Archive of SID

Influence of poly-β-hydroxybutyrate and it,s degrading bacteria on metabolic diversity of anaerobic bacteria in siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) hindgut

Ebrahim Hossein Najdegerami *
Assistant professor of Applied Biological Science, Urmia University, Urmia, Iran, e.gerami@urmia.ac.ir
Peter Bossier
Professor of Microbiology, Gent University, Gent, Belgium, peter.bossier@ugent.be

Abstract

Introduction: Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) is a natural polymer that can be depolymerized by bacterial extracellular enzymes into β-hydroxybutyric acid monomers.

Materials and methods: In this study, the effects of PHB and it's degrading bacteria on the metabolic diversity of anaerobic bacteria in Siberian sturgeon hindgut were investigated in four treatments (Control, 2% PHB, combination of two degrading bacteria, 2% PHB + two bateria) for 60 days. The Shanon diversity index, Evenness and Pareto-Lorenz curve was calculated with Biolog^{TM} Ecoplates data.

Results: The results indicated that using supplemented diets significantly increased Shanon index and evenness then control ($P<0.05$) and the highest rate for this parameters was observed in 2% PHB. According to the Pareto-Lorenz curve results, the highest hindgut anaerobic bacterial diversity was observed in 2% PHB as well.

Discussion and conclusion: Our results suggest that the diet supplemented with PHB and it's degrading bacteria increase anaerobic bacterial diversity, however, degrading bacteria cannot accelerate PHB degradation in fish hindgut.

Key words: Poly-β-hydroxybutyrate, Shanon index, Evenness, Pareto-Lorenz curve

* Corresponding author
Received: June 7, 2016 / **Accepted:** March 8, 2017

www.SID.ir

Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۷۴- ۶۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

تأثیر پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات و باکتری‌های تجزیه‌کننده آن بر تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی روده در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*)

ابراهیم حسین نجدگرامی *: استادیار علوم زیستی کاربردی، دانشگاه ارومیه، ایران، e.gerami@urmia.ac.ir
پیتر بوسیر: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه گنت، بلژیک peter.bossier@ugent.be

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های خارج سلولی، پلیمر طبیعی پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات (PHB) را تجزیه و به مونومر بتاهیدروکسی‌بوتیریک‌اسید تبدیل می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، آثار استفاده از PHB و باکتری‌های تجزیه‌کننده آن بر تنوع متابولیکی باکتری های بی‌هوازی انتهای روده بچه ماهیان تاسماهی سیبری در چهار تیمار تغذیه‌ای (شاهد، ۲ درصد PHB، ترکیب دو باکتری تجزیه‌کننده PHB، ترکیب PHB و دو باکتری تجزیه‌کننده) به مدت ۶۰ روز بررسی شد و شاخص‌های شانون ایندکس، ایونس (Eveness) و منحنی پاراتو- لورنز (Pareto-lorenz curve) با استفاده از روش CLPP محاسبه شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که استفاده از تیمارهای غذایی، میزان شاخص شانون ایندکس و ایونس باکتری‌های بی‌هوازی انتهای روده بچه ماهیان را به‌طور معناداری نسبت به شاهد افزایش می‌دهد ($P<0.05$) و بیشترین میزان این شاخص‌ها در تیمار ۲ درصد PHB مشاهده می‌شود. بررسی نتایج منحنی پاراتو- لورنز نشان داد که پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی‌هوازی انتهای روده در تیمار ۲ درصد PHB، بیشترین میزان را نسبت به سایر تیمارها دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند که استفاده از PHB و باکتری‌های تجزیه‌کننده آن، میزان تنوع و پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی‌هوازی بچه ماهیان تاسماهی سیبری را افزایش می‌دهد، هرچند استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده آن بر میزان تجزیه PHB تأثیری ندارد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات، شانون ایندکس، ایونس، منحنی پاراتو- لورنز

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, 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

