق جیره در اختیار ماهی قرار بگیرد و دوز مصرفی آن نسبت به حجم غذا خیلی کمتر است، بنابراین شیوه اختلاط آن با جیره بسیار مهم است. به منظور آماده‌سازی جیره غذایی ابتدا غذای بیومار را توسط مولینکس به صورت پودر و بعد پربیوتیک و پودر غذای بیومار در دستگاه میکسر (همزن) بر اساس مقدار مصرف، همراه با مقداری آب به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط شدند تا مخلوط حاصله به صورت یک خمیر در آید سپس این خمیر از یک چرخ گوشت بزرگ عبور داده شد تا غذا به پلت‌های استوانه‌ای شبیه به رشته‌های ماکارونی در آمده و در انتها پلت‌ها در خشک کن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند (پورعلی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Cerezuela *et al.*, 2008 ; Mohseni *et al.*, 2006). پس از آن، از رشته‌ها، پلت‌هایی با قطر و

www.SID.ir

طول ۳ میلی‌متری تهیه شد و سپس در کیسه‌های پلاستیکی مناسب و غیر قابل نفوذ بسته بندی و در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. یک ساعت قبل از توزیع غذا در آکواریوم‌ها، جیره‌های ساخته شده از فریزر خارج و در دمای اتاق نگهداری شدند و پس از متعادل شدن درجه حرارت پلت‌ها، با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و با توجه به درصد تیمارهای مورد نظر، به ماهیان داده شد. ساخت غذا به صورت هفتگی انجام گرفت و جیره‌ها توسط آزمایشگاه تشخیص کنترل کیفیت و آنالیز مواد غذایی اداره دامپزشکی در رشت بر اساس استاندارد (AOAC,1995) مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیز جیره پایه بر اساس ماده خشک شامل پروتئین ۵۷/۵۸ درصد، چربی ۱۳/۲ درصد، کربوهیدرات ۱۲/۶۶ درصد، خاکستر ۱۰/ ۲۴ درصد، رطوبت ۶/۳۲ درصد و میزان انرژی خام جیره ۲۳/ ۵۰۰۶ کیلو کالری به کیلوگرم بوده است.

در هفته هشتم کل ماهیان مورد آزمایش با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزین شده و با دقت میلی‌متر طول کل آن‌ها اندازه‌گیری شد. قبل از انجام زیست‌سنجی، بچه‌ماهیان به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشته شدند تا لوله گوارش آن‌ها به طور کامل تخلیه گردد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۳؛ حسینی فر و همکاران، ۱۳۸۹).

اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی آب شامل دما و pH توسط pH متر دیجیتالWTW مدل pH (I۷۱۰) ساخت Weilheim آلمان و میزان اکسیژن محلول با استفاده از اکسی‌متر دیجیتال Lovibond مدل Senso 150 ساخت استرالیا با دقت ۰/۰۱ به طور روزانه انجام و داده‌ها ثبت شدند. میانگین دما، میانگین اکسیژن و میانگین pH در طول دوره پرورش به ترتیب ۳/۱۱ ± ۲۲/۵۱ درجه سانتی‌گراد، ۱/۱۲ ± ۷/۲۳ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۴۱ ± ۷/۴۵ بودند که فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مذکور در طول دوره پرورش دارای اختلاف معنی‌داری نبودند (P>۰/۰۵).

به منظور بررسی تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک و همچنین تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر موجود در روده و مدفوع بچه فیل‌ماهیان قبل از تغذیه و پس از تغذیه با سطوح مختلف دیواره سلولی مخمر آبجو، در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تکرار انتخاب شدند. پس از انتقال بچه فیل‌ماهیان به آزمایشگاه، روده آن‌ها تحت شرایط آسپتیک خارج شد. نمونه‌های روده به منظور بررسی تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و همچنین تعدادکل باکتری‌های زیست پذیر موجود در مدفوع تخلیه کامل گردید. نمونه‌های روده سپس توزین و به منظور هموژن نمودن به هاون‌های چینی استریل منتقل گردید (Markidis *et al*., 2001; Olsen *et al.*, 2001).

