Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۱۳۵- ۱۴۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

بررسی مقایسه‌ای تغییرات باکتریایی دستگاه گوارش بچه ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) متعاقب استفاده از پریبیوتیک‌های گالاکتو و فروکتوالیگوساکارید

سید حسین حسینی‌فر [*]: استادیار شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، hoseinifar@gau.ac.ir
رودابه روفچایی: کارشناس ارشد تغذیه و غذای زنده، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندرانزلی، ایران، r_rufchaie@yahoo.com

چکیده

مقدمه: دست‌کاری میکروبیوتای روده‌ای به سمت باکتری‌های بالقوه مفید (پروبیوتیک‌ها) اثر مفیدی بر فیزیولوژی و سلامت ماهی دارد. پریبیوتیک‌های مختلف اثر متفاوتی بر میکروبیوتای روده‌ای دارند. در پژوهش حاضر، اثر سطوح مختلف دو نوع پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید بر میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه که جزو گونه‌های ارزشمند اقتصادی دریایی خزر است، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر در قالب یک طرح کاملا تصادفی در ۵ تیمار و سه تکرار انجام شد؛ که در آن از سطوح صفر (کنترل)، ۱ و ۲ درصد پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید در جیره غذایی بچه ماهی کلمه به مدت ۶ هفته استفاده شد. در انتهای دوره تغییرات ایجاد شده در میکروبیوتای روده‌ای شامل تعدادکل باکتری‌ها، تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک و نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای از طریق کشت روی محیط‌های پلیت کانت آگار ودیمان روگزاوشارپ (ام آر اس) آگار بررسی شد.

نتایج: افزودن سطوح مختلف پریبیوتیک‌های گالاکتوو فروکتوالیگوساکارید اثر معناداری بر تعدادکل باکتری‌ها نداشت ($P\ value>۰/۰۵$). تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک میکروبیوتای روده‌ای در تیمارهای تغذیه شده با پریبیوتیک‌ها به طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بود ($P\ value<۰/۰۵$). باکتری‌های اسیدلاکتیک در تیمار گالاکتوالیگوساکارید افزایش تعداد بیشتری نسبت به تیمار فروکتوالیگوساکارید نشان دادند. بیش‌ترین میزان نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک به تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در تیمار تغذیه شده با ۲ درصد گالاکتوالیگوساکارید مشاهده شد ($P\ value<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر گویای امکان تغییر در جوامع باکتریایی میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه به سمت جوامع باکتریایی مفید بود. همچنین، مشخص شد استفاده از پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید کارایی بیشتری در مقایسه با فروکتوالیگوساکارید برای تغییر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه و افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک دارد.

واژه‌های کلیدی: گالاکتوالیگوساکارید، فروکتوالیگوساکارید، میکروبیوتای روده‌ای، ماهی کلمه، باکتری‌های اسیدلاکتیک

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شناخت میکروبیوتای روده‌ای ماهی‌ها نه تنها برای بررسی بیماری‌های ماهی مفید است بلکه از نقطه نظر اثر آن بر وضعیت فیزیولوژی و ایمنی ماهی نیز دارای اهمیت است (۱). تشکیل یک میکروبیوتای سالم و ثبات آن اثر ایمونوفیزیولوژیک بر میزبان دارد (۲). با شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فلور باکتریایی روده ماهی و میگو در دهه اخیر و مشخص شدن نقش آن‌ها در سلامتی و رشد میزبان، به عنوان پروبیوتیک، اهمیت این گروه از باکتری‌ها بیش از پیش مشخص شده است (۳). با وجود اینکه حضور باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بسیاری از ماهیان از جمله ماهی کاد اقیانوس اطلس، قزل آلای رنگین کمان، فیل ماهی، قره برون و چار قطبی ثابت شده است اما این باکتری‌ها بخش بسیار محدودی از میکروبیوتای روده‌ای را تشکیل می‌دهند (۴). به همین علت، کوشش شده است تا از طریق به کارگیری ترکیباتی در جیره غذایی تعداد این دسته از باکتری‌ها را افزایش داد (۵). یکی از مهم‌ترین ترکیباتی که در این رابطه پیشنهاد شده است، پربیوتیک‌ها هستند که به ترکیباتی اطلاق می‌شود که توسط میزان هضم و جذب نشده و توسط باکتری‌های بالقوه مفید روده (مانند لاکتوباسیلوس‌ها) مصرف شده و سبب افزایش تعداد آن‌ها می‌شوند (۶).

