

اثر لاکتوفرین گاوی خوراکی بر جمعیت باکتریایی روده گربه ماهی *Pangasius sanitwongsei*

شبرنگ زاده، س.؛*؛ پیکان حیرتی، ف.؛ درافشان، س.؛ ابراهیمی درچه، ع.؛^۱

^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

*Email: s.shabrangzadeh@na.iut.ac.ir

فلور باکتریایی روده گربه‌ماهی *Pangasius sanitwongsei* بعد از دو ماه تغذیه با جیره حاوی چهار سطح مختلف ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به ازای هر کیلوگرم غذا مورد آزمایش قرار گرفت. ماهیان بامیانگین وزن اولیه ۱۶ گرم تا حدسیری تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش میانگین وزن نهایی ماهیان به حدود ۳۳،۱۱ گرم رسید. فلور میکروبی روده ماهیان با استفاده از دو محیط کشت عمومی (نوترینت آگار) و اختصاصی *MRSA* به ترتیب برای شمارش تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های لاکتوباسیل مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از لاکتوفرین در جیره غذایی حتی با غلظت اندک ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره منجر به کاهش معنی‌دار تعداد کل باکتری‌های روده شد. علاوه بر این جمعیت لاکتوباسیل‌ها در دو تیمار تغذیه شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم لاکتوفرین به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. به طوری که جمعیت لاکتوباسیل‌ها در تیمار ۴۰۰ بالاترین مقدار را نشان داد. به طور کلی نتایج این تحقیق بیانگر بهبود نسبی فلور میکروبی روده گربه‌ماهی تغذیه شده با لاکتوفرین گاوی است.

کلمات کلیدی: ماهی زینتی، فلور میکروبی، ترانسفرین، محیط کشت

مقدمه:

فلور میکروبی روده ماهیان تا حد بسیاری وابسته به فلور محیط آبی محیط زیست آن‌هاست [3]. فلور میکروبی شامل مجموعه بسیار گسترده‌ای از باکتری‌های مختلف است که برای ساز و کار دستگاه گوارش مفید هستند. یک دسته از باکتری‌های مفید لاکتوباسیل‌ها هستند. باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش کاربرد زیادی از جمله حفظ هموستازی روده، رقابت با عوامل بیماری‌زا، تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره و ایجاد تعادل در ایمنی بدن را بر عهده دارند [1]. این باکتری‌ها همچنین توانایی بسیار مهم تولید ویتامین‌های *K* و *B12* را به عهده دارند [4]. علاوه بر فلور میکروبی موجود در محیط آب، موارد دیگری از جمله سن، وضعیت تغذیه و ساختار دستگاه گوارش در تعیین نوع و میزان فلور موجود مؤثر هستند. استفاده از مکمل‌های غذایی از جمله پروبیوتیک‌ها می‌توانند بر فلور میکروبی مؤثر باشند. لاکتوفرین از اجزای سیستم ایمنی بدن است. این ماده وظیفه ضد میکروبی و بخشی از وظایف سیستم ایمنی غیر اختصاصی پستانداران را که از طریق ترشح موکوس انجام می‌گیرد، برعهده دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی جیره‌های محتوی سطوح مختلف لاکتوفرین بر فلور میکروبی دستگاه گوارش گربه‌ماهی به عنوان یک ماهی حایز اهمیت زینتی و خوراکی بود.

مواد و روش‌ها:

در ابتدا به منظور سازگاری ماهیان با شرایط جدید محیط پرورش به مدت یک هفته با غذای تجاری تغذیه شدند. غذاهای حاوی لاکتوفرین با دوزهای ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم غذا تهیه و غذادهی ماهیان به صورت چشمی در

حدسیری و به دفعات ۲ بار در شبانه روز انجام شد. دوره غذادهی ۲ ماه بود و پس از آن، فلورباکتریایی روده در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور در پایان دوره آزمایش، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شده سپس ۴ قطعه ماهی از هر تیماری به صورت تصادفی انتخاب و با عصاره گل میخک، 100 ppm ، بیهوش شدند. نمونه برداری از روده آنها صورت گرفت. برای جلوگیری از آلودگی روده‌ها، پوست ماهیان با اتانول ۷۵٪ ضدعفونی شد. ابتدا نسبت به تعیین رقت مورد نیاز برای شمارش کلونی‌ها اقدام و پس از آن از دو محیط کشت نوترینت آگار و *MRSA* (هر دو ساخت شرکت میکرومدیا، مجارستان) به ترتیب برای تعیین شمارش کل باکتری‌ها و تعداد باکتری‌های لاکتوباسیل استفاده شد. به این منظور، ۰/۱ گرم از نمونه همگن شده با سرم فیزیولوژی با ۰/۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۸۵٪ استریل مخلوط شده و برای شمارش تعداد کل باکتری‌ها و لاکتوباسیل‌ها به ترتیب میزان ۲۵۰ میکرولیتر از مخلوط فوق به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت عمومی یا اختصاصی اضافه شد. برای شمارش تعداد کل باکتری‌های از انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت و برای شمارش تعداد باکتری‌های لاکتوباسیل از انکوباتور بی‌هوای، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت استفاده شد [3]. کنترل منفی برای تیمارها در نظر گرفته شد. در نهایت تعداد کلونی‌های ایجاد شده به دقت شمارش و جمعیت باکتری‌های موجود از طریق رابطه زیر محاسبه و بر اساس *cfu/ml* گزارش گردید.