پس از تهیه هموژن با استفاده از محلول نمکی استریل (۰/۸۷ W/N Nacl درصد) رقت های 10^{-1} تا 10^{-7} از روده و مدفوع تهیه گردید. از رقت‌های تهیه شده، تحت شرایط کاملاً ضدعفونی (Aseptic) حجمی معادل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته شد و به محیط های کشت TSA (Triptic Soy Agar) به منظور تعیین تعداد کل باکتری‌های موجود در روده و محیط کشت Rogosa and Deman (جهت تعیین تعداد باکتری های اسیدلاکتیک) که طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آن (Merck, Germany) تهیه شده منتقل و به روش Spread plating در سطح پلیت پخش شدند (Rengpipat *et al*., 1998; Mahious *et al.*, 2005).

پس از انجام عمل کشت، انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند (Mahious *et al.*, 2005) پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، باکتری‌های هر پلیت برحسب واحد کلنی (CFU) در گرم شمارش شدند (Peter and Sneath , 1986).

تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی = تعداد کلنی باکتری‌ها x ضریب رقت x عکس حجم مورد استفاده جهت کشت

جهت شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از مراحل زیر استفاده گردید :

بررسی خصوصیات مرفولوژیک لام تهیه شده از کلنی‌ها در محیط MRS آگار و تهیه لام گرم.

انجام آزمایشات بیوشیمیایی شامل تست حرکت، کاتالاز، تولید اندوسپور، آزمایش لخته کردن شیر، تست تحمل ۰/۴ درصد فنل باکتریواستاتیک و تست تحمل ۱۰ درصد کلرید سدیم و رشد تحت pH های مختلف.

www.SID.ir

به منظور مشاهده رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در pH های متفاوت، محیط کشت MRS مایع تهیه و قبل از استریل به آن قطره قطره اسید استیک ۹۹ درصد اضافه شده و هم زمان به وسیله pH متر اندازه‌گیری شد. در مورد pH قلیایی هم از سود ۲ نرمال استفاده شد. محدوده pH مورد بررسی از ۲/۵ تا ۸/۵ انتخاب شد (Hoque *et al.*, 2010).

پس از استریلیزاسیونMRS مایع قلیایی و اسیدی در اتوکلاو و سرد شدن آن‌ها، محلول را در اپندورف های ۱/۵ میلی‌لیتری به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر ریخته و باکتری‌های اسید لاکتیک در آن کشت داده شد و بعد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی در انکوباتور قرار گرفته و اثر رشد آن‌ها تا ۷ روز بررسی شد (اسماعیلی، ۱۳۸۸؛ Cia *et al.*, 1999).

پس از ۲۴ ساعت رشد باکتری‌ها با تعیین OD توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ ناکوستر بررسی گردید و از لوله‌های تلقیح نشده به عنوان بلانک استفاده شد.

به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها از آزمون کولموکروف–اسمیرونوف (Kolmogorov-smirnov) استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. در صورت نرمال نبودن داده‌ها جهت مقایسه تیمارها از آزمونKruskal-Wallis و به منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. همچنین جهت مقایسه ۲ تیمار با هم از آزمون Independent Samples T- Test استفاده گردید. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و رسم نمودارها با نرم افزار Excel ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج

باکتری‌های جداسازی شده در محیط MRS آگار بر اساس خصوصیات ظاهر کلنی و خصوصیات بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. این باکتری‌ها همگی گرم مثبت، میله ای شکل، بی حرکت، کاتالاز منفی و فاقد اندسپور بودند. جدایه‌ها همگی توانایی انعقاد شیر، تحمل فنل و ۱ تا ۹ درصد نمک را داشتند (جداول ۱ و ۲ و شکل ۱).