با وجود مطالعاتی که در سالیان اخیر پیرامون اثر پربیوتیک‌ها بر شاخص‌های رشد، ایمنی و فیزیولوژی ماهی انجام شده است، هنوز بررسی بسیاری از جنبه‌های مربوط به امکان تغییر در میکروبیوتای روده‌ای آبزیان و افزایش باکتری‌های مفید ناشناخته مانده است (۷). از جمله مطالعات انجام شده در این زمینه می‌توان به بررسی اثر پربیوتیک الیگوفروکتوز و اینولین بر میکروبیوتای روده‌ای ماهی توربوت[1] (۸)، فروکتوالیگوساکارید بر میکروبیوتای روده‌ای میگوی پا سفید غربی[2] (۹) و آرابینوزایلوالیگوساکارید برمیکروبیوتای روده‌ای تاسماهی سیبری[3] اشاره کرد. پژوهش‌های انجام شده نشان داده است که پربیوتیک‌های مختلف اثر متفاوتی بر سطوح باکتری‌های اسید لاکتیک داشته‌اند و حتی در مواردی استفاده از پربیوتیک‌های با درجه پلیمریزاسیون بالا به اثر سوء بر تعداد کل باکتری‌های و سطوح باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای و به تبع آن اثر زیان‌بار بر میزبان منجر شده است (۴ و ۱۰). از این رو انجام مطالعات مقایسه‌ای درباره اثر پربیوتیک‌ها مختلف بر میکروبیوتای روده‌ای کمک خواهد کرد تا بهترین پربیوتیک برای تغییر میکروبیوتای روده‌ای شناخته شود.

ماهی کلمه یکی از گونه‌های ارزشمند اقتصادی در دریای خزر است که امروزه به علت صید بی رویه، آلوده شدن دریا و از بین رفتن زیستگاه‌های تکثیر، صید آن بسیار کاهش یافته است (۱۱). به همین علت سازمان شیلات ایران به تکثیر مصنوعی و پرورش این گونه اهتمام ورزیده است. با وجود گزارش‌های منتشر شده در زمینه اثر پربیوتیک‌ها بر میکروبیوتای روده‌ای و افزایش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک، تا به امروز اطلاعاتی در زمینه پتانسیل ایجاد تغییر در میکروبیوتای روده‌ای ماهی کلمه گزارش نشده است. از این‌رو مطالعه حاضر با هدف تعیین پتانسیل تغییر میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه و سوق دادن آن به سمت جوامع بالقوه مفید با استفاده از دو نوع پربیوتیک در جیره غذایی انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره‌سو وابسته به موسسه تحقیقات شیلات ایران انجام شد. بچه ماهی‌های کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) با میانگین وزن اولیه ۰/۰۳ ± ۱/۳۶ گرم از مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال تأمین و پس از سازگاری اولیه به مدت ۱ هفته به تعداد ۴۵۰ قطعه ماهی به شکل تصادفی در ۱۵ تانک فایبرگلاس ۳۵۰ لیتری (۳۰ ماهی در هر تانک) در قالب ۵ تیمار و سه تکرار توزیع شدند. بچه ماهی‌ها با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف صفر (شاهد)، ۱ و ۲ درصد پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید و ۱ و ۲ درصدپربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید به مدت ۵۴ روز تغذیه شدند. در طول دوره آزمایش بچه ماهی‌ها تا حد سیری و روزانه ۲ بار با جیره‌های آزمایش، تغذیه شدند (۱۲). پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید جزو فروکتان‌های خطی و حاصل از هیدرولیز آنزیمی اینولین بوده که با نام تجاری رافتیلوز[۴] از شرکت اورافتی[۵] بلژیک تأمین شد. پربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید از تبدیل آنزیمی لاکتوز تهیه شده و با نام تجاری ویوینال[۶] از شرکت دوموفریزلند[۷] هلند تأمین شد.

