

بررسی تأثیر پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات بر تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی رودۀ بچه ماهیان تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*)

ابراهیم حسین نجدگرامی

دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۶ / پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۵

پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

ایمیل: e.gerami@urmia.ac.ir

چکیده. نگرانی‌های زیست‌محیطی درباره استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش استفاده از عوامل کنترل‌کننده طبیعی شده است. پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات پلی‌مری طبیعی است که می‌تواند به اسید چرب کوتاه‌زنجیره محلول در آب تبدیل شود و همچون عامل کنترل‌کننده میکروبی عمل کند. در این آزمایش تأثیر اضافه کردن این ماده به جیره غذایی بچه‌ماهیان در ۳ تیمار غذایی (کنترل، ۲ و ۵ درصد) بر فعالیت و تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی رودۀ بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری با روش community level physiological profiles تحت بررسی قرار گرفت. برای بررسی فعالیت و تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی در رودۀ بچه‌ماهیان، از میکروپلیت‌های Biolog™ Ecoplate استفاده شد. نتایج طرح نشان داد که استفاده از پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی رودۀ را نسبت به تیمار کنترل افزایش می‌دهد. نتایج منحنی Pareto-Lorenz و شاخص‌های شنون و اونس نشان داد بچه‌ماهیانی که از تیمارهای غذایی استفاده کردند تنوع متابولیکی متفاوتی نسبت به تیمار کنترل داشتند.

واژه‌های کلیدی. پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات، تنوع متابولیکی، تاسماهی سیبری

Effects of poly- β -hydroxybutyrate on metabolic diversity of anaerobic bacteria of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings hindgut

Ebrahim H. Najdegerami

Received 25.02.2014/ Accepted 06.09.2014

Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

Email: e.gerami@urmia.ac.ir

Abstract. Recently, concern over environmental and health effects of massive use of antibiotics has led to the growth of bio-control agent application. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a natural polymer that can be depolymerized into water-soluble short-chain fatty acid monomers and acts as a microbial control agent. In this study, the effects of the addition of PHB to the diet of Siberian sturgeon fingerlings by 2% and 5% were investigated. Community Level Physiological Profile (CLPP) was used to analyze anaerobic bacterial metabolic diversity in Siberian sturgeon fingerlings hindgut by using Biolog™ Ecoplate microplates. The results indicated that PHB increased metabolic activity in anaerobic bacteria in sturgeon hindgut. Also Lorenz curve and the Shannon index of Biolog™ Ecoplate data revealed that anaerobic metabolic potential of the bacterial community was different in the PHB-treated fishes compared with the control situation.

Keywords. poly- β -hydroxybutyrate, metabolic diversity, siberian sturgeon, community level physiological profiles

مقدمه

متابولیسم آنها با استفاده از community level physiological profiles (CLPP) روش جدیدی است که بوسیله میکروپلیت‌های BiologTM Ecoplate اندازه‌گیری می‌شود. میکروپلیت‌های اکوپلیت (Ecoplate) شامل منابع مختلف کربنی و دیگر مواد مغذی است (شکل ۱)؛ که باکتری-ها با مصرف این منابع برای تولید انرژی، رنگ خانه‌ها را با احیای تترازولوم به رنگ صورتی تغییر می‌دهند که با خواندن شدت و تنوع مواد کربنی مورد استفاده با توجه به محتوی باکتری‌ها با روش کالریمتری، تنوع متابولیکی باکتری‌های هترتروف هوازی و بی‌هوازی به دست می‌آید. این میکروپلیت‌ها برای اولین بار در بخش پزشکی برای شناسایی سویه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها به کار رفتند که در مراحل بعدی برای بررسی تنوع کارکردی باکتری‌ها در دیگر اکوسیستم‌ها از جمله در خاک (Preston-Mafham *et al.*, 2002; Weber & Legge, 2009) و فلور باکتری‌های هوازی روده تاسماهی سیبری به کار گرفته شد (Najdegerami *et al.*, 2011).

پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یکی از ترکیبات کربنی خانواده پلی‌بتا‌هیدروکسی آلکانات هست که به منزله ذخیره منبع کربنی در سلول به کار می‌رود (Kato *et al.*, 1992; Patnik *et al.*, 2005). این ماده در موقعیتی که میزان منابع کربنی محیط زیاد و برعکس میزان نیتروژن محیط کم است، در طیف وسیعی از باکتری‌ها به‌عنوان منبع ذخیره کربنی تشکیل می‌شود (Defroidt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; Van Cam *et al.*, 2009). براساس مطالعات صورت گرفته این ماده در اثر فعالیت آنزیم‌های گوارشی موجود و همچنین تخمیر میکروبی انتهای روده به بتابوتیریک اسید تبدیل می‌شود که کارکردی مشابه اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره دارد که با اسیدی کردن روده و همچنین استفاده از آن به‌عنوان یک ماده انرژی باعث بهبود وضعیت جاندار می‌شود. اثرات مثبت این ماده در افزایش مقاومت آرتمیا فرانسیسکانا در برابر *Vibriosis* (Defroidt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; Van Cam *et al.*, 2009)، افزایش رشد و تنوع باکتریایی در بچه‌ماهیان سی‌باس اروپایی (De Schryver *et al.*, 2009) و تاسماهی سیبری (Najdegerami *et al.*, 2011) و افزایش رشد و کاهش میزان

فلور میکروبی روده نقش کلیدی در سلامتی و تغذیه میزبان بازی می‌کند (Burr *et al.*, 2005) و محیط پیرامون موجودات نقش مهمی در شکل‌گیری این فلور دارد (Hansen & Olafsen, 1999). در سال‌های اخیر تحقیقاتی درباب تغییر این فلور در جهت افزایش میزان باکتری‌های مفید و همچنین متابولیت‌های آنها از طریق کاربرد پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها صورت گرفته است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفید مانند باکتری‌های لاکتیک اسید و گونه‌های مختلف باسیلوس‌ها هستند که می‌توانند از راه جیره‌های غذایی وارد سیستم گوارش میزبان شوند و علاوه بر تحریک رشد از طریق سازوکارهای مختلف، در رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا باعث بهبود سیستم ایمنی میزبان شوند؛ درحالی‌که پریبیوتیک‌ها ترکیباتی هضم‌نشده‌ای هستند که صرفاً بوسیله میکروارگانیسم‌های خاصی در انتهای روده تجزیه و باعث افزایش سلامتی و رشد موجود می‌شوند (Gibson & Roberfroid, 1995; Manning & Gibson, 2004). تأثیر مثبت پریبیوتیک‌ها بر تحریک سیستم ایمنی، تولید متابولیت‌های مفید در روده از طریق تغییر فلور میکروبی، افزایش جذب عناصر و تحریک رشد در انسان (Manning & Gibson, 2004)، حیوانات اهلی (Smiricky-Tjardes *et al.*, 2003; Patterson & Burkholder, 2003) و ماهیان گزارش شده است (Grisdal *et al.*, 2008; Akrami & Hajimoradloo, 2009; Yousefian & Amiri, 2009). در اثر تخمیر پریبیوتیک‌ها اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره تشکیل می‌شوند که با اسیدی کردن محیط روده تغییراتی در فلور میکروبی روده ایجاد می‌کنند. برای مثال گزارش‌هایی درباره تأثیر بازدارنده اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره بر روی *Salmonella spp.* و *Vibrio spp.* وجود دارد (Defroidt *et al.*, 2007). روش‌های مختلفی برای شناسایی باکتری‌ها و بررسی تنوع ساختاری آنها در اکوسیستم‌ها پیشنهاد شده است که در این میان می‌توان به روش‌های وابسته به محیط‌های کشت میکروبی و روش‌های مولکولی، مانند تکثیر ناحیه ژنی *StrRNA* با استفاده از تکنیک (DGGE) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis اشاره کرد. ولی بررسی تنوع باکتری‌ها براساس کارکرد و

