Arch Original Article مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۸، دوره ۷۴، شماره ۱، ۱۰۳-۹۳ مقاله تحقیقی
DOI: 10.22059/jvr.2018.233209.2627

تأثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسما خون در فیل ماهی (*Huso huso*)

تکاور محمدیان[۱]، سراج بیتا[۲]، رسول ناصری پورتکلو[۲]

[۱] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران
[۲] دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۵ شهریور ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به دلیل اثرات مفید در سلامت ماهی رشد فزاینده‌ای دارد. محافظت پروبیوتیک‌ها با پوشش‌های فیزیکی علاوه بر جلوگیری از غیر فعال شدن آن‌ها در شرایط معدی – روده‌ای ماهی، توان پروبیوتیکی آن‌ها را بهبود می‌بخشد.

هدف: بررسی اثر ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) با نانوذرات آلژینات/کیتوزان بر ویژگی‌های پروبیوتیکی آن در شرایط برون‌تنی (Invitro) و نیز اثرات پروبیوتیکی آن در فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*) می‌باشد.

روش کار: ابتدا اثر ریزپوشانی باکتری بر ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری در شرایط برون‌تنی و سپس اثر آن در فیل‌ماهی جوان مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۴۸۰ قطعه فیل‌ماهی با جیره‌های آزمایشی در چهار تیمار (تیمار T۱ با خوراک حاوی آلژینات/کیتوزان بدون پروبیوتیک، T۲ با خوراک حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان، T۳ با خوراک حاوی پروبیوتیک بدون پوشش و گروه کنترل با خوراک پایه) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. سپس به مدت ۱۵ روز با غذای فاقد پروبیوتیک غذادهی شدند. فاکتورهای بیوشیمیایی در روزهای ۳۰، ۶۰، ۷۵ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج حاصل نشان دهنده این امر بود که ویژگی‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریز پوشانی شده در شرایط برون‌تنی بطور معنی‌داری نسبت به باکتری معمولی ارجحیت داشت ($P<0/05$). در اکثر فاکتورهای بیوشیمیایی بجز تری گلیسرید در تیمار پروبیوتیک ریزپوشانی شده اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($P<0/05$).

نتیجه گیری نهایی: مطالعه حاضر نشان دهنده این امر می‌باشد که ریزپوشانی باکتری با نانوذرات کیتوزان/آلژینات کارایی پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم را بهبود می بخشد و می‌تواند عملکرد مثبت پروبیوتیکی بر فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسما را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، نانوذرات کیتوزان/آلژینات، فاکتور بیوشیمیایی

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۵۵۱۱۰ نمابر: ۰۶۱۱-۳۳۳۶۰۸۰۷ Email: takavar_m2002@yahoo.com

How to Cite This Article

Mohammadiyan, T., Bita, S., Naseri Pourtaklo, R. (2019). Effect of *Lactobacillus plantarum* Encapsulated With Alginate / Chitosan on Biochemical Factors in the Beluga (*Huso huso*). J Vet Res, 74(1), 93-103. doi: 10.22059/jvr.2018.233209.2627

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اســتفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره به منظور بهبود وضعیت سلامت ماهیان پیشــنهاد شده است (۲۶) که این میکروارگانیســم‌های زنده با ویژگی‌های مفیدی می‌باشند و هم‌چنین استفاده از این میکروارگانیسم‌ها به عنوان یک روش جایگزینی پیشــگیری کننده در انسان‌ها و حیوانات کاربرد دارد که از طریق تغییر توازن باکتریایی میکروبیوتای روده‌ای به ســمت باکتری‌های بالقوه مفید ســبب بهبود وضعیت ســلامت و ایمنی میزبان می‌شوند (۱۳). در این میان باکتری‌های لاکتوباسیلوس مهمترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند که اثرات سودمندی روی میزبان خود دارند. این باکتری‌ها، گرم مثبت هستند و معمولاً در محیط‌های بی‌هوازی زندگی می‌کنند اما آن‌ها می‌توانند شــرایط هوازی را هم تحمل کنند. لاکتوباســیلوس پلانتاروم یک باکتری پروبیوتیک، گرم مثبت، هتروفرمنتاتیو، میله‌ای، غیر اسپورزا، غیر متحرک و تولید کننده اسیدلاکتیک بوده که می‌تواند در محدوده دمایی ۱۵ °C تا ۴۵ رشد کند (۲۳). برحسب استانداردها، برای بروز ویژگی‌های سلامتی‌بخش پروبیوتیک‌هــا باید به تعــداد 10^6 cfu/gr تا 10^7 از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشــند. مانع اصلی برای حفظ این سطوح پیشنهادی، قابلیت زنده‌مانی ناچیز ناشــی از تنش اسیدیته و اکســیژن توسعه یافته و نقصان مواد غذایی می‌باشــد (۳۶). علاوه بر این pH بسیار پایین معده، همچنین حضور نمک‌های صفراوی در روده، دلایل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول‌های انتقال یافته است. از این رو بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مســیر دســتگاه گــوارش از اهمیت زیادی برخوردار اســت (۱۰،۱۷). جهت غلبه بر این مشکلات، شیوه‌های مختلفی شامل کشت‌های میکروبی، ریزپوشانی و افزودن پری‌بیوتیک‌ها وجود دارد (۵). از عمده‌ترین ترکیبات مورد استفاده در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها، آلژینات سدیم است که یک هتروپلی‌ساکارید خطی است و از دو مونومر D- مانورونیک اسید و L- گلورونیک اســید تشکیل شده است و از انواع جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود. علت استفاده از آن ارزانی، سهولت کاربرد، سمی نبودن، فناوری آســان و مطابقت و سازگاری با محیط زیست می‌باشد و به عنوان افزودنی مجاز غذایی شناخته شده است (۲،۲۸). به دلیل اینکه آلژینات در حضور یون کلســیم ژل تشکیل می‌دهد، قرارگرفتن آن در محیط‌های یونی یا عوامل شلاته کننده مانند فسفات‌ها، لاکتات‌ها، و سیترات (که یون کلسیم را جذب می‌کنند) باعث از هم‌پاشی کامل کپسول آلژینات می‌شود (۲). که این عیب را می‌توان به وســیله پوشــش دادن سطح بیرونی آلژینات با سایر ترکیبات پلی‌مری بهبود بخشید. کیتوزان یک پلی‌ساکارید خطی با بار منفی ناشی از گروه‌های آمینی است که از دی-استیلاسیون کیتین به دست می‌آید. بعد از سلولز، کیتین فراوان‌ترین پلی‌ساکارید طبیعی در زمین است. به دلیل اینکه بازده کیتوزان در افزایش قابلیت زنده‌مانی ســلول‌ها رضایت بخش نیست معمولاً این پلی‌ســاکارید بیشتر به عنوان پوشش استفاده می‌شود (۲۸). در کنــار این خصوصیت محافظت کنندگی، مخلوط آلژینات-کیتوزان مزیت دیگری دارد که باعث می‌شــود مواد مغذی و متابولیت‌ها بتوانند از کپسول به بیرون یا داخل انتشــار پیدا کنند در نتیجه مواد هســته دارای متابولیسم فعالی خواهند بود (۱۱). در حقیقت ریزپوشــانی باکتری‌های پروبیوتیک با پوشش آلژینات و کیتوزان محافظت در برابر شرایط شیره گوارشی را فراهم می‌کنــد، بنابراین روش خوبی برای تحویل ســلول‌های باکتریایی زنده به روده می‌باشد.