در انتهای دوره آزمایش به منظور بررسی اثر دو نوع پربیوتیک استفاده شده بر میکروبیوتای روده‌ای، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک، تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در روده و همچنین، نسبت باکتری‌های اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه براساس روش کار ارایه شده توسط حسینی‌فر[۸] و همکاران (۴) تعیین شد. بدین منظور در ابتدای دوره پیش از رهاسازی ماهی‌های به تانک‌ها تعداد ۱۵ قطعه بچه ماهی و همچنین، در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تانک برای بررسی میکروبیوتای روده‌ای، نمونه‌برداری انجام شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، بچه ماهی‌ها با وارد نمودن ضربه فیزیکی به ناحیه سر کشته و با آب استریل شستشو داده شدند. سپس، ۶۰ ثانیه با محلول بنزلکونیوم کلراید ۰/۱ درصد و پس از آن دوبار با آب استریل شستشو داده شدند. این عمل، سبب از بین رفتن کامل باکتری‌های سطح خارجی بدن آن‌ها می‌شود تا از بروز خطای احتمالی در تعیین اثر پربیوتیک‌های مورد بررسی بر جوامع باکتریایی میکروبیوتای روده (تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک و تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر) بچه‌ماهی‌ها کاسته شود.

پس از ضدعفونی کردن و شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها با اسکالپل استریل، کالبدگشایی شده و روده آن‌ها خارج شد. نمونه‌های روده پس از تخلیه کامل محتویات، توزین و به منظور هموژن نمودن به هاون‌های چینی استریل منتقل شد. پس از هموژن نمودن، نمونه‌های روده با استفاده از محلول نمکی استریل رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه شد. از رقت‌های تهیه شده، در شرایط کاملا ضدعفونی حجمی معادل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته شد و به محیط‌های کشت پلیت کانت[۹] آگار (به منظور تعیین تعداد کل باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده) و محیط کشت ام آر اس[۱۰] (برای تعیین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک) منتقل و در سطح پلیت پخش شدند. پس از انجام عمل کشت، انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای اتاق و در شرایط هوازی انجام شد (۸). پس از سپری شدن زمان گرمخانه‌گذاری، باکتری‌های هر پلیت برحسب لگاریتم واحد جدایه[۱۱] در گرم وزن روده بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی شناسایی و شمارش شدند. پس از محاسبه تعداد کل و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک، میزان افزایش سطوح این باکتری‌های بالقوه مفید در اثر تغذیه با پربیوتیک‌های مدنظر تعیین شد.

www.SID.ir

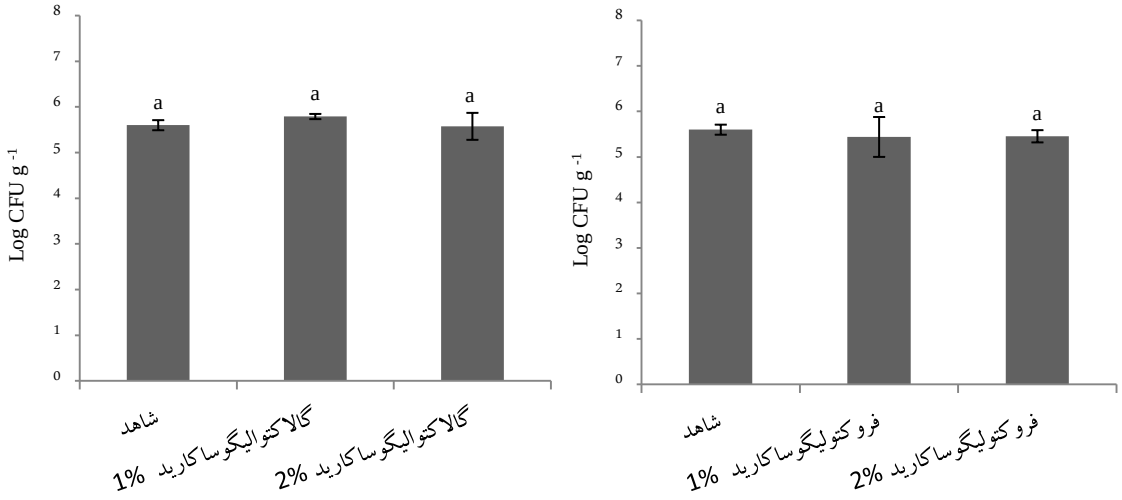
Archive of SID

پس از به دست آوردن داده‌های مربوط به بررسی میکروبیوتای روده‌ای ماهی کلمه، ابتدا نرمالیتی داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف[۱۲] بررسی شد. پس از مشخص شدن توزیع نرمال داده‌ها، برای بررسی وجود یا نبود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح اطمینان ۵ درصد از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه آنوا[۱۳] استفاده شد. همه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار اس پی اس اس[۱۴] (نسخه ۱۷) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۰) انجام شد.