Phenoxyethanol در یک لیتر آب بی‌هوش شدند و پس از بازکردن قسمت شکمی در وضعیت استریل، محتویات انتهای روده آنها برداشت و پس از مخلوط کردن، ۱ گرم (وزن تر) آن در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (۰/۸۵٪ نمک) حل و با هم‌زن خوب مخلوط شد (Najdegerami *et al.*, 2011). سپس برای صاف کردن این سوسپانسیون و جداکردن ذرات غیر قابل حل از فیلتر ۵۰ میکرون استفاده شد و محلول بدست آمده ۱۰ بار رقیق شد و حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. به هر کدام از خانه های اکوپلیت‌ها، ۱۳۰ میکرولیتر از این محلول ریخته شد و میکروپلیت‌ها در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوایی (oxoid anaerobic jar, HP001A) به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند و میزان جذب نور هر کدام از خانه‌ها، با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (TECAN, Model infinite M200) در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ در طول موج ۵۹۰ خوانده شد و میانگین تکامل رنگ در خانه‌های میکروپلیت با فرمول $AWCD = \sum(C-R)/n$ محاسبه شد. در این فرمول C میزان جذب نور در داخل هر کدام از خانه‌های میکروپلیت پس از انکوباسیون، R میزان جذب نور در خانه حاوی آب و n تعداد سوپسترا در میکروپلیت‌ها است که در میکروپلیت‌های Ecoplate این تعداد ۳۱ است. هر کدام از داده‌های خام حاصل از دستگاه پلیت ریدر به وسیله میانگین تکامل رنگ خانه‌های میکروپلیت (AWCD) نرمال شدند (Garland & Mills, 1991). شاخص شانون ایندکس (H') که یک شاخص تنوع برای اکوسیستم‌ها به‌شمار می‌رود برای باکتری‌های بی‌هوایی روده بچه‌ماهیان تاسماهی سبیری که از درصدهای مختلف PHB تغذیه کرده بودند با توجه به رابطه زیر محاسبه شد:

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

که در این رابطه P_i جذب نسبی در هر خانه میکروپلیت است. همچنین برای بررسی evenness در این باکتری‌ها از رابطه $E = H' / \ln S$ استفاده شد که در این رابطه H' شانون ایندکس است و S تعداد خانه‌هایی است که باکتری‌ها در آن متابولیسم داشتند و باعث تغییر رنگ خانه شدند. گفتنی است که در تمام محاسبات، خانه‌هایی از میکروپلیت‌ها که تغییر رنگ نداشتند در

گونه‌های ویبریو در روده میگوی دراز آب شیرین در مطالعات مختلف گزارش شده است (Nhan *et al.*, 2010).

در این مطالعه تأثیر پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات بر تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوایی روده بچه‌ماهیان تاسماهی سبیری با استفاده از روش CLPP بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به مدت ۱۰ هفته در حوضچه‌های فایبرگلاس با رنگ تیره (۷۵ لیتری) که هر ۱ ساعت ۱۰۰ درصد آب آن تعویض می‌شد انجام گرفت. درجه حرارت آب در طول آزمایش ثابت و حدود 1 ± 15 درجه سانتی‌گراد بود. دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای بچه‌ماهیان اعمال شد. بچه‌ماهیان با وزن اولیه 0.8 ± 17 گرم و با تراکم ۸ گرم در لیتر در این حوضچه‌ها ذخیره سازی شدند و به مدت دوهفته با جیره غذایی تجاری (Joosen – Luyckx, Aqua Bio, Belgium) تغذیه شدند. میزان غذای مصرفی در ۳ وعده (۸:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۸:۰۰) با توجه به میزان تغذیه روزانه بچه‌ماهیان وزن و غذادهی می‌شد و غذای اضافه در هر وعده غذایی سیفون و از میزان غذای محاسبه شده کسر می‌شد (Najdegerami *et al.*, 2011).