استفاده از اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره[1] برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری پیشنهاد شده است (۱). استفاده از این مواد محدودیت هایی نظیر محلولیت زیاد و انتشار آسان آنها در محیط های آبی داردکه باعث مصرف زیاد این مواد برای تأثیرگذاری بهتر در جیره‌های غذایی آبزیان می‌شود (۲)؛ پژوهشگران، روش‌های مختلفی را برای حل این مشکل پیشنهاد کرده‌اند نظیر استفاده از پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات (PHB) که پلیمر اسید چرب بتاهیدروکسی‌بوتیرات (β-HB)[2] است که به‌عنوان منبع کربن داخل سلولی در باکتری‌های مختلف استفاده می‌شود (۴،۲ و ۲۸). این ماده در آب نامحلول است و برخی باکتری‌های داخل روده آن را به‌شکل زیست‌شناختی تجزیه و به مونومر β-HB تبدیل می کنند که تمام ویژگی‌های تعریف‌شده اسیدهای چرب کوتاه زنجیره در داخل روده جانداران را نشان می‌دهد (۵ و ۶). در مطالعه‌های مختلف، آثار مثبت استفاده از ماده یادشده در جیره غذایی آبزیان نظیر افزایش رشد و سطح ایمنی سخت‌پوستان و ماهیان (۴ و ۷-۱۰)، تغییر فلور و افزایش تنوع میکروبی در بچه ماهیان سی بس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*)، میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) و بچه ماهیان تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) ثابت شده است (۴، ۸ و ۱۱).

با توجه به آثار PHB روی تغییر فلور و تنوع باکتریایی روده آبزیان، روش‌های مختلفی برای بررسی شاخص‌های یادشده در مطالعه‌های مختلف پیشنهاد شده‌اند. در سال‌های اخیر، در کنار روش‌های سنتی کشت باکتریایی و همچنین روش‌های مولکولی مانند روش PCR-DGGE، روش دیگری برای بررسی تنوع متابولیکی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی پیشنهاد شده است که CLPP[3] نامیده می‌شود. بررسی تنوع متابولیکی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی روده جانداران و سایر محیط‌های طبیعی به‌شکل مجزا از مزیت‌های این روش نسبت به روش‌های مولکولی است. در این روش از میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت[4] برای محاسبه شاخص های اشاره‌شده استفاده می‌شود؛ در این میکروپلت‌های ۹۶ خانه‌ای، ۳۱ منبع کربنی به اضافه یک خانه محتوی آب (شاهد) و ۳ تکرار از منابع کربنی و آب وجود دارد و باکتری‌ها با مصرف ماده اولیه داخل خانه‌ها و انجام متابولیسم، رنگ خانه‌ها را با احیای ترازولیوم (Tetrazolium redox dye) به صورتی تغییر می‌دهند. با خواندن شدت تغییر رنگ با روش کالریمتری، میزان تنوع متابولیکی[5] و فعالیت متابولیکی[6] باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی نمونه‌های بررسی‌شده مشخص می‌شود (۱۱-۱۴).

این طرح با هدف بررسی آثار استفاده توأم PHB و باکتری‌های تجزیه‌کننده آن (*Acidovorax* sp.) بر تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی کشت‌پذیر انتهای روده با استفاده از روش CLPP در بچه ماهیان تاسماهی سیبری طراحی و اجرا شد و شاخص‌های شانون، ایونس و همچنین پراکنش گونه‌ای این باکتری‌ها با استفاده از داده‌های میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت محاسبه شدند.

مواد و روش‌ها

این طرح در مرکز رفرانس آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه گنت در کشور بلژیک انجام شد. در پژوهش حاضر، تعداد ۵۹۲ عدد بچه ماهی تاسماهی سیبری با وزن اولیه ۰/۹±۱۱/۱ گرم در حوضچه‌های فایبر گلاس

www.SID.ir

Archive of SID

۳۰۰ لیتری به مدت ۶۰ روز با جیره‌های حاوی PHB و باکتری‌های تجزیه‌کننده آن (*Acidovorax* sp.) تغذیه شدند و در انتهای دوره، تنوع متابولیکی باکتری‌های بی هوازی انتهای روده آنها با روش CLLP بررسی شد. در این طرح، از چهار تیمار غذایی استفاده شد: ۱- غذای کنسانتره (شاهد)، ۲- غذای کنسانتره حاوی دو گونه باکتری (*Acidovorax* spp.) تجزیه‌کننده PHB هر کدام با تراکم 10^{-7} CFU/g feed، ۳- غذای کنسانتره حاوی ۲ درصد PHB، ۴- غذای کنسانتره حاوی ترکیب ۲ درصد PHB و باکتری‌ها به شرح گفته‌شده.