خــون بــه عنوان یک بافت حیاتی ســیال و اجزاء مختلف پلاســما از فاکتورهای مهم و مناسب برای تعیین وضعیت فیزیولوژیک موجودات زنده می‌باشند که در اختیار داشتن مقادیر طبیعی این پارامترها و بررسی چگونگی تغییرات آن‌ها در کنترل روند زیســتی موجودات زنده از جمله آبزیان به ما کمک می‌کنند. اهمیت پارامترهای خون شناسی برای دستیابی به وضعیت فیزیولوژی مناسب به منظور ارتقا، توسعه و بهبود پرورش، بهداشت، سلامت و فیزیولوژی تولیدمثل و تکثیر آبزیان و به ویژه ماهیان بسیار واضح می‌باشد (۳۵). در حقیقت فاکتورهای بیوشــیمیایی خون به عنــوان اولین تغییرات قابــل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در رابطه با وضعیت ســلامت آبزیان، اثر مواد ســمی بر آبزیــان، ارزیابی اثرات مواد مغذی و مکمل‌های تغذیــه‌ای و دارویی در اختیار قرار دهند و به عنوان بخش اصلی بســیاری از مطالعات علوم شیلاتی محسوب گردند. بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی خون در زمینه‌های مختلف علوم شــیلاتی با اســتفاده از آنالیز پلاسما و یا ســرم خون صورت می‌گیرد (۲۰). مواد آلی پلاسما شامل پروتئین‌ها (آلفا، بتا، گاما گلوبولین‌ها و ایمونوگلوبین‌ها، آلبومین‌ها، فاکتورهای انعقاد خون، آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌ها)، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و هورمون‌ها هستند و مواد معدنی پلاسما نیز متشکل از الکترولیت‌ها و سایر نمک‌های معدنی است. لــذا با توجه به اهمیت فیل ماهــی در ایران و جهان و این مهم که تاکنون بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی پروبیوتیک‌هایی که ریزپوشانی شده باشند در فیل ماهی تحقیقی صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه تعیین اثر ریزپوشانی آلژینات /کیتوزان بر عملکرد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بررســی تغییرات فاکتورهای بیوشــیمیایی بعد از اضافه کردن به جیره‌ی غذایی بچه فیل ماهی (*Huso huso*) بود.

مواد روش کار

تهیه باکتری پروبیوتیک: در این تحقیق از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداسازی شده از روده ماهی شیربت (*Torgrypus*) استفاده شد. این باکتری با اســتفاده از ژن ۱۶s rRNA توسط Mohammadian در سال ۲۰۱۲، جداسازی و شناسایی شد. باکتری مورد نظر در سرم فیزیولوژی اســتریل به صورت سوسپانسیون درآمد و بر اســاس استاندارد مک فارلند بــا غلظت $10^9 \times 2/4$ باکتری زنده در هر میلی لیتر تنظیم شــدند و جهت ریزپوشانی کردن مورد استفاده قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

فرآینـد ریزپوشـانی (Micro encapsulation): در این تحقیق از تکنیک ریزپوشانی امولسیون بهره‌گیری شد. امولسیون کردن یک تکنیک شیمیایی مناسـب برای ریزپوشانی سلول‌های زنده پروبیوتیکی است و در آن از فاز هیدروکلوئیدهای مثل آلژینات و کاراجینان استفاده می‌گردد. این روش بر اساس ارتباط میان فازهای پیوسته و ناپیوسته است. برای امولسیون کردن یک امولسـیفایر و سورفاکتانت و ترکیب قوام دهنده (تثبیت کننده) مانند کلرید کلسیم استفاده می‌گردد. براساس روش Huiyi و همکاران در سـال ۲۰۱۳، ابتدا g ۵ پودر کربنات کلسیم به ml ۱۰۰ آب مقطر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شد. مقدار ml ۳/۵ سوسپانسیون کربنات کلسیم به ml ۵۵ محلول آلژینات ۲درصد بر روی دستگاه همزن مغناطیسی با دور rpm۲۰۰ در حـال گردش اضافه و مدت ۳۰ دقیقه هموژن گردید. مقدار ml ۱۰ از محلول حاصل با ml ۵ سوسپانسـیون میکروبی با غلظت ($۱۰^۹$ ×۲/۴) مخلـوط و به مـدت ۱۵ دقیقه با همزن بـا دور rpm ۳۵۰ هموژن شـد. در یک بشـر دیگر، مقدار ml ۳۵ روغن گیاهی (روغـن کلزا) را با g ۰/۵ اسـپن ۸۰ مخلوط و آن را به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰ هم زده، سـپس محلول حاصل با محلول بالا مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن آزمایشـگاهی هموژن گردید. ml ۱۰روغن کلزا و ml ۰/۵ اسید استیک با هم مخلوط و قطره قطره به محلول فوق اضافه شـد تا pH به حدود ۳/۵ رسـید و ۳۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰هم زده شد. در مرحله بعد با استفاده از بافر نمکی فسـفات محلول حاصل به مدت ۵ دقیقـه در دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا روغن از محصول جدا شود. در مرحله نهایی به میزان ml ۱۵ محلول کیتوزان ۰/۴درصد به مدت ۳۰ دقیقه ، قطره قطره با دور rpm ۸۰۰ بـه محلول اضافه شـد و بعد به مدت یک سـاعت در حالت چرخش گذاشته شـد تا به‌هم زده شـود. در نهایت باکتری‌های ریزپوشانی شده به وسیله سانتریفیوژ با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شد.

بررسی مشخصات شمارش تعداد باکتری‌ها در محصول ریزپوشانی شـده: ویژگی‌های محصول ریزپوشانی شده شامل اندازه ذرات، با استفاده از دستگاه پارتیکل سایزر (۱Qudix Korea Scatterscope) مشخص گردیدند. جهت تعیین کارایی فرآیند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی،gr ۱ از میکروکپسول‌ها داخل ml ۹۹ محلول ۱ درصد (وزنی/ حجمی) سیترات سدیم استریل که pH آن در حدود ۷/۲ تنظیم شده است پراکنده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق توسـط دستگاه Stomacher همزده شد تا باکتری‌ها به طور کامل در بافر آزاد شوند (۲۷).

بررسی برون تنی توان پروبیوتیکی باکتری‌های ریزپوشانی شده (آماده سازی شرایط شبیه سازی شده معده): شرایط شبیه سازی شده شیره معده، مطابق با روشMichida و همکاران در سـال ۲۰۰۶ انجام گرفت. بطور خلاصه پپسـین با محلول سـدیم کلراید g ۰/۵ تا رسیدن به غلظت g/l ۳ مخلوط شد، و سپس pH آن به وسیله اسید کلریدریک استریل (M ۰/۱) به ۲/۵ رسانده شد، محلول حاصله بوسیله میکرو فیلتر µl ۰/۴۵ استریل گشت.

آماده سـازی شرایط شبیه سازی شده روده: شرایط شبیه سازی شده شـیره روده مطابق روش Charteris و همکاران در سـال ۱۹۹۸، انجام گرفت. بدین ترتیب که، پانکراتین با سـدیم کلرید ۰/۵درصد تا رسیدن به غلظت نهایی g/l ۱ با ۴/۵درصد محلول نمک‌های صفراوی مخلوط شـد، سـپس pH آن با محلول سود M ۰/۱ اسـتریل به حدود ۷/۲ رسانده شد، محلول حاصل بوسیله میکرو فیلتر µl ۰/۴۵ استریل گشت.