بعد از ۲ هفته تغذیه با غذای تجاری، از ۳ جیره تحقیقاتی شامل صفر درصد PHB (کنترل)، ۲ درصد PHB و ۵ درصد PHB استفاده شد. برای تهیه این جیره‌ها ابتدا میزان مورد استفاده PHB محاسبه و در کلروفورم و آب با نسبت ۸۰ به ۲۰ حل شد و سپس روی جیره تجاری اسپری شد. جیره‌ها در درجه حرارت اتاق برای ۲ روز نگهداری شدند تا تمام کلروفورم تبخیر شود و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اطمینان از خشک شدن آنها، جیره‌ها ۳ روز قبل از شروع آزمایش تهیه شدند (Najdegerami *et al.*, 2011). برای اندازه‌گیری میزان CLPP برای باکتری‌های بی‌هوایی انتهای روده، از میکروپلیت‌های (Biolog Biolog™ Ecoplate (Inc.) استفاده شد که شامل ۳۱ منبع کربنی به‌علاوه یک کنترل منفی (آب) در ۳ تکرار بود (Insam, 1997). برای این کار ۳ ماهی از هر تکرار با استفاده از محلول ۲ میلی‌لیتر 2-

نشان می‌دهد مشاهده می‌شود، میزان متابولیسم یا فعالیت متابولیسی باکتری‌ها در تیمار ۵ درصد PHB بالاتر از کنترل و ۲ درصد PHB است، درحالی‌که میزان فعالیت متابولیسی باکتری-ها در منابع کربنی دیگر مانند کربوکسیلیک اسیدها (شکل ۲d) و اسیدهای آمینه (شکل ۲b) در تیمار ۲ درصد PHB بالاتر از دیگر تیمارها بود. این افزایش فعالیت متابولیسی در باکتری‌ها دربارهٔ مصرف اسیدهای آمینه در تیمار ۲ درصد به ترتیب ۲۷ و ۴۸ درصد بالاتر از تیمار کنترل و ۵ درصد بود. همچنین افزایش میزان متابولیسم باکتری‌ها در مصرف منبع کربنی کربوکسیلیک اسیدها در تیمار ۲ درصد به ترتیب ۱۴۲ و ۳۱ درصد بیشتر از تیمار کنترل و ۵ درصد بود.

برای بررسی سطح تنوع متابولیسمی باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت از شاخص‌های shannon و evenness استفاده شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که استفاده از PHB میزان این شاخص‌ها را تغییر می‌دهد. نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از جیره غذایی ۲ درصد میزان این شاخص‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به تیمار ۵ درصد افزایش می‌دهد اگرچه اختلاف معنی‌داری بین تیمار کنترل و ۲ درصد مشاهده نشد.

منحنی Pareto-Lorenz برای بررسی پراکنش گونه‌ای در اکوسیستم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. براساس یک اصل در این منحنی، خط ۴۵ درجه اکوسیستمی را نشان می‌دهد که از نظر تنوع گونه‌ای در وضعیت ایده‌آل قرار دارد. بنابراین، میزان نزدیکی دیگر خطوط در این منحنی نشان‌دهندهٔ میزان تنوع در آن اکوسیستم است؛ به عبارت دیگر هرچه خطوط به این خط ۴۵ درجه نزدیک‌تر باشند، نشان‌دهندهٔ میزان تنوع بالا در آن اکوسیستم نسبت به دیگر اکوسیستم‌ها می‌باشد.

محاسبات بعدی صفر در نظر گرفته شدند. همچنین در این آزمایش منحنی Pareto-Lorenz که عمدتاً برای بررسی تنوع زیستی در اکوسیستم‌ها و همچنین پراکنش نسبی گونه‌ها به کار می‌رود برای بررسی این پارامترها در باکتری‌های بی‌هوازی در رودهٔ بچه‌ماهیانی که از تیمارهای غذایی تغذیه کرده بودند مورد استفاده قرار گرفت.