جمعیت باکتری‌ها *cfu/ml* = تعداد کلنی شمارش شده $\times 10 \times$ عکس ضریب رقت $\times 4$
عدد ۴ به منظور تعمیم ۲۵۰ میکرولیتر کشت داده شده به یک میلی‌لیتر و ۱۰ عکس وزن روده استفاده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار *SPSS 22*، *ANOVA* یک طرفه و برای گروه‌بندی تیمارها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد.

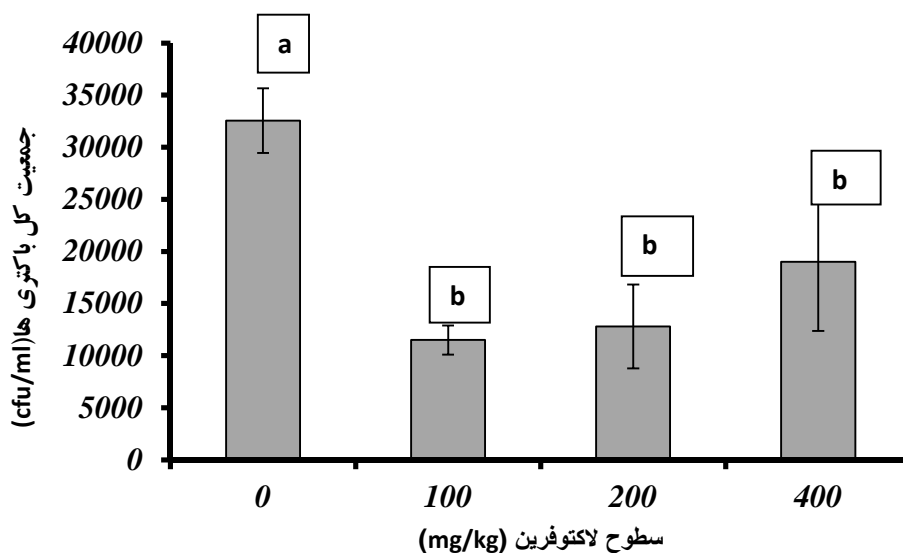
نتایج و بحث:

نتایج حاصل از سنجش تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش در شکل ۱ نشان داده شده است. باتوجه به نتایج می‌توان بیان داشت که تعداد کلی باکتری‌ها در روده گربه‌ماهی در محدوده ۱۲-۳۳ هزار *CFU/ml* متغیر بود. افزودن لاکتوفرین به جیره منجر به کاهش معنی‌دار تعداد کل باکتری‌ها در مقایسه تیمار شاهد شد، با این وجود بین مقادیر مختلف لاکتوفرین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج حاصل از آنالیز تعداد لاکتوباسیل‌ها در شکل ۲ ارائه شده است، افزودن لاکتوفرین به جیره منجر به افزایش معنی‌دار تعداد لاکتوباسیل‌ها از حدود 251 ± 1100 در گروه شاهد به $1620 \pm 6600 \text{ CFU/ml}$ در ماهیان تغذیه شده با لاکتوفرین در دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا رسید.

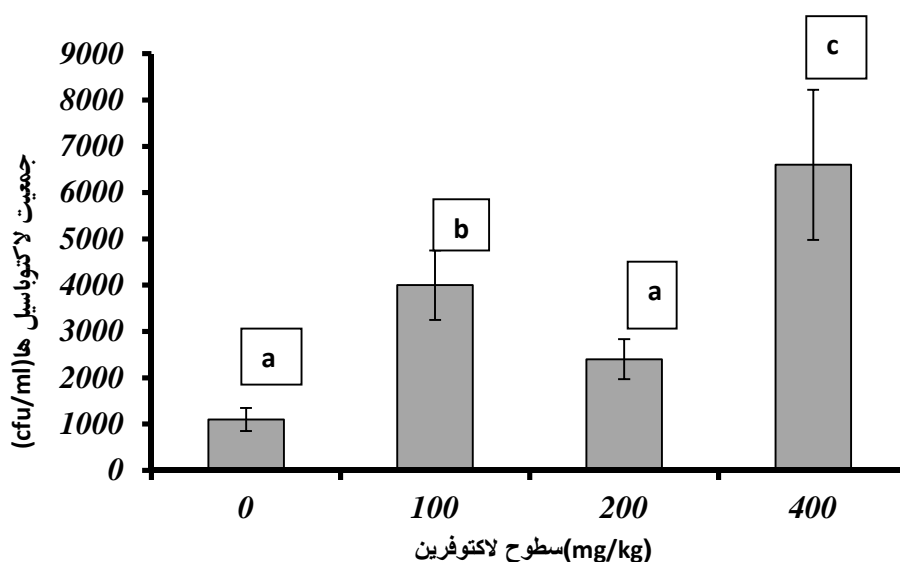
با توجه به نتایج به دست آمده از تأثیر لاکتوفرین بر جمعیت باکتریایی گربه‌ماهی *Pangasius sanitwongsei* می‌توان بیان کرد که لاکتوفرین اثر مثبت بر فلور باکتریایی داشته و آن را به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) تحت تأثیر قرار داده است. وانگ و همکاران (۲۰۰۷) اثر لاکتوفرین خوراکی را بر روی فلور میکروبی روده کوچک خوک بررسی کردند [6]. در این تحقیق فلور باکتریایی روده خوک‌هایی که با لاکتوفرین تغذیه شده بودند دارای جمعیت کل باکتری کمتری نسبت به شاهد بودند ولی این تفاوت به صورت معنی‌دار نبود. هم‌چنین پس از سنجش تعداد لاکتوباسیل‌ها مشخص گردید که تعداد آن‌ها در تیمارهای حاوی لاکتوفرین به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته است.

