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

ابراهیم حسین نجدگرامی

دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۶/ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۵

پژوهشکدهٔ مطالعات دریاچهٔ ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

ایمیل: e.gerami@urmia.ac.ir

چکیده. نگرانی‌های زیست‌محیطی دربارهٔ استفادهٔ بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش استفاده از عوامل کنترل‌کنندهٔ طبیعی شده است. پلی‌بتاهیدروکسی بوتیرات پلی‌مری طبیعی است که می‌تواند به اسید چرب کوتاه‌زنجیرهٔ محلول در آب تبدیل شود و همچون عامل کنترل‌کنندهٔ میکروبی عمل کند. در این آزمایش تأثیر اضافه‌کردن این ماده به جیرهٔ غذایی بچه‌ماهیان در ۳ تیمار غذایی (کنترل، ۲ و ۵ درصد) بر فعالیت و تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی روده در بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری با روش community level physiological profiles تحت بررسی قرار گرفت. برای بررسی فعالیت و تنوع متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی در رودهٔ بچه‌ماهیان، از میکروپلیت‌های BiologTM Ecoplate استفاده شد. نتایج طرح نشان داد که استفاده از پلی‌بتاهیدروکسی بوتیرات میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی روده 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.

واژه های 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

فلور میکروبی روده نقش کلیدی در سلامتی و تغذیهٔ 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 درجهت افزایش میزان باکتری‌های مفید و همچنین متابولیت‌های آنها از طریق کاربرد پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها صورت‌گرفته است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های مفید مانند باکتری‌های لاکتیک اسید و گونه‌های مختلف باسیلوس‌ها هستند که می توانند ازراه جیره‌های غذایی وارد سیستم گوارش میزبان شوند و علاوه بر تحریک رشد ازطریق سازوکارهای مختلف، در رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا باعث بهبود سیستم ایمنی میزبان شوند؛ درحالی‌که پریبیوتیک‌ها ترکیباتی هضم-نشدنی هستند که صرفاً به‌وسیلهٔ میکروارگانیسم‌های خاصی در انتهای روده تجزیه و باعث افزایش سلامتی و رشد موجود می شوند (Gibson & Roberfroid, 1995; Manning & Gibson, 2004). تأثیر مثبت پریبیوتیک‌ها بر تحریک سیستم ایمنی، تولید متابولیت‌های مفید در روده ازطریق 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-Helland *et al.,* 2008; Akrami & Hajimoradloo, 2009; Yousefian & Amiri, 2009). در اثر تخمیر پریبیوتیک‌ها اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره تشکیل می‌شوند که با اسیدی‌کردن محیط روده تغییراتی در فلور میکروبی روده ایجاد می‌کنند. برای مثال گزارش‌هایی دربارهٔ تأثیر بازدارنده اسیدهای چرب کوتاه زنجیره بر روی *Salmonella* spp. و *Vibrio* spp. وجود دارد (Defroidt *et al.,* 2007). روش-های مختلفی برای شناسایی باکتری‌ها و بررسی تنوع ساختاری آنها در اکوسیستم‌ها پیشنهاد شده است که در این میان می‌توان به روش‌های وابسته به محیط های کشت میکروبی و روش‌های مولکولی، مانند تکثیر ناحیهٔ ژنی SrRNA با استفاده از تکنیک (DGGE) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis اشاره کرد. ولی بررسی تنوع باکتری‌ها براساس کارکرد و متابولیسم آنها با استفاده از community level physiological profiles (CLPP) روش جدیدی است که بوسیلهٔ 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 تترازولیوم 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 به‌دست می‌آید. این میکروپلیت‌ها برای اولین‌بار در بخش پزشکی برای شناسایی سویه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها به‌کار رفتند که در مراحل بعدی برای بررسی تنوع کارکردی باکتری‌ها در دیگر اکوسیستم‌ها ازجمله درخاک (Preston-Mafham *et al.,* 2002; Weber & Legge, 2009) و فلور باکتری‌های هوازی روده تاسماهی سیبری به‌کارگرفته شد (Najdegerami *et al.,* 2011).