نتایج

مقادیر تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر (برحسب لگاریتم واحد جدایه در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی نورس کلمه در اثر تغذیه با سطوح مختلف پریبیوتیک‌های گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید در شکل ۱ نمایش داده شده است. در ابتدای دوره تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر میکروبیوتای روده‌ای ۰/۲۴ ± ۵/۱۰ لگاریتم واحد جدایه بر گرم وزن روده بود. همان‌طورکه در شکل ۱- الف مشخص است به‌کارگیری سطوح ۱ و ۲ درصد گالاکتوالیگوساکارید در جیره غذایی بچه ماهی کلمه اثر معناداری بر تعدادکل باکتری‌ها در میکروبیوتای روده‌ای نداشت ($P\ value$ >۰/۰۵). همچنین، نتایج مشابهی درباره پریبیوتیک فروکتوالیگوساکارید مشاهده شد ($P\ value$ >۰/۰۵) (شکل ۱- ب).

اثر سطوح مختلف پریبیوتیک‌های فروکتوز و گالاکتوالیگوساکارید بر تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک (برحسب لگاریتم واحد جدایه در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه در شکل ۲ نشان داده شده است. در ابتدای دوره هیچ باکتری اسیدلاکتیکی ازمیکروبیوتای روده‌ای ماهی کلمه جدا نشد.



شکل ۱- اثر مقادیر مختلف پریبیوتیک‌های گالاکتوالیگوساکارید (الف) و فروکتوالیگوساکارید (ب) بر تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر[۱۵] (برحسب لگاریتم واحد جدایه در گرم وزن روده) در میکروبیوتای بچه ماهی کلمه. ستون‌ها (SD± میانگین) مشخص شده با حروف مشابه نشان دهنده نبودن اختلاف معنادار است ($P\ value$> ۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه نشان داد که در تیمار تغذیه شده با جیره شاهد فاقد پربیوتیک تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک از نظر آماری صفر یعنی پایین‌تر از حد قابل شمارش از نظر آماری (بین ۳۰ تا ۳۰۰ جدایه در نخستین رقت) بود. افزودن پربیوتیک به جیره غذایی سبب افزایش معنادار تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده شد. بیش‌ترین میزان افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک‌ها در بچه ماهی‌های تغذیه شده با ۲ درصد پربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید مشاهده شد که اختلاف معناداری با تیمار ۱ درصد گالاکتوالیگوساکارید و شاهد داشت (*P value*< ۰/۰۵). همچنین، در ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱ و ۲ درصد فروکتو الیگوساکارید افزایش معناداری در تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک با تیمار شاهد مشاهده شد (*P value*< ۰/۰۵)، اما اختلاف معناداری بین سطوح ۱ و ۲ درصد مشاهده نشد (شکل ۲) (*P value*> ۰ /۰۵).

جدول ۱ نشان دهنده نتایج مربوط به محاسبه نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک (باکتری‌های بالقوه مفید پروبیوتیکی) به تعداد کل باکتری‌ها در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهیان نورس کلمه تغذیه شده با پربیوتیک‌های مختلف است. نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک به تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در تمام تیمارهای پربیوتیکی به طور معناداری بیشتر از تیمار شاهد بود (*P value*< ۰/۰۵). بیش‌ترین میزان افزایش نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک به تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در تیمار تغذیه شده با ۲ درصد گالاکتوالیگوساکارید مشاهده شد که به طور معناداری بیشتر از سایر تیمارها بود (*P value*< ۰/۰۵). اگرچه افزودن پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید به جیره غذایی به طور معناداری نسبت باکتری‌های اسید لاکتیک را افزایش داد، اختلاف معناداری بین سطوح ۱و ۲ درصد بکارگیری مشاهده نشد (*P value*> ۰/۰۵).