لیو[۷] و همکاران، باکتری‌های استفاده‌شده در این طرح با نام‌های S4 و S7 را از انتهای روده بچه ماهیان تاسماهی سیبری جداسازی کردند؛ این بچه ماهیان به مدت ۴۵ روز با جیره حاوی سطح ۲ درصد این ماده تغذیه شده بودند. نتایج توالی‌یابی[۸] روی این دو باکتری نشان داده بود که S4 و S7 به‌ترتیب با احتمال ۹۹ و ۹۶/۹ درصد به *Acidovorax* sp. تعلق دارند (۱۵). باکتری های جداسازی‌شده در محیط‌کشت LB broth به مدت ۴۸ ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد پرورش داده شدند و پس از جداسازی و شمارش آنها از طریق فتومتری، هر کدام با غلظت 10^{7}CFU/g feed همراه با محلول ۰/۲ درصد کلسیم‌آلژینات روی غذا (تیمارهای دوم و چهارم) اسپری شدند. برای اطمینان از وجود تراکم مدنظر باکتری‌ها در غذا، عمل اضافه‌کردن آنها به شکل روزانه برای تیمارهای یادشده انجام و ۲ تا ۳ بار در هر هفته در انتهای روز از غذای بچه ماهیان نمونه‌برداری و تراکم باکتری‌ها آزمایش شد.

برای اندازه‌گیری میزان CLPP در میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت، سوسپانسیون باکتریایی از محتویات انتهای روده تهیه شد. به این منظور، ۳ ماهی از هر تکرار به‌شکل تصادفی نمونه‌برداری و با محلول ۲ میلی‌لیتر ۲- فنوکسی‌اتانول در ۱ لیتر آب بیهوش شدند. پس از بازکردن قسمت شکمی ماهی‌ها در شرایط استریل، ۱ گرم از محتویات انتهای روده آنها نمونه‌برداری شد و پس از مخلوط‌کردن آن با ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (۰/۸۵ درصد نمک) و هموژنایزکردن با دستگاه هموژنایزر (Stomacher 400, Model BA 7021, UK)، ذره‌های حل‌نشدنی آن با فیلتر ۵۰ میکرون جدا شدند. محلول حاصل دوباره ۱۰ بار رقیق و حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و ۱۳۰ میکرولیتر از این محلول در هر کدام از خانه‌های میکروپلت‌ها ریخته و میکروپلت‌ها به مدت ۹۶ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی نگهداری شدند. سپس میزان جذب نوری هر کدام از خانه‌ها با دستگاه پلت ریدر (TECAN, Model infinite M200, Austria) پس از ۲۴ ساعت در طول موج ۵۹۰ خوانده و میانگین تکامل رنگ (AWCD)[۹] در خانه‌های میکروپلت با توجه به رابطه زیر محاسبه شد:

$$AWCD=\sum(C-R)/n$$

C= میزان جذب نوری داخل هر کدام از خانه های میکروپلت پس از انکوباسیون، R= میزان جذب نوری در خانه حاوی آب و n= تعداد ماده اولیه در میکروپلت ها که در میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت، ۳۱ عدد است.