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده در شرایط شبیه سازی شـده شـیره معده و روده: بر اسـاس روش Mokarram و همکاران در سـال ۲۰۰۹، مقدار g ۱ از باکتری‌های ریزپوشانی شده به روش امولسیون و همراه با ml ۱ از سوسپانسـیون باکتری‌های آزاد داخل تیوب‌های حاوی ml ۹ از شیره معده ریخته شد و برای مدت ۲ ساعت در دمای ^{o}C ۲۲ روی همزن قرار گرفت. سپس خارج گردیده، به تیوبی که حاوی ml ۱۰ محیط شـبیه سازی شده روده می‌باشد انتقال داده شد و ۲ ساعت در دمای ^{o}C ۲۲ قـرار گرفت و در طی این مدت، در فواصل زمانی ۰، ۶۰، ۱۲۰ دقیقه تعداد سلول‌های آزاد در نمونه‌های ریزپوشانی شده و آزاد با استفاده از روش رقیق سـازی توسـط پپتون واتر، در محیط MRS Agar کشت داده شد و تعداد کلونی‌های تشکیل شده بعد از ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ^{o}C ۳۷ شمارش شد. این کار با ۳ تکرار برای هر نمونه انجام شد.

آماده سازی ماهیان مورد آزمایش: این تحقیق در استان گلستان و در ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره سو واقع در ناحیه جنوب شرق خلیج گرگان و فاصله ۵ کیلومتری شهرستان بندر ترکمن انجام شد. منبع آب ورودی از چاه، تحت فشار وارد مخزن اصلی و از آنجا همراه هوادهی وارد هر یک از وان‌ها می‌شد. تعداد ۳۰۰ قطعه فیل‌ماهی با میانگین وزنی g ۴/۸±۲۳/۳۶ از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان توسط ماشـین حمل بچه ماهی مجهز به کپسـول اکسیژن به ایستگاه قره سو و به وان‌های مورد نظر منتقل شـدند. ماهی‌ها پس از طی دو هفته سازش با غذای دستی(شـرکت فرادانه)، در ۱۵ تانک فایبرگلاس (۴ تیمار هرکدام با ۳ تکرار) با حجم آب‌گیریL ۱۰۰۰ و با تراکم ۲۵ قطعه در هر تانک ذخیره سازی شدند. به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر فاکتورهای بیوشیمیایی ماهیان، ۴ تیمار غذایی تهیه شد (جدول ۱).

بدین منظور، غذای مورد نیاز برای هر هفته محاسبه و به میزان ۲×۱۰^۹ باکتری ریزپوشانی به هر گرم غذا اضافه شد و سپس در شرایط سایه و در مجاورت جریان هوا خشـک و در طول مدت مصرف در یخچال نگهداری شد.

ارزیابی تأثیر تجویز پروبیوتیک‌ها بر فاکتورهای بیوشیمیایی: به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌ها بر فاکتورهای بیوشیمیایی از تعداد ۳ عدد ماهی از هر تکرار در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ روز پس از تغذیه با پروبیوتیك و روز ۷۵ (یعنی ۱۵ روز پس از قطع مصرف پروبیوتیك) خون‌گیری و جداسازی سرم صورت‌گرفته و جهت آزمایشات مذکور در دمای ^{o}C ۷۰- نگهداری گردیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون: اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتوفتومتر UV/VIS یونیکو (ساخت آمریکا) مدل ۲۱۰۰ صورت گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین تام پلاسما: اندازه‌گیری پروتئین تام پلاسما براساس واکنش بایوره صورت گرفت. در این روش در شرایط قلیائی یون‌های کوپریک با اتم‌های کربونیل اکسیژن و آمید نیتروژن یک کمپلکس آبی مایل به بنفش ایجاد می‌کنند که شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین موجود در نمونه پلاسما می‌باشد. شدت جذب نور در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح پروتئین استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد. استاندارد پروتئین تام نیز بصورت جداگانه تهیه گردید (۱۸).

اندازه‌گیری آلبومین: اندازه‌گیری آلبومین پلاسما براساس روش برموکرزول گرین صورت گرفت. در این روش، آلبومین پلاسما بطور انتخابی با برموکرزول-گرین (BCG) تشکیل یک کمپلکس سبز مایل به آبی می‌دهد که شدت رنگ آن با غلظت آلبومین موجود در نمونه پلاسما در ارتباط می‌باشد. شدت جذب نور در طول موج ۶۳۰ nm اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح آلبومین استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد. استاندارد آلبومین نیز بصورت جداگانه تهیه گردید (۱۸).

اندازه‌گیری گلوبولین: اندازه‌گیری گلوبولین پلاسما براساس نسبت آلبومین از پروتئین تام پلاسما و با کسر نمودن آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه گردید (۱۸).

اندازه‌گیری گلوکز: اندازه‌گیری گلوکز پلاسما براساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز صورت گرفت. در این روش، گلوکز موجود در نمونه پلاسما توسط آنزیم اختصاصی گلوکز اکسیداز به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌شود. آب اکسیژنه نیز به روش تریندر سنجیده شد. در واکنش تریندر، آب اکسیژنه با یک فنل و آمینوآنتی پیرن (AAP) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ nm رنگ‌سنجی شده و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح گلوکز استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ محاسبه گردید (۳۴).

اندازه‌گیری کلسترول: اندازه‌گیری کلسترول براساس روش آنزیمی CHO-PAP صورت گرفت. در این روش، ابتدا استرهای کلسترول توسط آنزیم کلسترول-استراز به کلسترول آزاد هیدرولیز می‌شوند. سپس کلسترول در حضور اکسیژن مولکولی اکسید و آب اکسیژنه تولید می‌گردد. سپس آب اکسیژنه به‌روش تریندر سنجش می‌شود. در واکنش تریندر، آب اکسیژنه با یک فنل و آمینوآنتی پیرن (AAP) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ nm رنگ سنجی و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح کلسترول استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد (۳۳).

اندازه‌گیری تری‌گلیسرید: اندازه‌گیری تری‌گلیسرید براساس روش آنزیمی GPO-PAP صورت گرفت. در این روش، تری‌گلیسرید توسط آنزیم لیپاز به گلیسرول و اسید چرب هیدرولیز می‌شود. سپس گلیسرول در طی چند واکنش پی در پی به تولید محصول آب اکسیژنه می‌انجامد. آب اکسیژنه‌ی تولید شده نیز توسط واکنش تریندر اندازه‌گیری می‌شود. در این واکنش، آب اکسیژنه با یک فنل و آمینوآنتی پیرن (AAP) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به‌نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ nm رنگ سنجی و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح تری‌گلیسرید استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد (۳۳).

آنالیز آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یك طرفه و دو طرفه نرم افزار SPPS نسخه شماره ۲۲ استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

شمارش تعداد ریزپوشینه‌ها و تعیین اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن‌ها: تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از ریزپوشانی $2/4\times10^{9}$ ml/cfu محاسبه شد. بر حسب داده‌های بدست آمده تعداد باکتری‌های ریزپوشینه شده $2/02\pm0/06\times10^{9}$ ml/cfu محاسبه شد (نمودار ۱). مشاهده با روش SEM نشان داد که ریزپوشینه‌ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند.

زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط مشابه شیره معده و روده: در این تحقیق زنده‌مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به صورت ریزپوشانی شده و بدون پوشش در طی ۱۲۰ دقیقه در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده فیل ماهی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۲).