لاکتوفرین یکی از مقاوم‌ترین ترکیبات در برابر محیط روده است که این امر می‌تواند رشد باکتری‌ها را درون روده تنظیم کند و مقاومت موکوس داخل روده را بالا برد [6]. لاکتوفرین می‌تواند با آسیب رساندن به دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفی زمینه نابودی آن‌ها را فراهم سازد از این رو کاهش تعداد کلی باکتری‌های روده که عمدتاً در گربه‌ماهی از نوع باسیل‌های گرم منفی هستند [7]. قابل توجه است. از طرف دیگر، لاکتوفرین می‌تواند از تشکیل کلنی باکتری‌ها جلوگیری کند [5]. لاکتوفرین می‌تواند منجر به بهبود میزان فعالیت لیزوزیم در داخل روده شود. همین امر می‌تواند عامل نابودی بسیاری از باکتری‌ها باشد.

لاکتوباسیل‌ها از باکتری‌های گرم مثبت و مفید برای بدن هستند [2]، معمولاً جمعیت این باکتری‌ها به دلیل ازدحام باکتری‌های گرم منفی در داخل روده محدود می‌شود. به نظر می‌رسد لاکتوفرین با تغییر شرایط محیطی و محدودیت دسترسی به آهن و نیز افزایش فعالیت لیزوزیمی منجر به کاهش تعداد باکتری‌های گرم منفی و در نتیجه افزایش فضای مناسب برای انواع لاکتوباسیل‌ها می‌شود.



شکل ۱: جمعیت کل باکتری‌های روده (میانگین \pm خطای استاندارد) در گربه ماهی تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوفرین. وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P > 0.05$).



شکل ۲: جمعیت لاکتوباسیل‌های موجود در روده (میانگین \pm خطای استاندارد) در گربه ماهی تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوفرین. وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی:

به نظر می‌رسد تغذیه گربه ماهی با جیره حاوی لاکتوفرین منجر به بهبود کلی فلور میکروبی دستگاه گوارش می‌شود. این تغییر به صورت کاهش تعداد کل باکتری‌ها و افزایش تعداد باکتری‌های مفید روده خواهد بود.

منابع:

- 1- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Sen, J. and Schillinger, U. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41:85-101.
- 2- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A. and Mirkin, B. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:15611-15616.
- 3- Ringo, E. and Olsen, R.E. 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of dietary of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 86: 22-28.
- 4- Sheil, B., Shanahan, F. and Ombony, L. 2007. Probiotics effects on inflammatory bowel disease. *Journal of Nutrition*, 137: 819-824.
- 5- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R. and Moninger, T.O. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407: 762-764.
- 6- Wang, Y., Shan, T., Xu, Z. and Feng, J. 2014. Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 84: 2636-2641.
- 7- Yaghobi, M., Paykan Heyrati, F., Akhlaghi, M., Dorafshan, S., Mahmoudi, N. 2014. Intestinal microbiota of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) fed on dietary nucleotide. *Iranian journal of Ichthyology*, 1(4): 274-280.

*Effects of dietary bovine lactoferrin on bacterial flora of catfish *Pangasius sanitwongsei**

Shabrangzadeh, S¹*; Paykan Heyrati, F¹; Dorafshan, S¹; Ebrahimi Dourcheh, E.¹

¹ Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
*Email: s.shabrangzadeh@na.iut.ac.ir

Bacterial flora of intestine in catfish, *pangasius sanitwongsei* was investigated, after 2 months of feeding with a diet containing levels of bovine lactoferrin, 0, 100, 200 and 400 mg/kg. The mean initial and final fish weight were 16 and 33.11g respectively. Two different culture media, nutrient agar and MRS were used to identify the total bacterial and lactobacillus counts. The results showed that feeding fish, even with a diet containing blf as low dose as 100 mg/kg, could cause significant reduction of total bacterial counts. Lactobacillus counts were also changed by dietary blf, where lactobacillus counts were elevated in fish fed on 100 and 400 mg/kg blf, in comparison to control group. The highest lactobacillus counts was measured in fish fed on 400 mg/kg blf. In conclusion, the results indicate relative improvement of microflora in the catfish intestine after feeding blf.

Keywords: Ornamental fish, microflora, transferrin, culture media.