جدول ۱: مشخصات مرفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی برخی جدایه‌های لاکتوباسیلوس‌ها.

مشخصه فیزیولوژی و بیوشیمیائی	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ٤
مرفولوژی کلنی	۱میلی‌لیتر ، سفید	۰/۵ –۰/۱ میلی‌لیتر	سفید	سفید
رنگ آمیزی گرم	+	+	+	+
تست حرکت	غیر متحرک	غیر متحرک	غیر متحرک	غیر متحرک
تست کاتالاز	–	–	–	–
تست اندوسپور	–	–	–	–
فنول ۰/٤ درصد	+	+	+	+
انعقاد شیر	+	+	+	+
تحمل نمک	+	+	+	–

Archive of SID

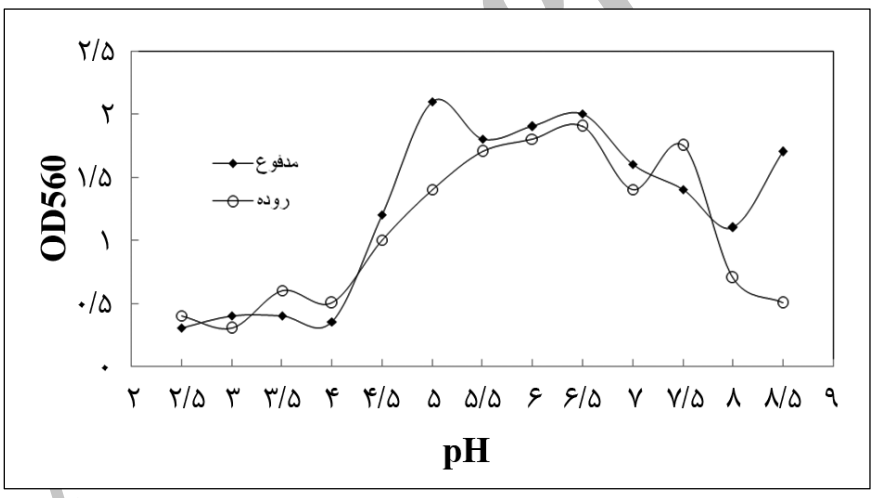
www.SID.ir

جدول ۲: آزمایش تحمل نمک برای برخی از جدایه‌های لاکتوباسیلوس.

غلظت نمک (درصد)	جدایه روده	جدایه مدفوع
۱	+ +	+ +
۲	+	+
۳	+	+
۴	+ +	+
۵	+	+
۶	+	+
۷	+	+
۸	+	+
۹	+	+
۱۰	–	–

(علائم : + + رشد خوب ، + رشد قابل رویت ،– بدون رشد)

حداکثر رشد از جدایه لاکتوباسیل روده (OD = ۲/۱) در pH = ۵ مشاهده شد در حالیکه حداکثر رشد جدایه لاکتوباسیل مدفوع با (OD=۱/۹) در pH = ۶/۵ مشاهده گردید.



شکل ۱: رشد بهینه و pH یکی از جدایه‌های لاکتوباسیلوس (روده و مدفوع).

براساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه میزان کل باکتریایی مدفوع و روده در محیط کشت‌های TSA و MRS بچه فیل‌ماهیان، اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها را مطابق جدول ۳ نشان می‌دهد.

www.SID.ir

جدول ۳: مقایسه شاخص‌های کل باکتریایی مدفوع و روده بچه فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در محیط‌های TSA و MRS (log cfu/g).