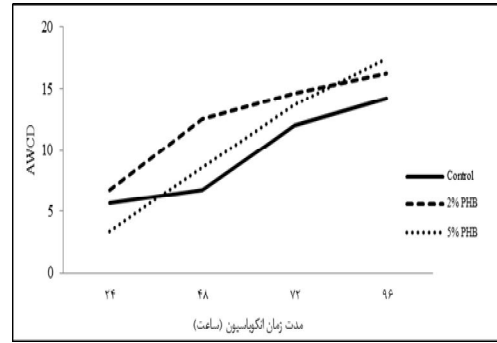
محاسبات آماری

تمام آزمون‌های آماری در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. داده‌ها در مرحلهٔ اول از بابت همسان بودن واریانس‌ها تحت بررسی قرار گرفتند و بعد از اطمینان از همسانی واریانس‌ها، تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌دار ۹۵ درصد برای شاخص‌های shannon diversity و evenness اجرا شد. برای تعیین معنی‌دار بودن بین میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

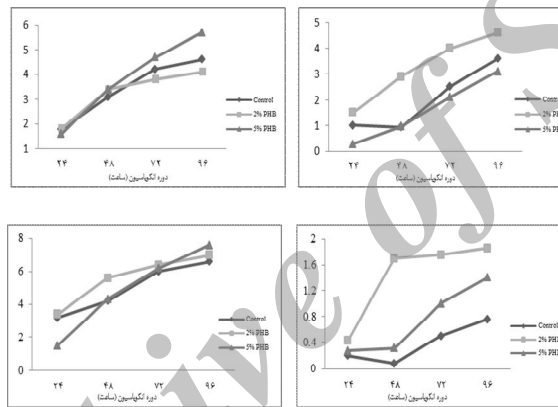
میانگین تکامل رنگ در خانه‌های میکروپلیت (AWCD) برای ارزیابی میزان فعالیت متابولیسی باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت مورد استفاده قرار گرفت. چنان‌که در شکل ۱ دیده می‌شود تغذیهٔ بچه‌ماهیان با PHB میزان فعالیت متابولیسی باکتری-های قابل کشت بی‌هوازی را نسبت به تیمار کنترل افزایش داده است. این میزان افزایش در تیمارهای ۲ و ۵ درصد PHB به ترتیب ۱۴ و ۲۲/۵ درصد بوده است.

میزان فعالیت باکتری‌های بی‌هوازی در هر گروه از منابع کربنی محاسبه شد و نتایج آن در شکل ۲ آمده است. چنان‌که در شکل ۲a که فعالیت باکتری‌های بی‌هوازی را در منابع کربنی پلیمری



شکل ۱- میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت در بچه‌ماهیان تاسماهی سبیری در تیمارهای غذایی مورد استفاده براساس داده‌های میکروپلیت‌های Ecoplate. در این شکل محور افقی مدت زمان انکوباسیون براساس ساعت و محور عمودی ضریب میانگین تکامل رنگ را در میکروپلیت‌ها نشان می‌دهد.

Fig. 1. Metabolic activity of cultivable anaerobic bacteria from sturgeon fingerlings receiving experimental diets based on Ecoplate data. The x-axis represents incubation time for cultured hindgut bacteria of fish given different diets.



شکل ۲- استفاده از (a) پلیمرها، (b) اسید آمینه، (c) کربوهیدرات، (d) کربو کسلیک اسیدها به‌عنوان منابع کربنی به‌وسیله باکتری‌های غیرهوازی قابل کشت در انتهای روده بچه‌ماهیان تاسماهی سبیری در تیمارهای غذایی. در این شکل‌ها محور افقی مدت زمان انکوباسیون براساس ساعت و محور عمودی ضریب میانگین تکامل رنگ را برای هر ترکیب در میکروپلیت‌ها نشان می‌دهد.

