

تأثیر پریبیوتیک (prebiotic) اینولین (inulin) بر شاخص تولید و تراکم باکتریایی دستگاه گوارش فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی

رضا اکرمی^۱، عبدالمجید حاجی مرادلو^۲، عباس متین فر^۳،
عبدالمحمد عابدیان کناری^۴ و رئوف مازندانی^۵

^۱دانش آموخته واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، ^۲گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

^۳مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ^۴گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور،

^۵گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Email: akrami202@yahoo.com

چکیده

استفاده از پریبیوتیک‌ها به عنوان مواد غذایی غیر قابل هضم که به طور مؤثری سلامتی میزبان را از طریق تحریک و یا محدود کردن رشد باکتری‌های موجود در روده تحت تأثیر قرار می‌دهند، ایده جدیدی در آبی‌پروری می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی عملکرد اینولین به عنوان پریبیوتیک در سه سطح ۱، ۲ و ۳ درصد که جایگزین سلولز جیره شاهد شده بودند بر شاخص تولید و تراکم باکتریایی دستگاه گوارش فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی در حوضچه‌های فایبرگلاس ۸۰۰ لیتری در شرایط پرورشی یکسان انجام پذیرفت. بچه ماهیان با میانگین وزنی $16/14 \pm 0/38$ گرم و با تراکم ۵۰ عدد (با میانگین بیوماس اولیه ۸۲۱/۵۸ گرم به ازای هر تیمار) به مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. نتایج نشان داد شاخص تولید در تیمارهایی که از سطوح متفاوت پریبیوتیک اینولین تغذیه کرده بودند در مقایسه با ماهیان گروه شاهد کاهش یافت و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده گردید ($P < 0/05$). در هفته هشتم پرورش با افزایش سطح اینولین در جیره، روند کاهشی در شمارش کلی باکتریایی، شمارش کلی مخمر و قارچ و تعداد کل لاکتوباسیلوس‌های روده مشاهده گردید. بیشترین تراکم لاکتوباسیلوس‌ها در سطح ۱ درصد اینولین در جیره غذایی مشاهده گردید ولی تفاوت معنی داری در نرخ بازماندگی ماهیان تیمارهای مختلف حاصل نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح متفاوت پریبیوتیک اینولین قابلیت تأثیرگذاری بالایی بر کارایی تولید در فیل ماهی پرورشی ندارند و این نوع پریبیوتیک نمی‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی فیل ماهی باشد.

واژه‌های کلیدی: اینولین، پریبیوتیک، تراکم باکتریایی، تولید، فیل ماهی (*Huso huso*)

مقدمه

است. در حال حاضر چالش عمده در آبی‌پروری تجاری، بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای بهینه‌سازی رشد و ارتقاء سلامت ماهیان می‌باشد. ایده جدیدی که در این رابطه مطرح شده استفاده از پریبیوتیک در جیره غذایی ماهی و میگو می‌باشد. پریبیوتیک‌ها عناصر غذایی (کربوهیدرات‌های) غیر قابل هضمی هستند که از

توسعه روزافزون آبی‌پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش درخواست و استفاده از مواد شیمیایی جدید شده است به طوری که در سال‌های اخیر بسیاری از مواد شیمیایی و ترکیبات صنعتی از جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبی‌پروری استفاده شده

مواد و روش‌ها

زمان و محل اجرای تحقیق: این بررسی از اواسط خرداد ماه تا اواخر مرداد ماه سال ۱۳۸۶ به مدت ۸ هفته در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی آق قلا انجام پذیرفت. پس از سازگاری اولیه و عادت دهی بچه ماهیان به غذای دستی مورد استفاده در آزمایش، تعداد ۶۰۰ عدد بچه فیل ماهی با وزن متوسط $16/14 \pm 0/38$ گرم با تراکم ۵۰ عدد و میانگین بیوماس اولیه $821/58$ گرم در ۱۲ حوضچه فایبرگلاس که با حدود ۸۰۰ لیتر آب پر شده بودند کشت گردیدند.

نوع پرپیوتیک مصرفی: پرپیوتیک مورد استفاده در این آزمایش اینولین (رافتیلین ST) است که فروکتان‌های خطی (۱ → ۲) -β می‌باشد. رافتیلین شکل استاندارد اینولین استخراج شده از ریشه گیاه کاسنی می‌باشد. درجه پلیمریزاسیون آن ۶۰-۲ درصد می‌باشد. حداقل میزان فروکتان‌های تضمین شده توسط کارخانه ORAFI ۹۰ درصد است. ترکیبات دیگر آن شامل گلوکز، فروکتوز و ساکارز می‌باشد. این پرپیوتیک از شرکت ORAFI کشور بلژیک تهیه گردید.