با توجه به یکسان بودن شرایط در تمامی تانک‌ها، هوادهی و تعویض آب، تفاوت محسوسی بین واحدهای آزمایشی از نظر عامل‌های کیفی آب مشاهده نشد. مقادیر شاخص‌های کیفی آب شامل درجه حرارت، اکسیژن محلول و اسیدیته در طول دوره پرورش به ترتیب ۱/۸۲± ۲۴/۵۱ درجه سانتی‌گراد؛ ۰/۴۳± ۷/۶۳ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۱۰± ۷/۳۳ بود.

جدول ۱- نسبت (درصد) باکتری‌های اسیدلاکتیک[۱۶] به تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه تغذیه با سطوح مختلف پربیوتیک‌های گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید

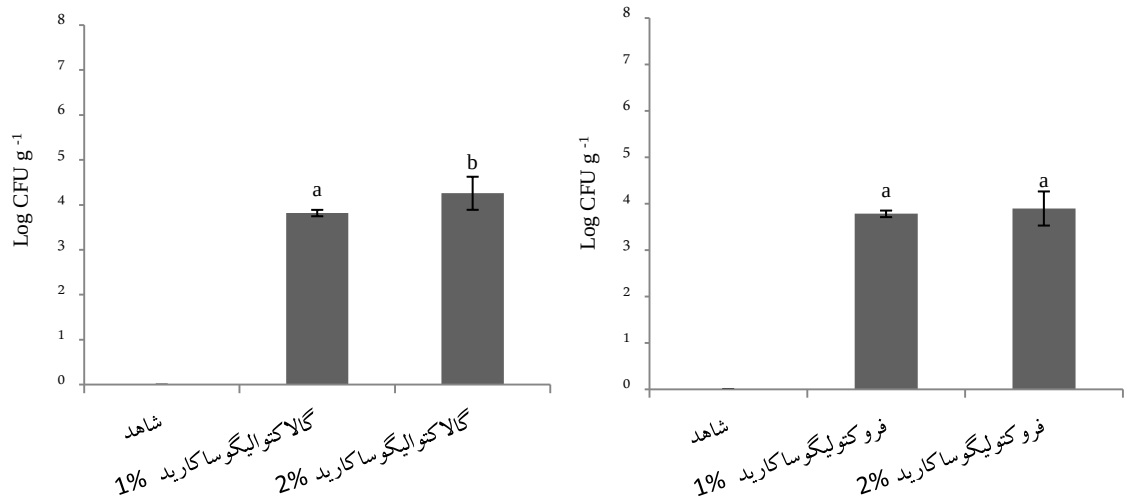
	نوع پربیوتیک	شاهد	۱ درصد	۲ درصد
نسبت LAB به TVC	گالاکتوالیگوساکارید	TFTC[a]	۱/۷۰± ۰/۳۴[b]	۴/۸۴±۰/۸۱[c]
	فروکتوالیگوساکارید	TFTC[a]	۲/۲۱± ۰/۶۲[b]	۲/۸۷±۰/۴۵[b]

اعداد هر ردیف‌ها (SD± میانگین) نشانه‌گذاری شده با حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنادار است (*P value*< ۰/۰۵).

TFTC: مقدار باکتری‌های اسید لاکتیک پایین‌تر از حد قابل شمارش از نظر آماری (بین ۳۰ تا ۳۰۰ جدایه در نخستین رقت) بود و صفر لحاظ شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر مقادیر مختلف پربیوتیک‌های گالاکتوالیگوساکارید (الف) و فروکتوالیگوساکارید (ب) بر تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک (بر حسب لگاریتم واحد جدایه در گرم وزن روده) در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه.
ستون‌ها (SD± میانگین) با حروف متفاوت دارای اختلاف معنادار هستند (*P value*< ۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