تیمار / فاکتور	کنترل	تیمار درصد	تیمار ۱/۵ درصد	تیمار ۲ درصد
توتال باکتریایی (TSA) در مدفوع	۴/۶۹۳±۰/۷۹ a	۵/۵۶۰±۰/۵۵ a	۹/۰۴۳±۰/۷۷ b	۵/۲۱±۰/۹۵ a
توتال باکتریایی (MRS) در مدفوع	۴/۳۷±۰/۳۹ a	۴/۹۴±۰/۸۷ a	۷/۹۲±۱/۰۲ b	۴/۶۷±۰/۷۱ a
توتال باکتریایی (TSA) در روده	۵/۶۵±۰/۴۷ b	۲/۱۰±۰/۲۷ b	۵/۷۴±۰/۰۳ b	۴/۵۹±۰/۲۷ a
توتال باکتریایی (MRS) در روده	۳/۶۸±۰/۲۶ a	۴/۴۳±۰/۲۵ a	۵/۰۴±۰/۱۴ b	۴/۰۵±۰/۳۴ a

براساس آزمون Independent Samples T- Test میزان کل باکتریایی مدفوع (جدول ۴)، همچنین کل باکتریایی روده (جدول ۵) در محیط های کشت MRS و TSA بچه‌ماهیان در تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). اما میزان کل باکتریایی در کلیه تیمارهای آزمایشی و شاهد در محیط کشت TSA بیش از MRS بوده است.

جدول ٤ : مقایسه میزان کل باکتریایی در مدفوع بچه فیل ماهیان پرورشی(*Huso huso*) (log cfu/g).

فاکتور	تیمار	TSA	MRS
کل باکتریایی در مدفوع	شاهد	۴/۶۹±۰ /۷۹[a]	۴/۳۷±۰ /۳۹[a]
	تیمار ۱ درصد	۵/۵۶±۰/۵۵[a]	۴/۹۴±۰/۸۷[a]
	تیمار ۱/۵ درصد	۹/۰۴±۰/۷۷[a]	۷/۹۲ ±۱/۰۲[a]
	تیمار ۲ درصد	۵/۲۱ ±۰/۹۵[a]	۴/۶۷±۰/۷۱[a]

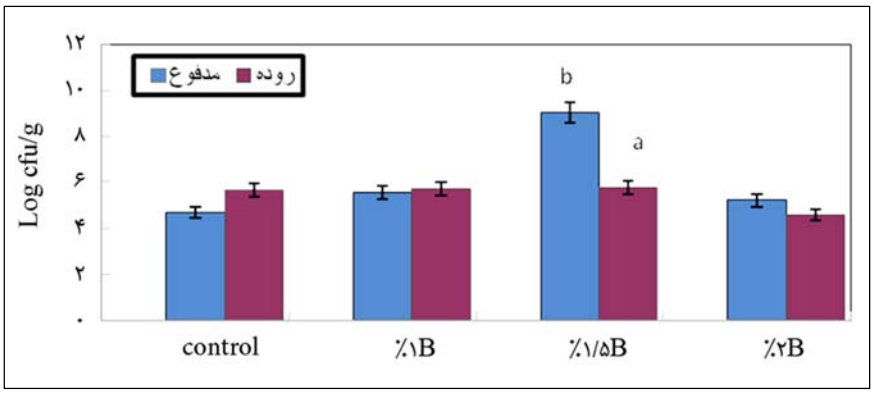
جدول ۵: مقایسه میزان کل باکتریایی در روده بچه فیل ماهیان پرورشی (*Huso huso*) (log cfu/g).

فاکتور	تیمار	TSA	MRS
کل باکتریائی در روده	شاهد	۵/۶۵ ±۰/۴۷ a	۳/۶۸ ±۰/۲۶ a
	تیمار ۱ درصد	۵/۷۱ ±۰/۲۷ a	۴/۴۳ ±۰/۲۵ a
	تیمار ۱/۵ درصد	۵/۷۴ ±۰/۰۳ a	۵/۰۴ ±۰/۱۴ a
	تیمار ۲ درصد	۴/۵۹ ±۰/ ۲۷ a	۴/۰۵ ± ۰/۳۴ a