تهیه و ساخت جیره‌های آزمایشی: این تحقیق با استفاده از طرح کاملاً تصادفی شامل سه سطح اینولین ۱، ۲ و ۳ درصد که جایگزین سلولز جیره شاهد گردیدند (۱۰) با سه تکرار طراحی شد. جیره‌نویسی با استفاده از نرم‌افزار لیندو (Lindo, 1994) و با توجه به احتیاجات غذایی فیل ماهی برای هر یک از جیره‌های آزمایشی تعیین شد. از پودر ماهی کیلکا به‌عنوان منبع اصلی پروتئین، از روغن ماهی کیلکا و روغن سویا به‌عنوان منبع انرژی و عامل تنظیم انرژی جیره استفاده شد. میزان استفاده از ویتامین‌ها، مواد معدنی و سایر مکمل‌ها و افزودنی‌ها نیز در تمام جیره‌ها یکسان بود (جدول ۱).

طریق تحریک رشد یا فعال کردن یک یا تعداد محدودی از گونه‌های باکتریایی که در روده وجود دارند، اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن را بهبود می‌بخشد (۵)، بنابراین پرپیوتیک‌ها باعث بهبود و تعادل میکروفلور روده و افزایش مکانیسم دفاعی میزبان می‌شوند. عناصر غذایی که به‌عنوان پرپیوتیک طبقه‌بندی می‌شوند بایستی خواصی را داشته باشند از جمله: در بخش‌های فوقانی دستگاه گوارش نبایستی هضم و جذب شوند، توسط یک یا تعدادی از باکتری‌های مفید روده بصورت گزینشی تخمیر شوند و فلور میکروبی روده را به تولید ترکیبات سالم‌تر سوق دهند (۳). تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و اسیدلاکتیک ناشی از تخمیر اینولین منجر به کاهش pH روده می‌شود که شرایط مناسبی را برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک فراهم می‌کند (۱۹). در حال حاضر پرپیوتیک‌ها بیشتر بر اساس توانایی شان در افزایش رشد میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک انتخاب می‌شوند (۵). اینولین یک کربوهیدرات گیاهی غیر قندی همپولی‌ساکاریدی است که دارای فیبر محلول بوده و از گیاهان مختلفی با درجه پلیمریزاسیون متفاوت بدست می‌آید (۱۶). با وجود اثرات مفیدی که برای پرپیوتیک در نظر گرفته شده است، تحقیقات در این زمینه هنوز در آغاز راه خود قرار داشته و تعداد محدودی تحقیق در زمینه اثر پرپیوتیک در ماهیان انجام شده است که از جمله آنها می‌توان به تأثیر اینولین در ماهی چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) (۱۲)، تأثیر اینولین و لیگوفروکتوز روی لارو ماهی کفشک (*Psetta maxima*) و تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*) (۹ و ۱۰) اشاره کرد.

جدول ۱- اجزاء غذایی و ترکیب شیمیایی جیره های آزمایشی به درصد برای فیل ماهیان جوان پرورشی طی ۸ هفته پرورش

تیمار	اجزاء جیره	شاهد	۱٪ اینولین	۲٪ اینولین	۳٪ اینولین
پودر ماهی کیلکا	۶۱/۷	۶۱/۷	۶۱/۷	۶۱/۷	۶۱/۷
دکسترین	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
روغن ماهی کیلکا	۴	۴	۴	۴	۴
روغن سویا	۴	۴	۴	۴	۴
مکمل معدنی- ویتامینی ^۱	۵	۵	۵	۵	۵
سلولز	۳	۱	۲	۱	۰
پربیوتیک اینولین	۰	۲	۱	۲	۳
مواد چسباننده (همبند) ^۲	۲	۲	۲	۲	۲
ضد قارچ ^۳	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
آنتی اکسیدانت ^۴	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
تجزیه تقریبی جیره ها (درصد ماده خشک)					
ماده خشک	۹۷/۵۶	۹۷/۸۶	۹۷/۵۸	۹۷/۷۹	۹۷/۷۹
پروتئین خام	۳۹/۰۴	۳۸/۶۳	۳۸/۹	۳۸/۶۸	۳۸/۶۸
چربی خام	۱۷/۹۳	۱۷/۲۱	۱۶/۸۸	۱۸/۳۲	۱۸/۳۲
خاکستر	۹/۱۷	۹/۱۲	۹/۳۴	۱۰/۶۲	۱۰/۶۲
عصاره عاری از ازت	۳۱/۷۷	۳۲/۵۵	۳۲/۵۸	۲۹/۹۲	۲۹/۹۲
انرژی خام (مگاژول بر کیلوگرم جیره)	۱۸/۴۶	۱۹/۲۳	۱۹/۴۶	۲۰/۰۹	۲۰/۰۹