میکروبیوتای روده‌ای ماهی شامل مجموعه پیچیده‌ای از انواع باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری هستند. یکی از انواع باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده‌ای، باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که امروزه اهمیت بسیار زیادی در به کارگیری به عنوان پروبیوتیک دارند (۱۳). اگرچه جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از میکروبیوتای روده‌ای گونه‌های مختلفی از ماهی‌ها گزارش شده است ولی این دسته از باکتری‌ها جزو جوامع غالب باکتریایی روده نبوده و در میزان پایینی حضور دارند. باکتری‌های اسیدلاکتیک با تولید باکتریوسین‌ها مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زا شده و بدین ترتیب اثر مثبتی بر سلامت آبزیان دارند (۵). با وجود اینکه فرآیند دست‌کاری میکروبیوتای روده‌ای پیچیده بوده و روند آن به طور کامل مشخص نشده است، ولی شناخت هر چه بیشتر آن می‌تواند استفاده از روش‌های مبتنی بر دست‌کاری میکروبیوتای روده‌ای آبزیان را به عنوان یک راهبرد برای جلوگیری از بروز بیماری‌های باکتریایی و به تبع آن کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک میسر کند. یکی از روش‌هایی که برای بهبود ترکیب میکروبیوتای روده‌ای پیشنهاد شده است استفاده از مکمل‌های غذایی چون پربیوتیک‌هاست (۱۴- ۱۶). پربیوتیک‌ها عناصر غذایی غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک رشد یا افزایش تعداد باکتری‌های مفید روده‌ای اثر سودمندی بر میزبان دارند و امروزه به عنوان مکملی برای غذای آبزیان مطرح هستند (۳). تا به امروز مطالعات زیادی در زمینه اثر مفید پربیوتیک در انسان و حیوانات اهلی انجام شده و در سالیان اخیر به کارگیری این مکمل‌های غذایی در جیره غذایی ماهی‌ها و سایر آبزیان نیز مورد توجه قرار گرفته است (۱۴). مشخص شده است که کارایی و اثر گذاری پربیوتیک‌ها متاثر از درجه پلیمریزاسیون وبه تبع آن توانایی میکروبیوتای روده‌ای برای تخمیر آن‌ها می‌باشد (۱۷). بنابراین، برای

www.SID.ir

Archive of SID

اطمینان از تاثیر سودمند پربیوتیک مورد استفاده در جیره غذایی و انتخاب پربیوتیک بهینه باید با دقت و پژوهش، مقایسه‌ای بین پربیوتیک‌ها انجام شود که درهمین راستا مطالعه حاضر انجام شد.

نتایج پژوهش حاضر با هدف بررسی مقایسه‌ای سطوح ۱ و ۲ درصد دو نوع پربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید، اثر معناداری بر تعداد کل باکتری‌ها در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه نشان نداد (شکل ۱). نتایج مشابهی درباره اثر مخمر پربیوتیکی غیر فعال و پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید بر تعداد کل باکتری‌های میکروبیوتای روده‌ای بچه فیل ماهی پرورشی گزارش شده است (۴ و ۱۸). همچنین، استفاده از پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی توربوت اثر معنا داری بر تعداد کل باکتری‌های میکروبیوتای روده‌ای نداشت (۸). در مطالعه اکرمی[۱۷] و همکاران (۱۰) با افزایش سطح پربیوتیک اینولین از ۱ به ۳ درصد جیره، تراکم کل باکتری‌های روده کاهش یافت؛ زیرا مشخص شده که اینولین استخراج شده از ریشه کاسنی نسبت به سایر انواع پربیوتیک نظیر الیگوفروکتوز زنجیره طولانی‌تری داشته و آهسته‌تر تخمیر می‌شود. بی‌تأثیر بودن پربیوتیک‌های مورد استفاده بر تعداد کل باکتری‌ها احتمالا به علت محدود بودن جایگاه‌های اتصال در روده می‌باشد. به نظر می‌رسد اثرگذاری پربیوتیک‌ها بیشتر مربوط به تغییر ترکیب جوامع باکتریایی روده و افزایش نسبت باکتری‌های مفید باشد تا افزایش تعداد کل باکتری‌ها که به علت محدود بودن جایگاه‌های اتصال خیلی قابل تغییر نیست.