پلی‌بتاهیدروکسی بوتیرات (PHB) یکی از ترکیبات کربنی خانواده پلی‌بتاهیدروکسی آلکانات هست که به‌منزلهٔ ذخیرهٔ منبع کربنی در سلول به‌کار می‌رود (Kato *et al.,* 1992; Patnik, 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 ذخیرهٔ کربنی تشکیل می‌شود (Defroidt *et al.,* 2007; Halet *et al.,* 2007; Van Cam *et al.,* 2009). براساس مطالعات صورت‌گرفته 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 اسیدی‌کردن روده و همچنین استفاده از آن به‌عنوان یک مادهٔ انرژی باعث بهبود وضعیت جاندار می‌شود. اثرات مثبت این ماده در افزایش مقاومت آرتمیا فرانسیسکانا دربرابر 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

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 بی هوازی روده بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری 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 می شد انجام گرفت. درجهٔ حرارت آب در طول آزمایش ثابت و حدود ۱ ± ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد بود. دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای بچه‌ماهیان اعمال شد. بچه‌ماهیان با وزن اولیهٔ ۰/۸ ± ۱۷ گرم و با تراکم ۸ گرم در لیتر در این حوضچه‌ها ذخیره سازی شدند و به مدت دوهفته با جیرهٔ 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 تغذیهٔ روزانهٔ بچه‌ماهیان وزن و غذادهی می‌شد و غذای اضافه در هر وعدهٔ غذایی سیفون و از میزان غذای محاسبه‌شده کسر می‌شد (Najdegerami *et al.*, 2011).

بعد از ۲ هفته تغذیه با غذای تجاری، از ۳ جیرهٔ تحقیقاتی شامل صفر درصد PHB (کنترل)، ۲ درصد PHB و ۵ درصد PHB استفاده شد. برای تهیهٔ این جیره‌ها ابتدا میزان مورد استفاده PHB محاسبه و در کلروفرم و آب با نسبت ۸۰ به ۲۰ حل شد و سپس روی جیرهٔ تجاری اسپری شد. جیره‌ها در درجهٔ حرارت اتاق برای ۲ روز نگهداری شدند تا تمام کلروفرم تبخیر شود و سپس در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اطمینان از خشک‌شدن آنها، جیره‌ها ۳ روز قبل از شروع آزمایش تهیه شدند (Najdegerami *et al.*, 2011). برای اندازه‌گیری میزان CLPP برای باکتری‌های بی‌هوازی انتهای روده، از میکروپلیت‌های Biolog Ecoplate ™ (Biolog Inc.) استفاده شد که شامل ۳۱ منبع کربنی به‌علاوهٔ یک کنترل منفی (آب) در ۳ تکرار بود (Insam, 1997). برای این‌کار ۳ ماهی از هر تکرار با استفاده از محلول ۲ میلی‌لیتر 2-Phenoxyethanol در یک لیتر آب بی‌هوش شدند و پس‌از بازکردن قسمت شکمی در وضعیت استریل، محتویات انتهای رودهٔ آنها برداشت و پس‌از مخلوط‌کردن، 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 صاف‌کردن 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 درجهٔ سانتی‌گراد در شرایط بی هوازی (oxoid anaerobic jar, HP001A) به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند و میزان جذب نور هرکدام 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=Σ(C-R)/n محاسبه شد. در این فرمول C میزان جذب نور در داخل هرکدام از خانه‌های میکروپلیت پس از انکوباسیون، R میزان جذب نور در خانهٔ حاوی آب و n تعداد سوبسترا در میکروپلیت‌ها است که در میکروپلیت‌های Ecoplate این تعداد ۳۱ است. هر کدام از داده‌های خام حاصل از دستگاه پلیت ریدر به‌وسیلهٔ 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 بی هوازی روده بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری که از درصدهای مختلف PHB تغذیه کرده بودند با توجه به رابطهٔ زیر محاسبه شد:

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

که در این رابطه Pi جذب نسبی در هر خانه میکروپلیت است. همچنین برای بررسی evenness در این باکتری‌ها از رابطهٔ 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

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 به‌کار 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 همسان‌بودن 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.