داده‌های خام حاصل از دستگاه پلت ریدر با AWCD کل نرمال (۱۶ و ۱۷) و شاخص‌های شانون ایندکس، ایونس و منحنی پارتو- لورنز برای بررسی تنوع متابولیکی و پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی هوازی انتهای روده از طریق رابطه‌های زیر محاسبه شدند:

www.SID.ir

Archive of SID

Shannon diversity index (H′)=-∑*Pi* Ln *Pi*
Evenness (E)=H′/ln S

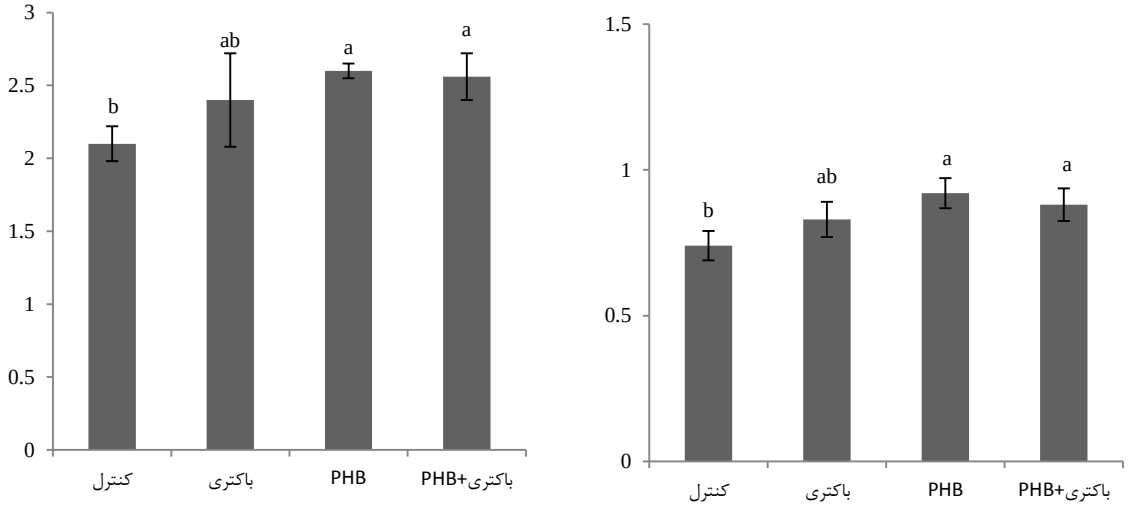
Pi= جذب نسبی در هر خانه میکروپلت، H′= شانون ایندکس و S= تعداد خانه‌هایی که باکتری‌ها در آنها متابولیسم داشته‌اند و باعث تغییر رنگ خانه‌ها شده‌اند.

محاسبات آماری: داده ها و تمام شکل‌های مقاله حاضر در نرم‌افزار Excel 2007 ویرایش شدند. برای نرمال کردن داده‌های حاصل از میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت، داده‌ها بر AWCD تقسیم شدند و سپس، از این داده‌ها برای سایر محاسبه‌ها استفاده شد.

نتایج

داده‌های حاصل از میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت برای محاسبه شاخص شانون ایندکس و ایونس استفاده شدند و نتایج آنها در شکل ۱ مشاهده می‌شوند. بر اساس این نتایج، فلور باکتری‌های بی‌هوازی کشت‌پذیر در انتهای روده بچه ماهیانی که از تیمار PHB و تیمار باکتری به اضافه PHB تغذیه کرده بودند، بیشترین میزان شاخص شانون ایندکس و با تیمار شاهد اختلاف معنادار داشتند ($P<0.05$). به بیان دیگر، باکتری های بی هوازی در تیمارهای یادشده دارای بالاترین سطح تنوع متابولیسمی و اختلاف معنادار با تیمار شاهد (دارای پایین ترین سطح تنوع متابولیسمی) بودند. نتایج مشابهی نیز در شاخص ایونس فلور باکتری‌های بی‌هوازی بچه ماهیان دیده شد، به این ترتیب که بیشترین ایونس در بچه ماهیان تغذیه‌شده با تیمارهای PHB و باکتری به اضافه PHB و کمترین ایونس در تیمار شاهد مشاهده شد ($P<0.05$).