درباره اثر دو نوع پربیوتیک مورد بررسی در پژوهش حاضر بر باکتری‌های بالقوه مفید روده‌ای، نتایج گویای افزایش معنادار تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی‌های کلمه تغذیه شده با تیمارهای پربیوتیک نسبت به تیمار شاهد بود و بیش‌ترین افزایش تعداد در تیمار ۲ درصد گالاکتوالیگوساکارید مشاهده شد. مطالعات انجام شده در زمینه میکروبیوتای روده‌ای آبزیان نشان داده است که با وجود محدود بودن تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای، این دسته از باکتری‌های بالقوه مفید (پروبیوتیکی) می‌توانند از طریق استفاده از مکمل‌های پربیوتیکی افزایش تعداد پیدا کرده و جزو جوامع باکتریایی غالب شوند (۱۴). اگرچه تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر پربیوتیک‌های مختلف به شکل مقایسه‌ای بر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای و به ویژه تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک انجام نشده است، اما هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، ایری[۱۸] و همکاران (۱۹) در بررسی تغذیه‌ای روی بچه ماهی ازون برون مشاهده کردند که به‌کارگیری فروکتوالیگوساکارید (به عنوان پربیوتیک) در جیره غذایی سبب افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌شود. همچنین، استفاده از پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید و پربیوتیک مخمری به طور معنادار سبب افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای بچه فیل ماهی شد (۴). همچنین، نتایج مشابهی درباره اثر فروکتوالیگوساکارید بر سطوح باکتری‌های *باسیلوس* پروبیوتیکی در میکروبیوتای روده‌ای ماهی توربوت مشاهده شده است (۸). با این حال، پربیوتیک اینولین اثری بر تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی فیل نداشت. با وجود برخی از گزارش‌های موجود درباره اثر پربیوتیک

www.SID.ir

Archive of SID

گالاکتوالیگوساکارید بر شاخص فیزیولوژیکی و ایمنی ماهی تاکنون گزارشی درباره اثر پربیوتیک یاد شده بر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای ماهی گزارش نشده است. تفاوت مشاهده شده در تاثیر این پربیوتیک‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در ویژگی‌های فیزیولوژیک روده، نوع پربیوتیک و ترکیب میکروبیوتای روده‌ای گونه پرورشی باشد (۱۴).

نتایج پژوهش حاضر مبنی بر افزایش معناداری تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک و عدم تغییر معنادار تعداد کل باکتری‌های در بچه ماهی‌های تغذیه شده با پربیوتیک، گویای تغییر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای و افزایش سهم باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای است. بررسی مقایسه‌ای دو نوع پربیوتیک مورد استفاده در پژوهش حاضر نشان داد که بیش‌ترین نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک به تعداد کل باکتری‌ها در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی‌های نورس کلمه تغذیه شده با پربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید (سطح ۲ درصد) مشاهده شد. این مورد نشان دهنده کارایی بیشتر پربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید در مقایسه با فروکتوالیگوساکارید برای تغییر در میکروبیوتای روده‌ای و سوق دادن آن به سمت جوامع بالقوه مفید (باکتری‌های اسیدلاکتیک) است؛ که می‌تواند ناشی از تفاوت در درجه پلیمریزاسیون این دو پربیوتیک باشد. درجه پلیمریزاسیون گالاکتوالیگوساکارید [۲- ۸] بوده درحالی که درجه پلیمریزاسیون فروکتوالیگوساکارید [۱۰- ۶۰] است. احتمال دارد پربیوتیک‌ها با درجه پلیمریزاسیون پایین بهتر توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مصرف می‌شوند به طوری‌که براساس مطالعه اولسن[19] و همکاران (۲۰) افزایش پلیمریزاسیون سرعت تخمیر کند شده و این امر می‌تواند سبب انباشت پربیوتیک در دستگاه گوارش و اثر سوء بر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای و فیزیولوژی روده شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد استفاده از پربیوتیک گالاکتوالیگوساکارید کارایی بیشتری نسبت به پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید برای تغییر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی کلمه و افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک دارد. با این حال تعیین سطوح بهینه مصرف این پربیوتیک در جیره غذایی نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

References

(1) Ringø E., Strøm E., Tabachek J. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research* 1995; 26 (10): 773- 89.

(2) Salminen SJ., Gueimonde M., Isolauri E. Probiotics that modify disease risk. *Journal of Nutrition* 2005; 135(5): 1294- 8.

(3) Gibson GR. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements* 2004; 1 (2): 25- 31.

(4) Hoseinifar SH., Mirvaghefi A., Mojazi Amiri B., 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.

(5) Ringø E., Gatesoupe F- J. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 1998; 160 (3- 4): 177- 203.