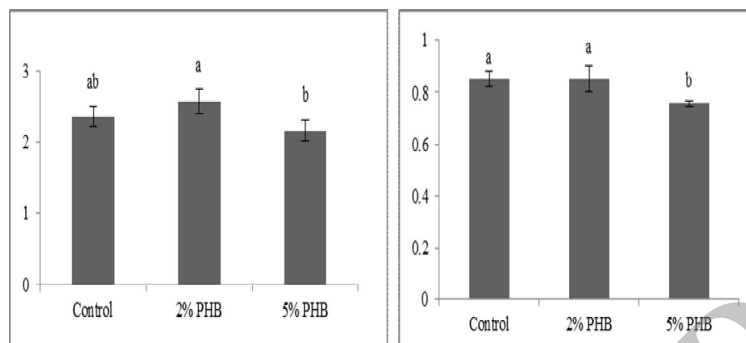
Fig. 2. The use of (a) polymers, (b) amino acids, (c) carboxylic acids, and (d) carbohydrates as the carbon source by intestinal bacteria from sturgeon fingerlings receiving experimental diets. The x-axis represents incubation time for cultured hindgut bacteria of fish given different diets.

بحث

در طول دو دهه گذشته آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیعی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین برای افزایش رشد مخصوصاً در صنعت تولیدات حیوانی به‌کاررفته‌اند (Acar et al., 2000) با توجه به محدودیت استفاده از این مواد، مخصوصاً بعد از ممنوعیت ورود مواد غذایی حاوی آنتی‌بیوتیک به اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۶، بحث استفاده از دیگر مواد

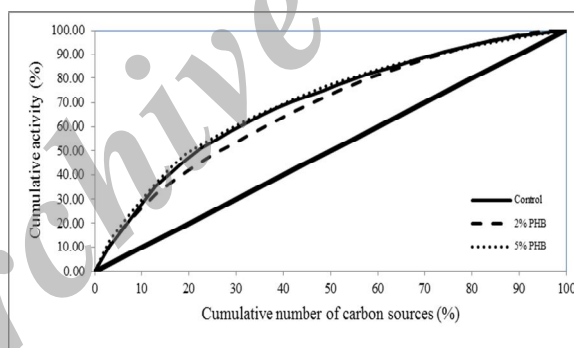
باتوجه به نتایج ارائه شده در شکل ۴، میزان پراکنش گونه‌ای باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت در تیمار ۲ درصد نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بوده است و تیمارهای کنترل و ۵ درصد تنوع کمتری نسبت به تیمار ۲ درصد دارند. نکته قابل توجه در این طرح این است که بالاترین میزان رشد در تیمار ۲ درصد مشاهده شد.

محرك رشد و تقويت‌كننده سیستم ایمنی در صنعت توليدات حیوانی به‌خصوص آبزیان شدت گرفته است (De Schryver, 2010).



شکل ۳- میزان شاخص‌های shannon (چپ) و evenness (راست) در تیمارهای غذایی براساس داده‌های میکروپلیت‌های Ecoplate. در این شکل‌ها محور افقی تیمارهای غذایی را نشان می‌دهد و محورهای عمودی شاخص shannon (شکل سمت چپ) و evenness (شکل سمت راست) را در میکروپلیت‌ها نشان می‌دهد.

Fig. 3. Shannon's index of diversity (left) and evenness (right) for the gastrointestinal tract microbial communities from sturgeon fingerlings from Biolog™ EcoPlates data that received experimental diets.



شکل ۴- پراکنش گونه‌ای (evenness) باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت در روده بچه‌ماهیان تاسماهی سبیری براساس داده‌های میکروپلیت‌های Ecoplate.

Fig. 4. Species diversity (evenness) of cultivable anaerobic bacteria from intestine of sturgeon fingerlings based on Biolog™ EcoPlate data.

می‌رود (Kato *et al.*, 1992; Patnik, 2005; De Schryver *et al.*, 2009). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که کاربرد PHB به صورت خالص، باعث افزایش زنده‌مانی در لاروهای ماهی سی‌باس و آرتیمیا فرانسیسکانا در مقایسه با تیمار بدون غذا می‌شود که نشان‌دهنده انرژی‌زا بودن این ماده است (Defroidt *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2010).