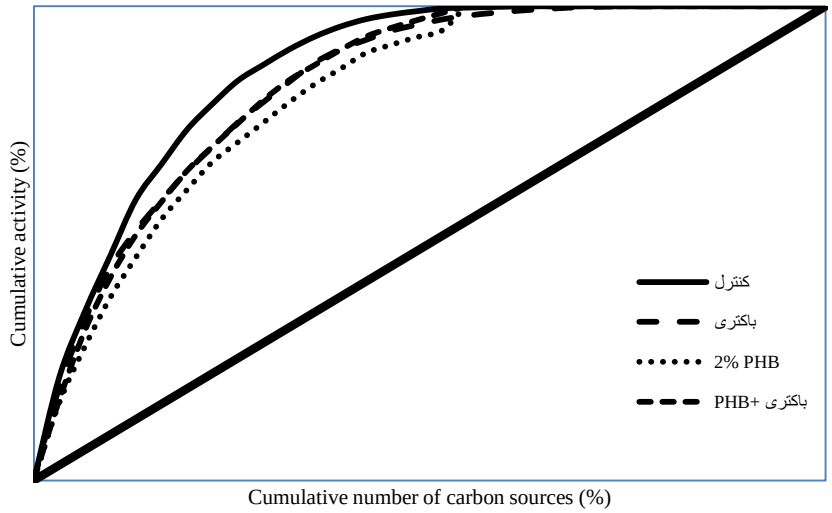
منحنی پارتو- لورنز برای بررسی پراکنش گونه‌ای در اکوسیستم‌ها استفاده می شود و مطابق نتایج شکل ۲، میزان پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی‌هوازی کشت‌پذیر در تیمار ۲ درصد PHB نسبت به سایر تیمارها بیشتر است (منحنی تیمار ۲ درصد PHB به خط ۴۵ درجه نزدیک‌تر است).



شکل ۱- شاخص شانون ایندکس (چپ) و ایونس (راست) برای باکتری‌های بی‌هوازی انتهای روده بچه ماهیان تاسماهی سیبری که از تیمارهای پژوهشی تغذیه کرده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی‌هوازی کشت‌پذیر در روده بچه ماهیان تاسماهی سیبری بر اساس داده‌های میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام‌شده، فلور میکروبی روده آبزیان نقش بسیار مهمی در فیزیولوژی و تغذیه جاندار بازی می‌کند (۱۸) و تلاش‌ها برای تغییر این فلور در راستای بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی در حال افزایش هستند (۱۹ و ۲۰). با توجه به مطالعات انجام‌شده، PHB پلیمری طبیعی و دارای ویژگی‌های پریبیوتیکی است (۹) و در رورده آبزیان بر اثر آنزیم‌های خارج سلولی باکتری‌ها به مونومر β-HB تبدیل می‌شود (۹، ۲۱ و ۲۲). آثار مثبت استفاده از این ماده در تغییر و بهبود تنوع فلور باکتریایی در سی بس اروپایی (۴)، تاسماهی سیبری (۱۱)، میگوی آب شیرین (۸) و خرچنگ چینی (۹) با استفاده از روش‌های مولکولی (PCR-DGGE) گزارش شده است. بر اساس یافته‌های این مطالعه‌ها، PHB با تغییر تعادل باکتریایی روده از طریق کاهش تراکم باکتری‌های غالب در روده و هدایت آن به سمت فلوری متعادل، باعث بهبود شاخص‌های مطالعه‌شده می‌شود. همچنین افزایش تنوع باکتریایی به فلور روده اجازه می‌دهد عملکرد بهتری برای تأثیرگذاری روی فرایندهای تغذیه‌ای و ایمنی داشته باشد (۲۳ و ۲۴).

در این میان، باکتری‌های بی‌هوازی نقش بسیار مهمی در تغذیه، جذب مواد غذایی و همچنین سیستم ایمنی روده ماهیان بازی می‌کنند (۲۰ و ۲۵) و بررسی تنوع و غنای این دسته از باکتری‌ها پاسخگوی بسیاری از پرسش‌ها درباره بحث تغذیه و سیستم ایمنی ماهیان است. نجدگرامی و همکاران در سال‌های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۵، از درصدهای مختلف PHB برای تغذیه بچه ماهیان تاسماهی سیبری استفاده و تنوع متابولیکی باکتری های هوازی و بی‌هوازی انتهای روده را با روش CLPP بررسی کردند. نتایج آنها نشان دادند که استفاده از ۲ درصد PHB باعث افزایش تنوع متابولیکی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی انتهای روده بچه ماهیان می‌شود. در پژوهش یادشده، با فرض اینکه افزایش تجزیه PHB سبب تشدیدشدن آثار مثبت آن در روده آبزیان می‌شود، ترکیب دو گونه باکتری S4 و S9 (*Acidovorax* sp.) به جیره‌ها اضافه و آثار این جیره‌ها بر تنوع باکتری‌های بی