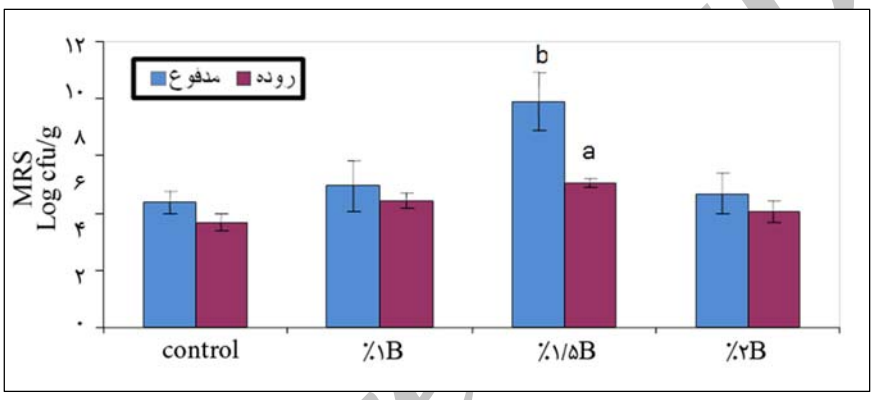
براساس آزمون Independent Samples T- Test تفاوت معنی‌دار آماری در میزان کل باکتریایی روده و مدفوع در تیمار ۱/۵ درصد مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که میزان کل باکتریایی مدفوع در محیط MRS و TSA در تیمار ۱/۵ درصد بیش از تعداد باکتری‌ها در روده است (شکل‌های ۲ و ۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲ : میانگین کل باکتریایی در محیط های کشت TSA.



شکل ۳: میانگین کل باکتریایی در محیط های کشت MRS.

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بار باکتری‌های اسید لاکتیک بومی در دستگاه گوارش به تحریک پریبیوتیک دیواره سلولی مخمر از اصلی‌ترین هدف این بررسی بود که نتایج حاصله بیانگر دستیابی به این اهداف می‌باشد. فراوانی باکتری‌های اسید لاکتیک در روده و مدفوع تیمار ۱/۵ درصد دیواره سلولی مخمر به طور معنی‌داری از شاهد بیشتر بوده که نشان دهنده تاثیر مثبت این پریبیوتیک بر تکثیر موفق این باکتری‌ها می‌باشد. به نظر می‌رسد که این گروه از باکتری‌ها به طور مستقیم مانع تکثیر پاتوژن‌های فرصت طلب شده و به طور غیرمستقیم با تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند، از این رو سبب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردند (David *et al.*,1999; Mahious and Ollevier, 2005).

افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار ۱/۵ درصد دیواره سلولی مخمر، به علت وجود مانان الیگوساکارید موجود در دیواره سلولی مخمر است، چون مانان اولیگوساکارید منبع تغذیه‌ای مناسب برای رشد و فعالیت باکتری‌های فلور دستگاه گوارش نظیر باکتری‌های اسید لاکتیک و لاکتو باسیلوس می‌باشد (Ringo *et al.*, 1998؛ Andrews *et al.*, 2009). تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و باکتری‌های اسیدلاکتیک ناشی از تخمیر پریبیوتیک، منجر به کاهش pH روده شده که شرایط مناسبی را برای فعالیت این باکتری‌ها فراهم می‌کند (Schley and Field, 2002). به نظر می‌رسد تاثیر پریبیوتیک‌ها بر رشد ماهیان به دلیل جلوگیری مانان الیگوساکارید از تجمع باکتری‌های بیماری‌زا در روده به دلیل تولید ترکیبات ضد باکتریایی می‌باشد. چسبیدن باکتری‌ها به روده نقش مهمی در تشکیل کلونی و بیماری‌زایی دارد. سلول‌های موکوسی اپیتلیال روده در برابر اتصال باکتری‌ها دارای مکانیسم های دفاعی شامل ترشح موکوس، در برگرفتن باکتری‌ها و فعالیت موسین هستند (Bavington *et al.*, 2004).