یکی از موادی که به‌عنوان محرك رشد و عامل کنترلی اخیراً در پرورش آبزیان به‌کاررفته است پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات است که از خانواده آلکانات‌ها می‌باشد. این ماده بوسیله آنزیم-های خارج سلولی باکتری‌ها تجزیه می‌شود و β -hydroxybutyric acid تولید می‌کند که علاوه بر کاهش pH محیط روده به‌عنوان منبع انرژی برای جانداران به شمار

به‌عنوان یک پلی‌مر اسید چرب به‌وسیلهٔ باکتری‌ها به‌عنوان منبع انرژی تجزیه می‌شود و مورد استفاده قرار می‌گیرد (Azain, 2000). بنابراین با توجه تنوع زیاد باکتریایی در تیمار ۲ درصد و نتایج داده‌های حاصل از شاخص‌های shannon و evenness و همچنین منحنی Pareto- Lorez در این تیمار، این مسئله قابل توجیه است. میزان زیاد متابولیسم پلی‌مرها در میکروپلیت‌ها در تیمار ۵ درصد موید این مسئله است که باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ پلی‌مرها در این تیمار، با توجه به غلظت بالای این ماده فعال‌تراند. نتایج این تحقیق دربارهٔ تنوع باکتریایی و میزان متابولیسم منابع کربنی با نتایج Najdegerami و همکاران (۲۰۱۱) که تأثیر این ماده را با درصدها و تیمارهای مشابه بر روی تنوع متابولیسی باکتری‌های هوازی رودهٔ تاسماهی سبیری بررسی کرده بودند هم‌خوانی دارد. نتایج مثبت استفاده از PHB در تحقیقات انجام‌گرفته در باب و تنوع باکتری‌های هوازی در سی‌بس اروپایی، میگوی دراز آب شیرین، ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان (داده‌های منتشرنشده) و تاسماهی سبیری به اثبات رسیده است. نتایج این طرح دربارهٔ تأثیر PHB بر روی تنوع باکتری‌های بی‌هوازی و همچنین رشد بچه‌ماهیان نشان می‌دهد PHB می‌تواند در سطح ۲ درصد به‌عنوان عامل کنترل میکروبی در غذای تاسماهی سبیری مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسنده از زحمات پروفیسور پیترو بوسیر و کارشناسان مرکز رفرانس آرتمیا دانشگاه گنت بلژیک نهایت تشکر را دارد.

همچنین نتایج مطالعات اخیر نشان داده که استفاده از این ماده در غلظت خاص در جیرهٔ غذایی بچه‌ماهیان سی‌باس (De Schryver *et al.*, 2010 و تاسماهی سبیری (Najdegerami *et al.*, 2011) باعث افزایش رشد و تنوع باکتریایی در روده می‌شود. نتایج این تحقیقات در جهت این اصل کلی است که همواره بین افزایش تولید و تنوع در اکوسیستم‌ها رابطهٔ قوی و مستقیمی وجود دارد و اکوسیستم‌های دارای تنوع بالا، معمولاً تولید زیادی دارند (Wittebolle *et al.*, 2000; Wilsey & Potvin, 2009).

محاسبات تکامل رنگ در خانه‌های میکروپلیت‌های Ecoplate نشان داد که PHB میزان متابولیسم باکتری‌های قابل کشت بی-هوازی را نسبت به تیمار کنترل افزایش می‌دهد. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات Najdegerami در ۲۰۱۱ که تأثیر این ماده را بر روی متابولیسم باکتری‌های هوازی در بچه‌ماهیان تاسماهی سبیری بررسی کرده بودند هم‌خوانی دارد. در هر دو مطالعه میزان رشد در بچه‌ماهیانی که از تیمار ۲ درصد استفاده کرده بودند نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود، اگرچه در هر دو مطالعه اختلاف معنی‌دار نبود.