www.SID.ir

Archive of SID

هوازی روده از طریق داده‌های میکروپلت‌های بیولوگ اکوپلت در بچه ماهیان بررسی شد؛ نتایج نشان دادند که بیشترین شاخص شانون ایندکس و ایونس به‌ترتیب در تیمارهای غذایی ۲ درصد PHB، باکتری به اضافه PHB و در نهایت باکتری مشاهده می‌شود و این تیمارها دارای اختلاف معنادار با تیمار شاهد بودند که کمترین مقدار این شاخص‌ها را داشت. نتایج پژوهش حاضر با نتایج نجدگرامی و همکاران (۲۰۱۱ و ۲۰۱۵) درباره افزایش تنوع باکتریایی در تیمار ۲ درصد PHB هم‌خوانی دارد و از آنجا که اضافه‌کردن باکتری‌های تجزیه‌کننده PHB به جیره‌های غذایی آبزیان برای نخستین بار در پژوهش حاضر انجام شده است، دلایل تأثیرنداشتن این باکتری‌ها بر افزایش تجزیه PHB به بررسی بیشتر نیاز دارد. به نظر می‌رسد عدم زنده‌مانی این باکتری‌ها در روده بچه ماهیان بر اثر اسید معده و سایر شرایط دستگاه گوارش است که توانایی آنها را در تجزیه بیشتر PHB و در نتیجه افزایش تنوع متابولیکی کاهش می‌دهد.

نتایج منحنی پارتو- لورنز نشان دادند که تنوع و پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی‌هوازی در روده بچه ماهیانی که از تیمار ۲ درصد PHB استفاده کرده بودند نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. بر اساس نتایج پژوهش‌های انجام‌شده، رابطه‌ای قوی بین تنوع و پراکنش گونه‌ای در اکوسیستم‌ها و تولید در آنها وجود دارد (۲۶ و ۲۷). نتایج پژوهش حاضر درباره میزان تولید و تنوع باکتریایی در تیمارها با اصل یادشده هم‌خوانی دارد به‌طوری که بیشترین میزان افزایش رشد در بچه ماهیانی دیده شد که از تیمار ۲ درصد PHB استفاده کرده بودند (داده‌های پذیرش‌شده در مجله پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی).

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که استفاده از PHB، میزان تنوع باکتریای‌های بی‌هوازی روده را افزایش می‌دهد و این، با نتایج پژوهش پیشین در این زمینه هم‌خوانی دارد. هرچند اضافه‌کردن باکتری‌های تجزیه‌کننده PHB، تأثیر معناداری بر تجزیه این ماده و میزان تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی روده بچه ماهیان تاسماهی سیبری نداشت، بررسی‌های بیشتر برای یافتن دلایل احتمالی این امر ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات و کمک‌های تکنسین های مرکز رفرانس آرتمیا در دانشگاه گنت بلژیک تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

(1) Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier, P. Short-chain fatty acids and poly-β-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances* 2009; 27(4): 680-685.

(2) Defoirdt T., Sorgeloos P., Bossier P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* 2011;14(2): 251–258

(3) Tokiwa Y., Ugwu C. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *Journal of Biotechnology* 2007; 132(1): 264-272.

(4) De Schryver P., Sinha A., Kunwar P., Baruah K., Verstraete W., Boon N., et al. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009; 86(5): 1535-1541.

www.SID.ir

Archive of SID

(5) Doyle C., Tanner E., Bonfield W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of poly hydroxybutyrate and of poly hydroxybutyrate reinforced with hydroxyl apatite. *Biomaterials* 1991; 12(2): 841-847.

(6) Anderson A., Dawes E. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 1990; 54(1): 450-472.