www.SID.ir

در خصوص اثر افزاینده مخمر بر تعداد کل لاکتوباسیل‌های روده فیل ماهیان نتایج حاصل از این تحقیق با سایر نتایج از نظر معنی‌دار بودن یک تیمار در مقایسه با سایر تیمارها مطابقت دارند. حسینی فر و همکاران (۱۳۸۹) اثر مخمر ساکارومایسیس سرویزیه را بر فلور طبیعی دستگاه گوارش فیل ماهیان بررسی نمودند. آن‌ها پس از ۶ هفته دریافتند که در تیمار ۲ درصد اختلاف معنی‌داری در خصوص تعداد لاکتویاسیل‌های بومی روده در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد، در حالی‌که در تحقیق حاضر تیمار ۱/۵ درصد تفاوت معنی دار آماری را نشان داد. در مجموع نتایج حاکی از آن است که درصدهای پایین مخمر می‌تواند اثر افزاینده‌ای بر برخی پارامترهای رشد و جمعیت لاکتوباسیل‌های ساکن روده فیل ماهی داشته باشد Olsen و همکاران ۲۰۰۱). به میزان ۱۵ درصد جیره از اینولین در غذای ماهی چار قطبی استفاده کردند که منجر به عدم تخمیر این کربوهیدرات و در نتیجه تاثیر زیان‌بار و نامطلوب بر سلول‌های انتروسیت روده شد.

در مطالعه‌ای تأثیر اینولین، الیگوفروکتوز و لاکتوسوکروز به عنوان پربیوتیک روی فلور باکتریایی روده در لارو ماهی کفشک مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق لارو ماهی توربوت با جیره‌های آزمایشی در سطح ۲ درصد از پربیوتیک‌های مذکور و گروه شاهد نیز به میزان ۲ درصد سلولز به عنوان منبع کربوهیدرات مورد تغذیه قرار گرفتند. فلور باکتریایی در لارو کفشک متغیر بود و در محیط کشت TCBS agar سویه .*Vibrio* spp غالب بود. در گروه تغذیه شده با الیگوفروکتوز، حدود ۱۴ درصد کل فلور *Bacillus* spp تعلق داشت و این سویه توانست الیگوفروکتوز را به عنوان تنها منبع کربن مصرف کند و نتیجه‌گیری شد پربیوتیک الیگوفروکتوز می‌تواند نقش مفیدی در رشد لارو ماهی کفشک داشته می باشد (Mahious *et al*., 2005).

اکرمی و همکاران (۱۳۸۷) با اضافه کردن سطوح ۱ ، ۲ و ۳ درصد اینولین به جیره غذایی فیل ماهیان پرورشی پس از ۸ هفته مشاهده کردند که کمترین سطح آن یعنی ۱ درصد، افزایش معنی‌داری در باکتری‌های اسید لاکتیک روده ایجاد کرده که این موضوع با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد. در تحقیقی دیگر، اکرمی و همکاران (۱۳۹۰) اثر ۴ سطح صفر، ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ درصد اینولین در جیره غذایی کپور ماهیان پرورشی را بر تراکم باکتری‌های اسید لاکتیک روده به مدت ۸ هفته ارزیابی نمودند. نتایج نشان داد که بیشترین تراکم لاکتوباسیل روده در تیمار ۱/۵درصد رویت شد ($P < ۰/۰۵$). همچنین در تحقیق حاضر نتایج حاصله دال بر تأثیر معنی‌دار تیمار ۱/۵ درصد بر میزان کل باکتریایی در محیط TSA، جمعیت لاکتوباسیل‌های مدفوع در محیط MRS و جمعیت لاکتوباسیل‌های روده در محیط MRS، در مقایسه با سایر تیمارها بود. ممکن است افزایش جمعیت لاکتوباسیل‌ها در روده فیل‌ماهیان در نتیجه تأمین RNA اسید نوکلئیک آزاد، ویتامین گروه B و اسیدهای آمینه موجود در رژیم غذایی مخمر باشد. اساساً لاکتوباسیل‌ها به دلیل نقش سودمندشان در فلور روده ماهیان و توانایی آنتاگونیستی در مهار رشد پاتوژن‌های مختلف در روده از اهمیت بسزایی برخوردارند (Ringo *et al*., 2010).