در این آزمایش میزان متابولیسم اسیدهای آمینه و کربوکسیلیک اسید موجود در گروه‌های کربنی میکروپلیت‌ها، بوسیلهٔ باکتری‌های بی‌هوازی در تیمار ۲ درصد PHB بالاتر از دیگر تیمارها بود. گفتنی است که کربوکسیلیک اسیدها (اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره) حاصل کاتابولیسم اسیدهای چرب است و PHB

References

- Acar, J., Casewell, M., Freeman, J., Friis, C. and Goossens, H.** 2000. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. – *Clinical Microbiology Infection* 6: 477–482.
- Akrami, R. and Hajimoradloo, A.** 2009. 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* 40:771–779.
- Azain, M.J.** 2004. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. – *Journal of Animal Science* 82: 916–924.
- Burr, G., Gatlin, D. and Ricke, S.** 2005. Microbial ecology of the GI tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. – *Journal of World Aquaculture Society* 36: 425–436.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. and Verstraete, W.** 2007. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. – *Environmental Microbiology* 9: 445–452.
- De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Boon, N., Verstraete, W., De Boeck, G. and Bossier, P.** 2009. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. – *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:1535–1541.
- De Schryver P.** 2010. – Poly- β -hydroxybutyrate as a microbial agent in aquaculture. Ph.D thesis, Ghent University, Belgium, 9-10.
- Garland, J.L. and Mills, A.L.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. – *Applied Environmental Microbiology* 57: 2351–2359.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. – *Journal of Nutrition* 125: 1401–1412.
- Gridale-Helland, B., Helland, S.J. and Gatlin, D.M.** 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructo oligosaccharide or galacto oligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). – *Aquaculture* 283:163–167.
- Halet, D., Defoirdt, T., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P. and Bossier, P.W.** 2007. Poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. – *FEMS Microbiology Ecology* 60: 363–369.
- Hansen, G.H. and Olafsen, J.A.** 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. – *Microbiology Ecology* 38:1–26.
- Insam, H.** 1997. Substrate utilization test in microbial ecology. A preface to the special issue. – *J. Microbiology Methods* 30:1–2.
- Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C.** 1992. Production of 3 - hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124. – *Journal of Fermentation Bioengineering* 73: 246–247.
- Manning, T.S. and Gibson, G.R.** 2004. Prebiotics. – *Best Practice Research Clinical Gastroenterology* 18: 287–298.
- Nhan, D.T., Wille, M., De Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier P. and Sorgeloos, P.** 2010. The effect of poly- β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. – *Aquaculture* 302: 76–81.
- Najdegerami, E.H., Ngoc-Tran, T., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon N. and Bossier, P.** 2011. Effects of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its GI tract microbial community. – *FEMS Microbiology Ecology* 79:25–33.
- Patnaik, P.R.** 2005. Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures. – *Critical Review Biotechnology* 25:153–171.
- Patterson, J. and Burkholder, K.** 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. – *Poultry Science* 82: 627-634.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L. and Randerson, P.F.** 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source

utilization profiles a critique. – FEMS Microbiology Ecology 42: 1-14.

Smiricky-Tjardes, M., Grieshop, C., Flickinger, E., Bauer, L. and Fahey, G.J. 2003. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. – Journal of Animal Science 81: 25–35.

Van Cam, D.T., Van Hao, N., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P. and Bossier, P. 2009. Novel approach of using homoserine lactone-degrading and poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*. – Aquaculture 291: 23–30.

Weber, K.P. and Legge, R.L. 2009. – Community Level Physiological Profiling. Methods in Molecular Biology: Bioremediation (Cummings, S.P. ed.). The Humana Press Inc., New Jersey.

Wilsey, B.J. and Potvin, C. 2000. Biodiversity and ecosystem functioning: importance of species evenness in an old field. – Ecology 81: 887–892.

Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W. and Boon N. 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. – Nature 458: 623–626.

Yousefian, M. and Amiri, M.S. 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. – African Journal of Biotechnology 25: 7313–7318.