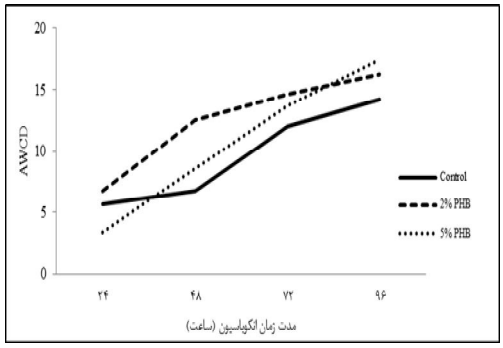
نتایج

میانگین تکامل رنگ در خانه‌های میکروپلیت (AWCD) برای ارزیابی میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت مورد استفاده قرار گرفت. چنان‌که در شکل ۱ دیده می‌شود تغذیهٔ بچه‌ماهیان با PHB میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌های قابل‌کشت 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 هرگروه 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 نشان می‌دهد مشاهده می‌شود، میزان متابولیسم یا فعالیت متابولیکی باکتری‌ها در تیمار ۵ درصد PHB بالاتر از کنترل و ۲ درصد PHB است، درحالی‌که میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌ها 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 متابولیکی در باکتری‌ها دربارهٔ مصرف اسیدهای آمینه در تیمار ۲ درصد به‌ترتیب 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 به‌ترتیب ۱۴۲ و ۳۱ درصد بیشتر از تیمار کنترل و ۵ درصد بود.

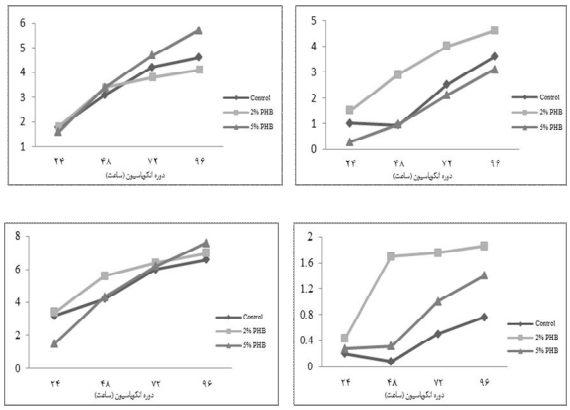
برای بررسی سطح تنوع متابولیسمی باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت از شاخص‌های shannon و evenness استفاده شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که استفاده از PHB میزان این شاخص‌ها را تغییر می‌دهد. نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از جیرهٔ غذایی ۲ درصد میزان این شاخص‌ها را به طور معنی داری نسبت به تیمار ۵ درصد افزایش می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

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



شکل ۱- میزان فعالیت متابولیکی باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت در بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری 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 می دهد.

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) کربوکسیلیک اسیدها به‌عنوان منابع کربنی به‌وسیلهٔ باکتری‌های غیرهوازی قابل کشت در انتهای رودهٔ بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری در تیمارهای غذایی. در این شکل‌ها محور افقی مدت‌زمان انکوباسیون براساس ساعت و محور عمودی ضریب میانگین تکامل رنگ را برای هر ترکیب در میکروپلیت‌ها نشان می‌دهد.

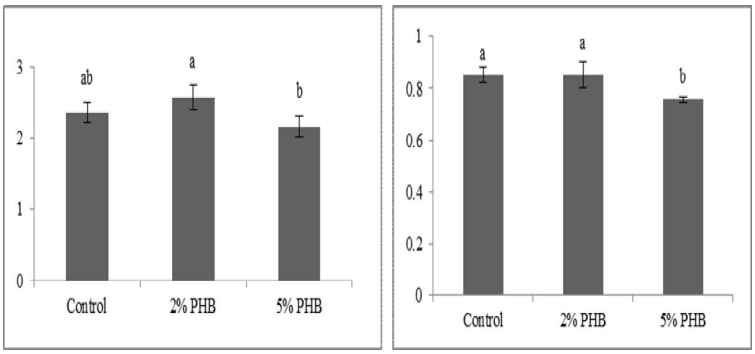
Fig. 2. The use of (a) polymers, (b) amino acids, (c) carboxylic acids, and (d) carbohydrates as the carbon source by intestinal bacteria from sturgeon fingerlings receiving experimental diets. The x-axis represents incubation time for cultured hindgut bacteria of fish given different diets.