سطح پروتئین تام پلاسما: مطابق جدول ۳ آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که تیمارهای آزمایشی، زمان و اثر متقابل این دو، تأثیر معنی‌داری بر سطح پروتئین تام پلاسما ندارند ($P\geq0/001$). در روز صفر در بین ۴ گروه اختلاف معنی‌داری دیده نشد. پس از ۳۰، ۶۰ و ۷۵ روز تغییر معنی‌داری در سطح پروتئین تام بین گروه‌های تحت تیمار مشاهده نشد. با این حال سطح آن در روز ۶۰ در ماهی‌های تحت تیمار پلانتاروم ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین سطح پروتئین پلاسما در تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۷۵ پس از قطع غذای حاوی پروبیوتیک کاهش نشان داد (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تقسیم بندی تیمارهای مختلف غذایی.

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
T۱	غذای حاوی آلژینات و کیتوزان بدون باکتری	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)
T۲	غذای حاوی باکتری ریزپوشانی شده به روش امولسیون	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)
T۳	غذای حاوی باکتری بدون پوشش	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)
کنترل	غذای فاقد آلژینات کیتوزان و باکتری	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)

جدول۲. تعداد (کپسول cfu/g) باکتری‌های زنده‌مانده لاکتوباسیلوس پلانتاروم آزاد و ریزپوشانی شده از انکوباسیون در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در توالی‌های زمانی مختلف pH =۷/۲ و ۳۷ C.

پروبیوتیک / تیمار	زمان (دقیقه)		
	صفر	۶۰	۱۲۰
باکتری آزاد	۱/۸۴±۰/۰۶×۱۰^{۹}	۱/۷۴±۰/۰۹×۱۰^{۹}	۱/۵۹±۰/۰۹×۱۰^{۹}
باکتری ریزپوشانی شده	۱/۳۳±۰/۳۰×۱۰^{۹}	۱/۸۶± ۰/۵۵×۱۰^{۹}	۲/۰۳±۰/۰۶×۱۰^{۹}

میـزان آلبومیـن: نتایج مربوط به مقایسـه میزان گلوبولین سـرم در تیمارهای مورد بررسـی در روز صفـر و روز ۳۰ اختلاف معنی‌داری با تیمار شـاهد نداشـت ($P>۰/۰۵$)، با ادامه‌ی روند تغذیه از جیره‌های آزمایشی و مقایسـه تیمارها در روز ۶۰، نشـان داد که تیمار پلانتـاروم دارای اختلاف معنی‌داری، به جز پلانتاروم ریزپوشانی شده، با سایر تیمارها و تیمار شاهد می‌باشـد ($P<۰/۰۵$). با ادامه روند تغذیه و نمونه‌برداری در روز ۷۵ مشاهده شـد که پلانتاروم و پلانتاروم ریزپوشانی شـده علی‌رغم قطع پروبیوتیک در جیـره غذایی با روز صفر، ۳۰ و ۶۰، دارای اختلاف معنی‌داری هسـتند ($P<۰/۰۵$).

میزان تری‌گلیسرید: مطابق جدول ۳ آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که تیمارهای آزمایشی، زمان و اثر متقابل این دو، تأثیر معنی‌داری بر سطح تری‌گلیسرید دارند ($P<۰/۰۰۱$). کاهش معنی‌دار در سطح تری‌گلیسرید در ماهی‌های تغذیه شده با جیره حاوی آلژینات/کیتوزان در روزهای ۳۰ و ۶۰ نسبت به گروه‌های پروبیوتیکی و کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). با این حال سـطح تری‌گلیسرید پلاسما در ماهی‌های تحت تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۶۰ افزایش معنی‌داری نشان داد. همچنین سطح تری‌گلیسرید پلاسما در تیمارهای پروبیوتیکـی در روز ۷۵ پس از قطع غذای حاوی پروبیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داد (جدول ۲).

سطح فسفر: افزایش معنی‌دار در سطح فسفر در ماهی‌های تغذیه شده با جیره حاوی پلانتاروم در روز ۳۰ نسـبت به سـایر گروه‌های آزمایشـی و کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). با این حال سطح فسفر پلاسما در ماهی‌های تحت تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها و گروه کنترل، نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

میزان کلر: افزایش معنی‌دار در سـطح کلر در ماهی‌های تغذیه شده با جیره حاوی آلژینات/کیتوزان در روز ۶۰ نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی و کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

میزان کلسترول: سطح کلسترول پلاسما در ماهیان در روزهای ۳۰ و ۶۰ در همه گروه‌های آزمایشـی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). همچنین کلسترول پلاسما در روز ۷۵ در ماهی‌های تغذیه شده با جیره حاوی پلانتاروم ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌داری بعد از قطع جیره‌ی مکمل، افزایش یافت.

سطح کلسیم: سطح کلسیم پلاسما در ماهیان در روزهای صفر و ۳۰ در همه‌ی گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). سطح کلسیم در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار پلانتاروم ریزپوشانی شده در روز ۶۰ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، همچنین سطح کلسیم پلاسما در تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۷۵ پس از قطع غذای حاوی پروبیوتیک کاهش نشان داد (جدول ۳).

سـطح گلوکز: سـطح گلوکز پلاسـما در ماهی‌های تحت تیمارهای آزمایشی با گروه کنترل در تمامی روزهای نمونه‌برداری، اختلاف معنی‌دار را نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

سـطح منیزیم: سطح منیزیم پلاسـما در ماهی‌های تحت تیمارهای آزمایشی با گروه کنترل در تمامی روزهای نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار را نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

بحث

استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در آبزیان در حال افزایش می‌باشد. اهمیت روزافزون پروبیوتیک‌ها از یک طرف و قابلیت زنده‌مانی اندک این میکروارگانیسم‌ها در حین عبور از دستگاه گوارش عمدتاً به دلیل pH پایین و نمک‌های صفراوی از طرف دیگر، باعث شده تا پژوهشگران همیشه به دنبال راه‌های برای افزایش ماندگاری این میکروارگانیسـم‌ها باشند. با این حال هنوز نیاز به تحقیقات زیادی در این مورد می‌باشـد. به منظور افزایش زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در شرایط معده و روده فیل‌ماهی این باکتری به وسـیله آلژینات سدیم ریزپوشانی و با کیتوزان پوشش داده شد. مشاهده با روش SEM نشان داد که ریزپوشینه‌ها از نظر شکل ظاهری

www.SID.ir

Archive of SID

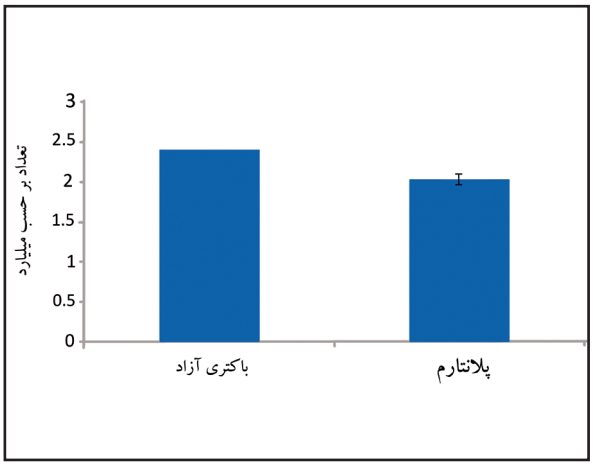
جدول ۳. مقایسه نتایج آزمایشات بیوشیمیایی در تیمارهای آزمایشی در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ مطالعه. * اطلاعات بر اساس میانگین ± انحراف معیار آورده شده است. حروف کوچک لاتین غیر همنام نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر می‌باشد).