(6) Manning TS., Gibson GR. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004; 18 (2): 287- 98.

www.SID.ir

Archive of SID

(7) Hoseinifar SH., Sharifian M., Vesaghi MJ., Khalili M., Esteban MÁ. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish & Shellfish Immunology* 2014; 39 (2): 231-236.

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

(9) Li P., Burr GS., Gatlin DM., Hume ME., Patnaik S., Castille FL., *et al.* Dietary supplementation of short−chdin fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *Journal of Nutrition* 2007; 137 (12): 2763- 8.

(10) Reza A., Abdolmajid H., Abbas M., Abdolmohammad AK. Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (linnaeus, 1758). *Journal of World Aquaculture Society* 2009;40 (6): 771- 9.

(11) Hoseinifar SH., Khalili M., Khoshbavar Rostami H., Esteban MÁ. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology* 2014; 35 (5): 1416- 20.

(12) Soleimani N., Hoseinifar SH., Merrifield DL., Barati M., Abadi ZH. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology* 2012; 32 (2): 316- 21.

(13) Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999; 180 (1-2): 147- 65.

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

(15) Rufcahei R., Hoseinifar SH., Faeed M. The study of modulation of gut microbiota of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) through administration of yeast based *prebiotic. Biological Journal of Microorganism* 2018; 4 (13): 93- 104.

(16) Hoseinifar SH., Mirvaghefi A., Amoozegar MA., Merrifield DL. Determination of the best synbiotic between probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* and prebiotics inulin, oligofructose and xylooligosaccharide. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (3):1- 12.

(17) Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition* 2007; 137 (3): 830S- 7S.

(18) Hoseinifar SH., Mirvaghefi A., Merrifield DL. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture* 2011; 318 (1-2): 90- 4.

(19) Akrami R., Iri Y., Khoshbavar Rostami H., Razeghi Mansour M.Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish & Shellfish Immunology* 2013; 35 (4): 1235- 9.

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

www.SID.ir

Archive of SID

[1]- Turbot (*Scophthalmus maximus*)
[2]- (*Litopenaeus vannamei*)
[3]- Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)
[4]- raftilose
[5]- Orafti
[6]- Vivinal-GOS
[7]- Friesland Foods Domo Company
[8]- Hoseinifar
[9]- Plate count
[10]- deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) agar
[11]- Log CFU
[12]- kolmogorov-smirnov
[13]- One-Way ANOVA
[14]- SPSS
[15]- Total viable counts
[16]- Lactic acid bacteria
[17]- Akrami
[18]- Iri
[19]- Olsen

www.SID.ir

Archive of SID

Comparative study of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry gut microbiota modulation following administration of galacto- and fructooligosaccharide prebiotics

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

Abstract

Introduction: Modulation of intestinal microbiota toward potentially beneficial communities (probiotics) positively affects fish physiology and health status. Different prebiotics showed contradictory effects on intestinal microbiota. The present study investigates the effects of different levels of two prebiotics, galacto- and fructooligosaccharide on intestinal microbiota of Caspian roach fry which is a commercially valuable species of Caspian sea.

Materials and methods: The study was performed as a randomized design with 5 treatments and 3 replications in which Caspian roach were fed different levels, 0, 1, and 2% of galacto- and fructooligosaccharide prebiotics for 6 weeks. At the end of the trial culture, analysis of intestinal microbiota include lactic acid bacteria levels, total bacteria as well as proportion of LAB were performed by using MRS agar, Plate count agar media.

Results: Administration of different levels of galacto- and fructooligosaccharide had no significant effects on total bacteria of intestinal microbiota ($P > 0.05$). The lactic acid bacteria levels significantly increased compared to control group following prebiotics administration in diet ($P < 0.05$). LAB levels in galactooligosaccharide treatment were higher than those of fructooligosaccharide treatment. The highest LAB proportion in intestinal microbiota was observed in roach fed diet which contains 2% galactooligosaccharide ($P < 0.05$).

Discussion and conclusion: The results of the present study revealed that prebiotics can be used for modulation of Caspian roach intestinal microbiota toward beneficial bacterial communities. Also, the results showed that galactooligosaccharide was more efficient than fructooligosaccharide in case of modulation of intestinal microbiota and elevation of LAB levels.

Key words: *Galactooligosaccharide, Fructooligosaccharide,* Intestinal microbiota, *Rutilus frisii kutum, Lactic acid bacteria*

* Corresponding author
Received: May 11, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014

www.SID.ir