باتوجه به نتایج ارائه‌شده 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. نکتهٔ قابل توجه در این طرح این است که بالاترین میزان رشد در تیمار ۲ درصد مشاهده شد.

بحث

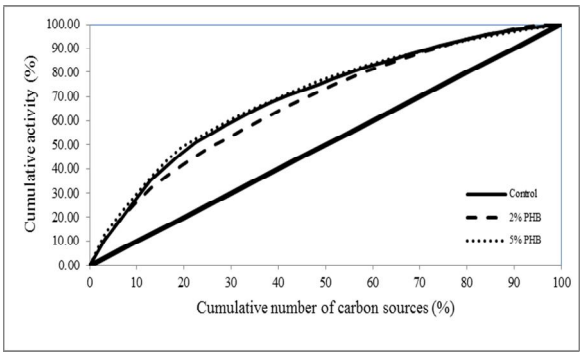
در طول دو دههٔ گذشته آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیعی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین برای افزایش رشد مخصوصاً در صنعت تولیدات حیوانی به‌کاررفته‌اند (Acar *et al.*, 2000) با توجه به محدودیت استفاده از این مواد، مخصوصاً بعد از ممنوعیت ورود مواد غذایی حاوی آنتی‌بیوتیک به اتحادیهٔ اروپا از سال ۲۰۰۶، بحث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

محرک رشد و تقویت‌کنندهٔ سیستم ایمنی در صنعت تولیدات حیوانی به‌خصوص آبزیان شدت گرفته است (De Schryver, 2010).



شکل ۳- میزان شاخص‌های shannon (چپ) و evenness (راست) در تیمارهای غذایی براساس داده های 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 می-دهد.

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



شکل ۴- پراکنش گونه‌ای (evenness) باکتری‌های بی‌هوازی قابل کشت در رودهٔ بچه‌ماهیان تاسماهی سیبری براساس داده های میکروپلیت‌های Ecoplate.

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

یکی از موادی که به‌عنوان محرک رشد و عامل کنترلی اخیراً در پرورش آبزیان به‌کاررفته است پلی‌بتاهیدروکسی بوتیرات است که از خانوادهٔ آلکانات ها می‌باشد. این ماده بوسیلهٔ آنزیم-های خارج‌سلولی باکتری‌ها تجزیه می‌شود و β-hydroxybutyric acid تولید می‌کند که علاوه بر کاهش pH محیط روده به‌عنوان منبع انرژی برای جانداران به شمار 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 سی باس و آرتمیا فرانسیسکانا در مقایسه با تیمار بدون غذا می‌شود که نشان‌دهندهٔ انرژی زا بودن این ماده است (Defroidt *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2010).

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 سیبری (Najdegerami *et al.*, 2011) باعث افزایش رشد و تنوع باکتریایی در روده می‌شود. نتایج این تحقیقات درجهت 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 بی‌هوازی 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 سیبری 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 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 متابولیکی باکتری‌های هوازی رودهٔ تاسماهی سیبری بررسی کرده بودند هم‌خوانی دارد. نتایج مثبت استفاده از PHB در تحقیقات انجام‌گرفته درباب و تنوع باکتری‌های هوازی در سی‌بس اروپایی، میگوی دراز آب شیرین، ماهی قزل‌آلا رنگین کمان (داده‌های منتشرنشده) و تاسماهی سیبری به اثبات رسیده است. نتایج این طرح دربارهٔ تاثیر 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 سیبری مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

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

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-b-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.

Grisdale-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 Revolution 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 totaltract 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.