۱- مکمل معدنی ویتامینی تحت عنوان ویتامینت بوده و شامل: A, C, D3, E, B1, B2, B6, K3، نیکوتینامید؛ مواد معدنی شامل مس، آهن، روی، منگنز

۲- همبند آمت محصولی از شرکت افراز مهر تابان شهر یزد می باشد. و از هیدرولیز پروتئین های حیوانی مخصوصا سوپ حاصل از پخت ماهی تهیه می شود و حاوی ۷۱/۹۸٪ پروتئین، ۰/۹٪ الیاف، ۹/۵۵٪ رطوبت و ۱۷/۸٪ خاکستر می باشد.

۳- نوع ضد قارچ توکسیبان پرمیکس بوده، ترکیبات آن شامل آلومینوسیلیکات، زئولیت، بنتونایت، پروپیونات آمونیم، عامل ژلانی کننده و مواد معدنی می باشد.

۴- آنتی اکسیدانت از نوع بوتیل هیدروکسی تولوئن بوده (BHT) Butylated hydroxytoluene و از شرکت خوراک دام مازندران شهرستان ساری تهیه شد.

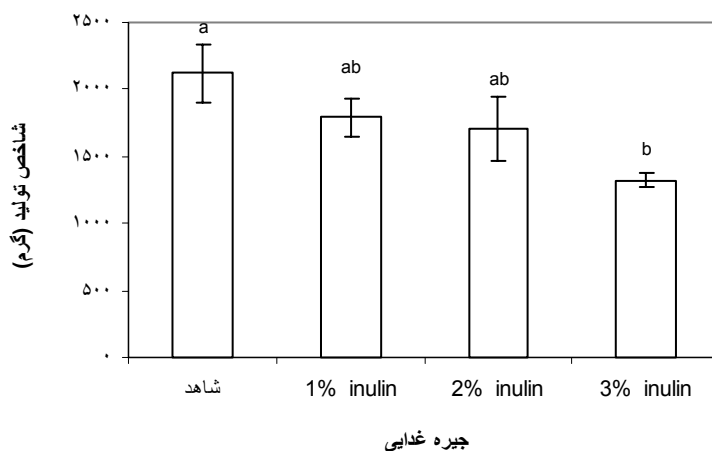
آزمایش های باکتریایی: به منظور بررسی قابلیت تشکیل

کلنی و تثبیت لاکتوباسیلوس ها در روده فیل ماهیان پرورشی تغذیه شده با سطوح مختلف پربیوتیک اینولین، در ابتدا، وسط و انتهای دوره آزمایش بطور تصادفی نمونه برداری انجام گردید. جهت رفع جمعیت باکتری های سطح بدن ماهیان، نمونه های ماهی ابتدا در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفته (۱۰) و سپس ناحیه شکمی ماهیان با استفاده از تیغ جراحی استریل شکافته و روده آنها پس از جداسازی به-

منظور هموژن سازی به هاون چینی استریل منتقل گشت. پس از تهیه هموژن با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل (۰/۸۷ w/v NaCl درصد) رقت های سریالی در دامنه 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه گردید. از رقت های فوق تحت شرایط استریل توسط نمونه بردار، حجمی معادل ۰/۱ میلی لیتر برداشته و به پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار (NA) Nutrient agar (شمارش کلی باکتریایی)، تریپتیک سوی آگار (TSA) Tryptic soy agar (شمارش کلی باکتریایی)، سابورد دکستروز

نتایج

شاخص تولید: تولید خالص ماهی در تیمارهایی که از سطوح مختلف اینولین تغذیه کرده بودند در مقایسه با ماهیان گروه شاهد کاهش یافت و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده گردید ($P < 0/05$). در بین تیمارهای آزمایشی حاوی اینولین، بیشترین مقدار این شاخص در سطح ۱ درصد اینولین مشاهده گردید. با این حال تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ($P > 0/05$). کمترین مقدار تولید خالص در تیمار ۳ درصد اینولین معادل ۱۳۲۴/۶۲ گرم و بیشترین آن در گروه شاهد برابر ۲۱۱۸/۷۹ گرم تعیین گردید (شکل ۱). نتایج حاصل از رگرسیون خطی حاکی از همبستگی منفی معنی داری بین شاخص تولید و افزایش سطح اینولین در جیره بود ($r = -0/975, P = 0/025$).