فاکتور	تیمارها	روز صفر	روز۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
پروتئین (gr/dl)	T۱	۴/۵۶±۰/Ba۳۱	۴/۶۸±۰/۳۷ Aba	۵/۰۶±۰/۴۴ Aba	۵/۱۳±۰/۳۵ Aa
	T۲	۴/۴۹±۰/۲۸ Ba	۴/۷۷±۰/۲۰ Ba	۵/۹۴±۱/۲۱ Aa	۵/۴۱±۰/۴۵ Aa
	T۳	۴/۵۶±۰/۳۱ Ba	۴/۸۵±۰/۳۹ Ba	۵/۳۲±۰/۲۲ Aa	۴/۴۲±۰/۴۶ Bb
	کنترل	۴/۵۶±۰/۳۱ Aa	۴/۸۰±۰/۲۸ Aa	۴/۹۵±۱/۰۳ Aa	۴/۴۸±۰/۵۲ Ab
آلبومین (gr/dl)	T۱	۱/۲۴±۰/۰۷ Aa	۱/۲۴±۰/۱۰ Aa	۱/۳۲±۰/۱۲ Ab	۱/۳۴±۰/۱۰ Ab
	T۲	۱/۲۵±۰/۰۶ Ba	۱/۲۱±۰/۰۴ Ba	۱/۴۶±۰/۱۹ Aab	۱/۴۳±۰/۰۷ Aab
	T۳	۱/۲۰±۰/۰۲ Ba	۱/۲۶±۰/۰۹ Ba	۱/۴۹±۰/۰۸ Ba	۱/۵۲±۰/۱۷ Aa
	کنترل	۱/۲۹±۰/۰۶ Aa	۱/۳۰±۰/۱۴ Aa	۱/۴۸±۰/۲۰ Aab	۱/۴۲±۰/۱۸ Aab
تری گلیسرید (mg/dl)	T۱	۲۱۷/۳۲±۹۰/۲۹ Aba	۲۳۵/۴۹±۶۸/۰۷ Bb	۲۴۳/۲۹±۶۰/۷۶ Bb	۲۷۸/۹۶±۱۱۰/Abab۰۶
	T۲	۲۳۰/۴۶±۸۱/۹۵ Ba	۲۲۴/۵۵±۲۵/۶۰ Bb	۳۴۱/۴۱±۸۵/۶۵ Aab	۲۱۷/۴۷±۵۸/۶۴ Bb
	T۳	۲۶۴/۸۲±۳۳/۲۶ Aba	۳۹۳/۶۲±۱۵۴/۹۷ Aa	۳۹۴/۹۰±۱۲۰/۷۲ Aa	۲۳۱/۹۵±۵۸/۳۶ Bb
	کنترل	۲۲۱/۰۴±۶۰/۵۶ Ba	۲۱۷/۳۰±۵۳/۱۱ Bb	۳۶۲/۸۸±۸۱/۵۹ Aa	۳۷۲/۶۵±۵۰/۰۲ Aa
فسفر (mg/dl)	T۱	۱۳/۱۸±۳/۲۱ Aba	۹/۳۸±۶/۰۵ Aab	۱۷/۰۰±۶/۷۶ Aa	۱۵/۱۰±۶/۶۰ Aab
	T۲	۹/۳۹±۳/۸۶ Ba	۷/۰۳±۰/۹۶ Bb	۱۶/۴۸±۶/۱۳ Aa	۱۷/۵۴±۲/۱۶ Aab
	T۳	۱۱/۵۷±۱/۹۷ Ba	۱۵/۹۳±۷/۴۲ Aba	۱۵/۸۶±۵/۸۲ Aba	۲۱/۵۸±۴/۴۴ Aa
	کنترل	۱۱/۷۸±۴/۳۰ Aa	۱۰/۹۹±۴/۱۱ Aab	۱۲/۸۵±۴/۹۳ Aa	۱۵/۰۹±۳/۸۷ Ab
کلر (mg/dl)	T۱	۱۴۶/۶۸±۹/۷۹ Aa	۱۴۵/۹۴±۲۱/۷۵ Aa	۱۷۲/۷۳±۱۶/۱۴ Aa	۱۴۷/۵۳±۲۱/۳۰ Aac
	T۲	۱۴۸/۰۹±۱۱/۲۲ Aa	۱۲۰/۷۹±۱۹/۳۷ Bb	۱۵۵/۹۱±۱۳/۱۲ Aab	۱۲۴/۷۵±۱۶/۰۹ Bab
	T۳	۱۴۶/۴۰±۱۰/۲۱ Aa	۱۵۰/۴۲±۱۱/۳۲ Aa	۱۴۴/۴۷±۲۰/۶۳ Ab	۱۵۳/۰۷±۱۴/۷۴ Ac
	کنترل	۱۴۷/۵۳±۹/۲۳ Aa	۱۵۳/۰۷±۱۴/۷۴ Aa	۱۴۶/۳۰±۱۰/۹۱ Ab	۱۱۷/۲۹±۱۷/۸۳ Bb
کلسترول (mg/dl)	T۱	۹۷/۵۸±۲۵/۷۵ Aa	۸۳/۹۹±۲۸/۲۲ Ba	۹۱/۹۲±۱۹/۰۳ Aba	۸۸/۲۳±۳۰/۲۹ Ba
	T۲	۹۳/۳۳±۲۹/۰۷ Aba	۷۵/۲۶±۲۱/۱۵ Ba	۹۱/۱۰±۳۲/۳۹ Aba	۱۲۲/۸۷±۳۴/۹۹ Aa
	T۳	۹۹/۷۲±۲/۹۰ Ba	۹۶/۳۸±۱۲/۰۰ Ba	۹۳/۰۹±۱۱/۴۵ Ba	۱۱۳/۲۳±۳۲/۴۱ Aa
	کنترل	۹۳/۹۲±۳۸/۸۰ Ba	۱۰۷/۳۵±۴۵/۰۷ Ba	۸۹/۹۷±۱۵/۶۴ Ba	۱۱۹/۲۸±۲۹/۱۲ Aa
کلسیم (mg/dl)	T۱	۸/۶۲±۱/۰۸ Aba	۶/۹۵±۰/۹۱ Ba	۹/۰۶±۱/۷۸ Ab	۸/۳۵±۰/۸۹ ABb
	T۲	۹/۰۰±۱/۰۰ BCa	۷/۸۲±۱/۶۲ Ca	۱۲/۱۵±۲/۰۲ Aa	۱۰/۸۶±۱/۴۰ ABb
	T۳	۸/۵۹±۱/۱۲ Aa	۹/۸۲±۲/۳۱ Aa	۱۰/۳۶±۲/۴۹ Aab	۷/۲۷±۰/۶۳ Ab
	کنترل	۸/۱۳±۱/۵۱ Aa	۷/۹۷±۱/۳۵ Aa	۹/۱۶±۲/۲۰ Ab	۷/۸۴±۱/۶۰ Aa
گلوکز (mg/dl)	T۱	۶۰/۸۵±۲۴/۴۰ Aa	۶۱/۲۳±۲/۵۹ Aa	۶۹/۹۸±۱۸/۴۴ Aa	۶۰/۹۲±۷/۶۷ Aa
	T۲	۷۰/۳۱±۱۴/۰۰ Aa	۶۵/۰۴±۱۴/۵۲ Aa	۸۱/۷۵±۱۸/۷۵ Aa	۸۲/۲۶±۱۸/۳۵ Aa
	T۳	۶۴/۲۹±۲۶/۵۷ Aa	۶۸/۸۴±۷/۲۶ Aa	۶۷/۴۵±۸/۴ Aa	۷۱/۵۷±۲۴/۴۷ Aa
	کنترل	۵۶/۷۲±۱۸/۸۴ Aa	۶۰/۶۲±۱۸/۴۹ Aa	۶۹/۱۴±۱۱/۳۸ Aa	۵۷/۲۸±۲۸/۲۸ Aa
منیزیم (mg/dl)	T۱	۱/۶۳±۰/۲۸ Aa	۲/۱۲±۰/۳۵ Aa	۲/۲۶±۰/۳۷ Aa	۲/۲۰±۰/۲۲ Aa
	T۲	۲/۲۹±۰/۷۳ Aa	۱/۹۱±۰/۱۴ Aa	۱/۷۹±۰/۱۶ Aa	۲/۲۰±۰/۳۵ Aa
	T۳	۱/۶۶±۰/۲۵ Aa	۱/۹۶±۰/۳۵ Aa	۱/۹۰±۰/۳۴ Aa	۲/۳۷±۰/۳۸ Aa
	کنترل	۱/۶۶±۰/۲۷ Aa	۱/۶۸±۰/۲۴ Aa	۲/۵۸±۰/۴۸ Ac	۱/۸۲±۰/۳۰ Bb