(7) Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 2007; 25(2): 472-479.

(8) Nhan D., Wille M., De Schryver P., Defoirdt T., Bossier P., Sorgeloos P. The effect of poly-β-hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture* 2010(4); 302: 76-81.

(9) Sui L., Cai J., Sun H., Wille M., Bossier P., Effect of poly-b-hydroxybutyrate on Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, larvae challenged with pathogenic. *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* 2012(3); 35: 359-364

(10) Najdegerami EH. The effects of poly-β-hydroxybutyrate on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larval and juveniles culture. PhD thesis, Belgium: Ghent University; 2012.

(11) Najdegerami EH., Ngoc Tran T., Defoirdt T., Marzorati M., Sorgeloos P., Boon N., et al. Effects of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) on Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) Fingerlings Performance and its GI tract Microbial Community. *Microbiology ecology* 2011; 79(2): 25-33.

(12) Preston-Mafham J., Boddy L., Randerson PF. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source-utilization profiles-a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 2002; 26(3): 1-14.

(13) Uchii K., Matsui K., Yonekura R., Tani K., Kenzaka T., Nasu M., et al. Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of Bluegill (*Lepomis macrochirus*) with three different feeding habits. *Microbiology Ecology* 2006; 51(1): 277–284.

(14) Weber KP., Legge RL. *Bioremediation: methods and protocols*. 1st ed. New Jersey: The Humana Press Inc; 2009.

(15) Liu Y., De Schryver P., Van Delsen B., Maignien L., Boon N., Sorgeloos P., et al. PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS Microbiology Ecology* 2010; 74(3): 196-204.

(16) Garland J., Mills A. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57(5): 2351-2359.

(17) Insam H. Substrate utilization tests in microbial ecology-A preface to the special issue of the Journal of Microbiological Methods. *Journal of Microbiological Methods* 1997; 30(4): 1-2.

(18) Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 2010; 41(3), 1553-1573.

(19) Roeselers G., Mittge EK., Zac Stephens W., Parichy DM., Cavanaugh CM., Karen Guillemin K., et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal* 2011;5(1): 1595-1608.

(20) Wu S., Wang G., Angert ER., Wang WW., Li WX., Zou H. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLOS One* 2012; 7: e30440.

(21) Gebauer B., Jendrossek D. Assay of poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Applied Environmental Microbiology* 2006; 72(2): 6094-6100.

www.SID.ir

Archive of SID

(22) Halet D., Defoirdt T., Van Damme P., Vervaeren H., Forrez I., Van de Wiele T., et al. Poly-β-hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Fems Microbiology Ecology* 2007; 60(3): 363-369.

(23) Brockhurst MA., Fenton A., Roulston B., Rainey PB. The impact of phages on interspecific competi- tion in experimental populations of bacteria. *BMC Ecology* 2006; 6(4): 19-30.

(24) De Schryver P., Dierckens K., Quyen Quyen BT., Amalia R., Marzorati M., et al. Convergent dynamics of the juvenile European sea bass gut microbiota induced by poly-b-hydroxybutyrate. *Environmental Microbiology* 2011; 13(3): 1042-1051.

(25) Ramirez RF., Dixon BA. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angel fish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 2003; 227(3): 417-426.

(26) Wilsey B., Potvin C. Biodiversity and ecosystem functioning: Importance of species evenness in an old field. *Ecology* 2000; 81: 887-892.

(27) Wittebolle L., Marzorati M., Clement L., Balloi A., Daffonchio D., Heylen K., et al. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 2009; 458(1): 623-626.

(28) Moghaddam M., Hashemi Beidokhti M., Biodegradable plastics from Sinorhizobium meliloti as plastics compatible with the environment and human health. *Biological journal of Microorganism* 2016; 4(16): 55-64.

[1]- Short chain fatty acids
[2]- β hydroxybutric acid (β-HB)
[3]- Community-Level Physiological Profiles
[4]- Biolog^{TM} Ecoplate
[5]- Metabolic diversity
[6]- Metabolic activity
[7]- Liu
[8]- DNA sequencing
[9]- Average well-color development (AWCD)

www.SID.ir