نتایج تحقیق حاضر حاکی از نقش مثبت تجویز مخمر بر جمعیت میکروبی مفید مستقر در روده فیل‌ماهیان جوان است. با توجه به نتایج حاصله در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که استفاده از پربیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) به میزان ۱/۵ در صد جیره خشک مطلوب‌ترین گزینه برای افزایش جمعیت فلور میکروبی بدون اعمال تأثیر مخرب بر دستگاه گوارش است.

منابع

ابراهیمی، ع.، پوررضا، ج.، پاناماریوف، س. و.، کمالی، الف. و حسینی، ع.، ۱۳۸۳. اثر مقادیر مختلف پروتئین و چربی بر شاخص‌های رشد و ترکیب لاشه بچه‌ماهیان انگشت قد فیل‌ماهی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان، سال هشتم، شماره دوم، صفحات ۲۴۱-۲۲۹.

احمدی‌فر، ل.، جلالی، م.، آذری تاکامی، ق. و محمدی، الف.، ۱۳۸۸. اثرات آکواواک ارگوسان بر میزان رشد، بازماندگی و شاخص‌های مربوط به خون در فیل‌ماهیان جوان (*Huso huso*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد شانزدهم، ویژه نامه ۱-الف، صفحات ۸۰-۷۲.

اسماعیلی، پ.، ۱۳۸۸. جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در روده قره برون پرورشی و بررسی اثر آنتاگونیستیک آنها علیه آئروموناس. پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۹۲ ص.

اکرمی، الف.، کریم آبادی، ع.، محمدزاده، ح.، و احدی فر، الف.، ۱۳۸۸. تأثیر پربیوتیک مانان الیگوساکارید بر رشد، بازماندگی، ترکیب بدن و مقاومت به تنش شوری در بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). مجله علوم و فنون دریایی، دوره هشتم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۵۷- ۴۷.

Archive of SID
www.SID.ir

اکرمی، ر.، حاجی مرادلو، ع .، متین فر، ع .، عابدیان، ع. و مازندرانی، ر.، ۱۳۸۷. تأثیر پربیوتیک اینولین بر شاخص تولید و تراکم باکتریایی دستگاه گوارش فیل ماهیان جوان پرورشی. مجله شیلات، سال دوم، شماره دوم، صفحات ۱۰-۱.

اکرمی، ر.، قلیچی، الف. و احمدی، الف.، ۱۳۹۰. تأثیر پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون فیل ماهیان جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۲، صفحات ۱۳۶-۱۳۱.

آذری تاکامی، ق.، ۱۳۸۸. تکثیر و پرورش تاس ماهیان (ماهیان خاویاری). انتشارات دانشگاه تهران، ۴۰۱ ص.

پورعلی، ح.ر.، محسنی، م.، آق تومان، و. و توکلی، م. ۱۳۸۲. پرورش بچه ماهیان با درصدهای مختلف غذای کنسانتره فرموله شده. مجله علمی شیلات ایران، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، صفحات ۴۸-۳۷.

حسینی‌فر، ح.، میرواقفی، ع.، مجازی امیری، ب.، خوشباور رستمی، ح.، پورامینی، م. و درویش بسطامی، ک.، ۱۳۸۹. بررسی اثرات پربیوتیکی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* Var. *ellipsoideus* غیرفعال بر برخی شاخص‌های رشد، مصرف جیره،بازماندگی و میکروبیوتای روده بچه فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران، سال نوزدهم، شماره۴، صفحات ۶۶-۵۵.