تا حدود زیادی به شـکل کروی و بیضوی هستند. تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از ریزپوشانی $۲/۴\times۱۰^{۹}$ ml/cfu محاسبه شد. بر حسب داده‌های بدسـت آمده تعداد باکتری‌های بـه دام افتاده در ریزپوشـینه‌ها ml/cfu $۲/۰۲\pm۰/۰۶\times۱۰^{۹}$ محاسـبه شد. حفظ قابلیت زیست سلول هم یک عامل مهم در انتخاب فرآیند تولید کپسول‌ها است. تعداد کم باکتری‌های از دست رفته نشان‌گر دقت مناسب بکار رفته در روش و نحوه ریزپوشانی می‌باشد. به عبارت دیگر بازده ریزپوشانی برحسب درصد در روش امولسیون ۸۴ درصد بدسـت آمد. در مطالعه Huiyi و همکاران در سـال ۲۰۱۳، که سلول‌های مخمر را با روش امولسـیون ریزپوشـانی کرد، بازده ریزپوشانی ۸۰ درصد گزارش شـد. در مورد روش امولسـیون صدمه زننده‌ترین عامل به قابلیت

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱. مقایسه تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده با باکتری‌های آزاد.

زیست سلول ممکن است عامل کاربرد اسید باشد که با توجه به نوع اسید و غلظت به کار رفته یکسان و همچنین سرعت هم‌زدن و غلظت امولسیفایر یکسان در هر دو مطالعه این اختلاف در بازده ریزپوشانی را احتمالاً می‌توان ناشی از سلول‌های ریزپوشانی شده متفاوت در دو مطالعه دانست. از طرفی دیگر بسیاری از منابع گزارش کردند که غلظت پلیمر می‌تواند بر بازده ریزپوشانی اثر بگذارد. Klemmer و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که سطوح بالاتر پروتئین شیر برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به طور قابل توجهی باعث افزایش بازده ریزپوشانی می‌شود.

نتایج بدست آمده از شمارش باکتری‌ها نشان می‌دهد که ریزپوشانی توانسته تأثیر چشمگیری در قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده داشته باشد. تعداد اولیه باکتری در حالت آزاد و ریزپوشانی شده به ترتیب $۲/۴\times۱۰^{۹}$ ml/cfu، $۲/۰۲\pm۰/۰۶\times۱۰^{۹}$ ml/cfu بود که بعد از سپری شدن در زمان‌های صفر، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در شرایط مشابه مایع معدی (pH=۲/۵) و به دنبال آن به مدت ۱۲۰ دقیقه در شرایط مشابه مایع روده‌ای (pH=۷/۴)، به ترتیب به $۱۰^{۹}\times۰/۰۹\pm۱/۵۹$ و $۱۰^{۹}\times۰/۰۶\pm۲/۰۳$ ml/cfu رسید. در طول این مدت تعداد باکتری در حالت آزاد به طور معنی‌داری کاهش یافت که این نتیجه نشان می‌دهد ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در بستر آلژینات و کیتوزان تا اندازه زیادی منجر به حفاظت سلول باکتری در مقابل شرایط اسیدی معده و روده می‌شود، به عبارت دیگر ریزپوشانی باکتری به مانند حایلی تأثیر سوء شرایط نامساعد محیطی روی باکتری را کاهش داده و باعث افزایش ماندگاری آن‌ها می‌شود. Lu و همکاران در سال ۲۰۱۳، بقای باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با آلژینات و شیر را در شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی مورد ارزیابی قرار دادند، نتایج نشان داد که ریزپوشانی می‌تواند مقاومت لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به محیط‌های نامساعد را افزایش دهد. Mokarram و همکاران در سال ۲۰۰۹، اثر مثبت ریزپوشانی با آلژینات کلسیم بر بهبود بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی را گزارش دادند.

Gbassi و همکاران در سال ۲۰۰۹، ریزپوشانی سه سویه از لاکتوباسیلوس پلانتاروم در پوشش آلژینات – وی پروتئین (Wehy protein) را سبب افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده دانست. نتایج به دست آمده از این پژوهش، در تناقض با نتایج Krasaekoopt و همکاران در سال ۲۰۰۴، که بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ATCC۱۹۹۴ که با آلژینات سدیم، کیتوزان و پلی- ال- لیزین ترکیب با آلژینات پوشیده شده بودند و باکتری‌ها در شرایط اسیدی معده حتی وقتی ریزپوشانی شدند، زنده نماند و Gildas و همکاران در سال ۲۰۰۹، می‌باشد که بیان کردند ریزپوشانی باکتری‌ها در مهره‌های آلژینات، به شکل مؤثر از ارگانیسم‌ها در برابر اسیدیته بالا محافظت نکرد.

فعالیت نمک‌های صفراوی در شرایط آزمایشگاهی ممکن است بسیار بیشتر از عمل واقعی آن‌ها در روده باشد، زیرا در روده امکان ترکیب این نمک‌ها با فسفو لیپیدها نیز وجود دارد. Zou و همکاران در سال ۲۰۱۲، پایداری ذخیره سازی بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم را درریزپوشینه‌های آلژینات، ریزپوشینه‌های ترکیب شده با نشاسته، پکتین، کیتوزان و پلی – ال – لیزین را مورد مطالعه قرار دادند. ریزپوشینه‌های پوشیده شده با کیتوزان حمایت بهتری را برای باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به ریزپوشینه‌های دیگر در طول ذخیره‌سازی از خود نشان دادند، این احتمالاً ناشی از یک غشا متراکم تشکیل شده در ریزپوشینه‌های پوشیده شده با کیتوزان بوده است. ریزپوشانی با روش امولسیون، توانسته راندمان بالایی در به دام انداختن باکتری پروبیوتیکی داشته باشد و ریزپوشینه‌های یکنواختی را تولید کند و تعادل کلوئیدال ریزپوشینه‌ها در سطح مناسبی قرار داشت. بین باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد، زنده‌مانی و تحمل شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی در باکتری‌های ریزپوشانی شده به مراتب بالاتر بود.