سوداگر، م.، آذری تاکامی، ق.، پانوماریف، س.، محموزاده، ه.، عابدیان، ع.، و حسینی، ع.، ۱۳۸٤. بررسی اثرات سطوح مختلف بتائین و متیونین به عنوان جاذب بر شاخص‌های رشد و بازماندگی فیل ماهیان جوان. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، صفحات ۴۹-۴۱.

Andrews, S. R., Sahu, N. P., Pal, A. K. and Kumar, S., 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41:61-69.

AOAC, 1995. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington, Virginia, USA. 1298P.

Bavington C. D., Lever, R., Mulloy, B., Grundy M. M., Page, C.P., Richardson, N. V. and McKenzie, J. D., 2004. Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions. Comparative Biochemistry and Physiology, 139: 607-617.

Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J. and Esteban, A., 2008. Effect of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish & shellfish Immunology, 24, 663-668.

Cia, Y., Suyanandana, P., Saman, P. and Benno, Y., 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolator from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General Applied Microbiology, 45: 177-184.

David, J. A., Cyrill, J., W. C., Kendall, W. C. and Vuksan, V., 1999. Inuline, oligofructose and intestinal function. Journal of nutrition, 129: 1431-1433.

Hoque, M. Z., Akter, F., Hossin, K. M., Rahman, M. S. M. Billah, M. M. and Islam, K. M. D., 2010. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus spp. From Selective Regional Yoghurts. World Journal of Dairy & Food Sciences, 5(1): 39-46.

Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., MojaziAmiri, B., Khoshbavar Rostami, H. and Merrifield, D. L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquaculture Nutrition, 17: 498-504.

Mahious, A. S. and Ollevier, F., 2005. Probiotics and prebiotics in Aquaculture: Review.1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture ,Urmia, Iran, pp. 17-26.

Mahious, A. S., Gatesoup, F. J., Hevi, M., Metaller, R. and Ollevier, F., 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture International, 14: 219-229.

Makridis, P., Bergh, Q., Skjermo, J. and Vadstein, O., 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia* metanauplii to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International, 9: 225-235.

Mohseni, M., Pourkazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H. R. and Salehpour, M., 2006. Effects of feeding rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso.* Journal of Applied Ichthyology, 22: 278-282.

Olsen, R. E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T. M. and Ringo, E., 2001. Damagine effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Aquaculture Research, 32: 931-934.

Peter, H. and Sneath, A., 1986. Bergey's manual of systematic. Bacteriology, 2: 1104-1154.

Archive of SID

www.SID.ir

Pryor G.S., Royes J. B., Chapman F. A. and Miles R. D., 2003. Mannanoligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. North American Journal of Aquaculture, 65: 106-111.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Pyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 1998. Effects of a probiotic bacterium on survival and growth of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Journal of Aquaculture, 167: 301-313.

Ringo, E., bendiksen, H. R., Gausen, S. J., Sundsfjord, A. and Olsen, R. E., 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelila mucosa and from feacalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Journal of Applied Microbiology, 85: 855-867.

RingØ, E., Olsen R. E., Gifstad T. Ø., Dalmo R. A., Amlund, H., Hemre G. I. and Bake, A. M., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition, 16: 117-136.

Schley, P. D. and Field, C. J., 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. British Journal of Nutrition, 87: 221-230.

Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. and Sweetman, J., 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture International, 15: 153-161.

Taati, R., Abolghasemi, S. J., Tatina, M. and Nasri Tajan, M., 2012. Influence of prebiotic Immunowall on growth performance, body composition and immunophysiological variables in juvenile great sturgeon, *Huso huso*. Annals of Biological Research, 3(9): 4435-4441.

Taati, R., Soltani. M., Bahmani, M., Zamini, A. A., 2011a. Effect of the prebiotics Immunoster and Immunowall on growth performance of juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of Applied Ichthyology, 27(2): 796-798.

Taati, R., Soltani, M., Bahmani, M. and Zamini, A. A., 2011b. Growth performance, carcass composition, and immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(2): 324-335.

Archive of SID

www.SID.ir