گلوکز یکی از فاکتورهای بیوشیمیایی خون است که می‌تواند به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در تعیین وضعیت فیزیولوژیک ماهی به کار رود. با افزایش مصرف گلوکز و متابولیت‌های دیگر در بعضی گونه‌ها ذخایر گلیکوژن و چربی‌ها کاهش یافته و در مرحله بعد پروتئین‌ها برای تأمین انرژی شکسته می‌شوند (۱۶). تغییر در سطح گلوکز و منیزیوم خون ماهی‌ها نشان دهنده تأثیر ترکیبات موجود در جیره و مکمل‌های غذایی بر مکانیسم‌های کنترل کننده جذب، ذخیره و متابولیسم گلوکز و منیزیوم خون است. در مطالعه حاضر تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز و منیزیوم پلاسمای خون فیل ماهیان تمامی گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. کاهش سطح گلوکز خون در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار عصاره‌ی سیلی‌مارین (۴) و بومادران (۲۹) و گربه‌ماهی آفریقایی تحت تیمار سیر و پیاز (۱) گزارش شده است که مخالف نتایج تحقیق حاضر است که احتمالاً به دلیل تأثیر وجود عصاره‌های گیاهی موجود در ترکیبات این مواد می‌باشد.

افزایش سطح پروتئین‌های سرم به عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت سلامت ماهی مطرح است. فراوان‌ترین ماده حل شده در پلاسما

www.SID.ir

Archive of SID

را گروهی از پروتئین‌های پلاسما شامل آلبومین‌ها و گلبولین‌ها (IgM) تشکیل می‌دهند. استفاده از پروتئین کل، آلبومین و گلبولین سرم خون ماهیان می‌تواند به عنوان یک اندیکاتور برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گیرد، شدت این پاسخ در بین گونه‌های مختلف و در شرایط مختلف محیطی متفاوت می‌باشد. یکی از عوامل مهمی که می‌تواند بر میزان پروتین‌ها تأثیرگذار باشد، فاکتورهای تغذیه‌ای است. تغییر در سطوح پروتین‌های سرم خون در مطالعات بسیاری به تبع استفاده از محرک‌های ایمنی، پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها گزارش شده است (۳۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متعاقب مصرف جیره‌های آزمایشی افزایش معنی‌داری در سطح پروتئین تام و آلبومین سرم در تیمارهای آزمایشی در روز ۳۰ نمونه‌برداری نسبت به روز صفر دیده نشده، اما ادامه روند تغذیه از جیره‌های آزمایشی تا روز ۶۰ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر و ۳۰ دیده می‌شود که احتمالاً نشان دهنده افزایش قدرت پاسخ دفاعی میزبان است. بیشترین میزان پروتئین تام و آلبومین پلاسما در ۲ تیمار پلانتاروم ریزپوشانی شده و آلژینات/کیتوزان بود که حاکی از اثر سینرژیسم ترکیبات ریزپوشانی کننده و پروبیوتیک پلانتاروم است. از آنجایی که رابطه‌ی نزدیکی بین نرخ سنتز پروتئین در کبد و غلظت پروتئین تام در پلاسما وجود دارد (۴)، افزایش غلظت پروتئین تام در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار پروبیوتیکی ممکن است منعکس کننده‌ی افزایش سنتز پروتئین در بافت کبد باشد. همچنین وجود جذب اسیدهای آمینه بهتر در اثر تولید آنزیم‌های پروتئولایتیکی گوارشی خارج سلولی تولید شده از پروبیوتیک‌های مستقر در دستگاه گوارش ممکن است عامل افزایش سطح سنتز پروتئین در کبد و پلاسما باشد.

افزایش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید در ماهی‌های تحت تیمار پروبیوتیکی در مطالعه حاضر ممکن است مربوط به تأثیرات پروبیوتیک و ترکیبات ریزپوشانی کننده مانند کیتوزان بر سنتز، جذب و متابولیسم کلسترول باشد. هرچند بر اساس مطالعات پیشین پروبیوتیک‌ها با کاهش کلسترول سرم پروفیل چربی را بهبود می‌بخشند (۱۹). تأثیر عملکرد پروبیوتیک‌ها ممکن است به صورت غیر مستقیم بر فعالیت آنزیم HMG CoA ردوکتاز نسبت داده شود که نقش مهمی در بیوسنتز کلسترول دارد که در این زمینه بایستی تحقیقات بیشتری صورت گیرد. وجود اسیدهای چرب کوتاه زنجیره حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط باکتری‌های پروبیوتیک نیز ممکن است در افزایش تری‌گلیسریدها و کلسترول در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه کنترل، مؤثر است (۹،۱۱). Bajelan در سال ۲۰۱۳ نشان داد که استفاده از سین‌بیوتیک در جیره غذایی با غلظت مختلف منجربه کاهش معنی‌دار کلسترول با چگالی کم و تری-گلیسرید در مقایسه با گروه کنترل در ماهی بنی گردید که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد. باکتری‌های پروبیوتیک بویژه باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک می‌توانند در جذب مستقیم کلسترول در روده از طریق عدم اتصال نمک‌های صفراوی دخالت کنند (۳۱).

ماهیان خاویاری (Acipenseridae) از با ارزش‌ترین گونه‌های دریای خزر می‌باشند که در سال‌های اخیر نسل آن‌ها به جهت تخریب زیستگاه‌های تکثیر طبیعی این ماهیان، صید بیرویه و آلودگی‌های محیطی کاهش یافته و هرساله چند میلیون لارو حاصل از تکثیر مصنوعی آن‌ها جهت بازسازی ذخایر وارد دریای خزر می‌گردند. به جهت ارزش بالای شیلاتی و اقتصادی این ماهیان بسیاری از مطالعات شیلاتی روی این گونه‌ها صورت می‌گیرد.

درکل نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده علاوه بر حفاظت از باکتری‌های با توان پروبیوتیکی در برابر شرایط دستگاه گوارش، با داشتن ترکیباتی مانند آلژینات و کیتوزان نیز منجر به افزایش برخی فاکتورهای مفید بیوشیمیایی از این‌رو به نظر می‌رسد مکمل خوراکی پروبیوتیکی می‌تواند برای افزایش سلامت و عملکرد ماهیان خاویاری توصیه شود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از همکاری مجدانه جناب آقای مهندس علی محمدیان کارشناس ارشد مؤسسه سرم سازی رازی که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Al-Salahy, M. B. (2002). Some physiological studies on the effect of onion and garlic juices on the fish, Clarias lazera. Fish Physiol Biochem, 27, 129–142.
2. Islam, M. A., Yun, C. H., Choi, Y. J., Cho, C. S. (2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria. J Microbiol Biotechnol, 20(10), 1367-1377. PMID: 21030820
3. Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol, 114(3-4), 173-186. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009
4. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. R., Rafei, G. R. (2011). Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol Biochem, 37(4), 885-896. https://doi.org/10.1007/s10695-011-9486-z
5. Capela, P., Hay, T. K. C., Shah, N. P. (2006). Ef-

www.SID.ir

Archive of SID

fect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Res Int, 39(2), 203-211. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007

6. Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (2009). Prebiotics and Probiotics Science and Technology (Vol. 1). (1st ed.) Springer. New York, USA. p. 61-73.
7. Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (2012). Prebiotics in foods. Curr Opin Biotech, 23(2), 187-191. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.028
8. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol, 84(5), 759-768.
9. Djoussé, L., Hunt, S. C., Arnett, D. K., Province, M. A., Eckfeldt, J. H., Ellison, R. C. (2003). Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. Am J Clin Nutr, 78(6), 1098-1102. https://doi.org/10.1093/ajcn/78.6.1098
10. El-Shafei, K., Tawfik, N. F., Dabiza, N. M. A., Sharaf, O. M., Effat, B. A. (2010). In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli. J Am Sci, 6(11), 357-367.
11. Fahimi, Z., Cheraghi, J., Pilehvarian, A. A., Sayehmiri, K., Khosravi, A. (2012). Effects of *Alcea angulata* root alcoholic extract on blood lipid of male rabbit. J Ilam Univ Med Sci, 20(2), 23-32.
12. Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. Int J Food Microbiol, 129(1), 103-105. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.012
13. Gibson, G. R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). Clin Nutr Sup, 1(2), 25-31. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.09.005
14. Gildas, G.K., Thierry, V., Saïd, E., Eric, M. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. Int J Food Microbiol, 129(1),103-105.
15. Huiyi, S., Weiting, Y., Meng, G., Xiudong, L., Xiaojun, M. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohydr Polym, 96, 181-189. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.068
16. Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B., Ackerman, P. A. (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. Am Zool, 39(6), 901-909. https://doi.org/10.1093/icb/39.6.901
17. Jayalalitha, V., Balasundaram, B., Palanidorai, R. (2012). In vitro assessment of microencapsulated probiotic beads. Int J Agric, 2(1), 1-6.
18. Johnson, A.M., Rohlfs, E.M., Silverman, L.M. (1999). Proteins. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (eds.). (3rd ed.) W.B Saunders Company. Philadelphia, USA. p. 477-540.
19. Kavitha, K., Reddy, A. G., Reddy, K. K., Kumar, C. S., Boobalan, G., Jayakanth, K. (2016). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of pioglitazone, insulin and synbiotic in diabetic rats. Vet world, 9(2), 118. PMID: 27051195
20. Kim, S. K., Matsunari, H., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Furuita, H., Murata, Y., Goto, T. (2008). Comparison of taurine biosynthesis ability between juveniles of Japanese flounder and common carp. Amino Acids, 35(1), 161-168. PMID: 18327631
21. Klemmer, K. J., Korber, D. R., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2011). Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. Int J Food Sci Technol, 46(11), 2248-2256.
22. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int Dairy J, 14(8), 737-743.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Iyer, R. N., Hittinahalli, V. (2008). Modified Pap method to among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol, 26(2), 176-179. PMID: 18445959
24. Lu, S., Li, Z. H., Li, D. T., Tang, Z. H. (2013). Encapsulation of probiotic Lactobacillus bulgaricus in alginate-Milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. J Food Eng. 117(1), 99-104. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012
25. Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S. S., Webb, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2006). Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochem Eng J, 28(1), 73-78. https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.09.004
26. Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M., Rohanizade, S. (2016). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. bulguricus on some immune-related parameters in Barbus grypus. Aquacu Int. 24(1), 225-242. https://doi.org/10.1007/s10499-015-9921-8
27. Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. H., Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Res Int, 42(8), 1040-1045. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.023
28. Mortazavian, A. M., Sohrabvandi, S. (2007). Probiotics and food probiotic products: based on dairy probiotic products (Ed. A.M. Mortazavian). Iran: Eta Publication p. 131-169.
29. Bahabadi, M. N., Banaee, M., Taghiyan, M., Haghi, B. N. (2014). Effects of dietary administration of yarrow extract on growth performance and blood biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int J Aquatic Biol, 2(5), 275-285.
30. Nayak, S.K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shellfish Immunol, 29(1), 2-14. PMID: 20219683
31. Ooi, L. G., Liong, M. T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. Int J Mol Sci, 11(6), 2499-2522. PMID: 20640165
32. Pouramini, M., Hossienifar, S.H. (2007). The use of probiotics and prebiotics in aquaculture. Green Wave J. p. 29-31.
33. Rifai, N., Bachorik, P.S., Albers, J.J. (1999). Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., (eds.). (3rd ed.) W.B Saunders Company. Philadelphia, USA. p. 809-61.
34. Sacks, D. B. (1999). Carbohydrates. Burtis, C. A., Ashwood, E. R., (eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. (3rd ed). W.B Saunders Company. Philadelphia, USA. p. 750-808.
35. Shahsavani, D., Mohri, M., Shirazian, M., and Gholipour-Kanani, H. (2011). Determination of normal blood biochemistry (electrolytes and non-electrolytes) values in mature *Huso huso* in spring. Comp Clin Pathol, 20(6), 653-657. https://doi.org/10.1007/s00580-010-1053-y
36. Talwalker, A.N., Kailasapathy, K. (2004) Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. J Dairy Tech, 58, 36-39.
37. Zou, Q., Liu, X., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. P., Zhang, H., Chen, W. (2012). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in Whey Protein-Based Microcapsules by Transglutaminase-Induced Gelation. J Food Sci, 77(5), M270-M277. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02673.x

www.SID.ir

Effect of *Lactobacillus plantarum* Encapsulated With Alginate / Chitosan on Biochemical Factors in the Beluga (*Huso huso*)

Takavar Mohammadian[1], Seraj Bita[2], Rasul Naseri Pouttaklo[2]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2]*Department of fisheries, Faculty of marine sciences, Chabahar maritime university, Chbahar, Iran*

(Received 8 May 2018, Accepted 27 August 2018)

Abstract:

BACKGROUND: The consumption of probiotics in aquaculture is constantly growing due to the numerous benefits conferred on the fish health. Degradation of probiotics in gastrointestinal tract is one of the most important challenges in probiotic efficacy. Encapsulating of probiotics within a physical barrier has been found to increase probiotic viability in fish gastrointestinal tract.

OBJECTIVES: In this study the effect of encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with alginate/chitosan nano particles in in vitro situation and their effects in *Huso huso* were evaluated.

METHODS: Firstly, in vitro probiotic potential including: pH and bile resistance, gastrointestinal juice tolerance was evaluated. Then effects of encapsulated probiotic were evaluated in *Huso huso*. 480 juvenile *H. huso* were randomly divided into four treatments in triplicates. Fish in T1 were fed with alginate/chitosan enriched free probiotic diet, T2 received encapsulated *Lactobacillus plantarum*, T3 received bacteria without any encapsulation and T4 received basic diet as a control group. All treatments were fed with experimental diets for 60 days and study lasted for 15 days with control diet in all fish. Fish samples were taken on days 30, 60 and 75 and bio chemically compared among the treatments.

RESULTS: Results of first phase of study showed that mostly all probiotic properties of encapsulated bacteria were more appropriate than control treatment ($P<0.05$). Encapsulation of bacteria in both procedures enhanced almost all immunological parameters compared to control treatment ($P<0.05$). Higher Ca and Mg of plasma were observed in fish fed with *Lactobacillus plantarum* nano/microencapsulated and alginate/chitosan at day 30 and 60, whereas decreased TRI of plasma was observed in fish fed with *Lactobacillus plantarum* nano/microencapsulated at day 30.

CONCLUSIONS: It can be concluded that nano encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with alginate/chitosan not only improved in vitro probiotic effects of *L. plantarum*, but also it can increase Biochemical parameters of *H. huso* and could improve the positive performance of probiotics activity.

Keywords:

Lactobacillus plantarum, Nano/microencapsulated alginate/chitosan, Biochemical factors

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Division of various dietary treatments.

Table 2. Number of (cfu / g capsule) *Lactobacillus plantarum*-free and microbial bacteria from incubation under simulated gastrointestinal conditions at different time sequences pH = 7.2 and 37 C.

Table 3. Comparison of the results of biochemical experiments in 0, 30, 60 and 75 days of the study.

Figure 1. Comparison of microencapsulated bacteria and bacteria-free.

***Corresponding author's email: takavar_m2002@yahoo.com, Tel: 0611-3355110, Fax: 0611-3336037**

www.SID.ir