شکل ۱- میانگین شاخص تولید در فیل ماهیان جوان پرورشی تغذیه شده با سطوح مختلف پریبیوتیک اینولین طی ۸ هفته

کاهش در تعداد کل باکتری‌های روده مشاهده گردید (شکل ۲).

شمارش کلی باکتریها در محیط کشت NA: لگاریتم واحد شمارش کل باکتری‌های موجود در محیط کشت NA در ابتدای آزمایش به معادل ۴/۹۵ CFU/g رسید. در محیط کشت NA اختلاف معنی داری در تعداد کل باکتری‌های روده در هفته چهارم در تیمارهای مورد

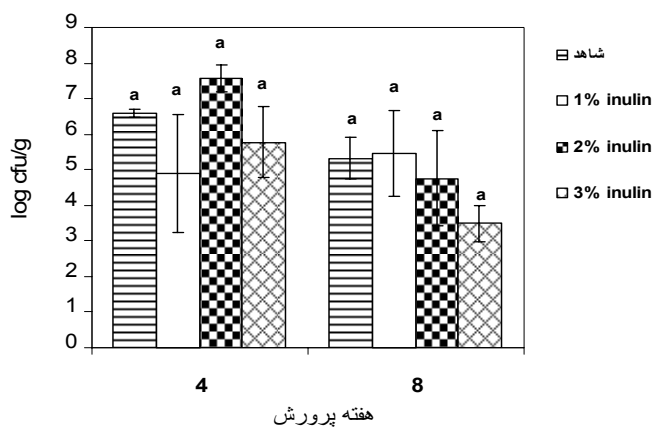
آگار Sabouraud dextrose agar (SDA) (شمارش کللی قارچ و مخمر) و ام-آر-اس آگار DeMan, Rogosa and Sharpe (MRS) (تشکیل کلنی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک) منتقل و در سطح آن پخش گردیدند (۱۰ و ۱۴). پلیت‌های فوق به مدت ۵ شبانه روز در دمای اتاق انکوباسیون شده و سرانجام تعداد باکتری‌ها در هر یک از نمونه‌ها بر حسب لگاریتم واحد کلنی (تعداد کلنی حاصله \times عکس ضریب رقیق‌سازی) (CFU = CFU/ g intestine) شمارش و تعیین گردیدند (۱۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن با کمک نرم افزار SPSS (ویرایش نهم) انجام پذیرفت و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح اعتماد ۵ درصد ($P < 0/05$) تعیین گردید.

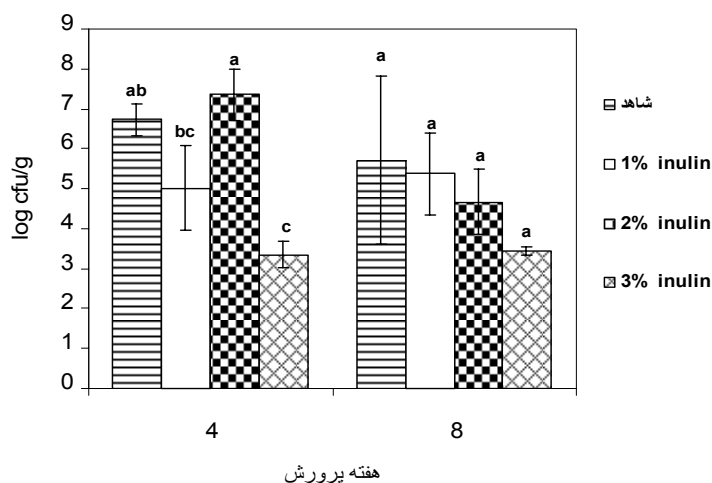
شمارش کلی باکتری‌ها در محیط کشت TSA: در شروع آزمایش لگاریتم واحد شمارش کل باکتری‌های روده معادل ۵/۱ CFU/g بود. تعداد کل باکتری‌های روده در هفته چهارم و هشتم در محیط کشت TSA اختلاف معنی داری را در مقایسه بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی حاوی اینولین نشان نداد ($P > 0/05$). در انتهای دوره پرورش با افزایش سطح اینولین در جیره، روند

باکتری‌های روده بدون تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید ($P > 0.05$) (شکل ۳).

بررسی مشاهده شد ($P < 0.05$). در هفته هشتم روند مشابهی همانند محیط کشت TSA مشاهده گردید و با افزایش سطح اینولین در جیره، روند کاهشی در تعداد کل



شکل ۲- تعداد کل باکتری‌های موجود (CFU/g) در روده فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف اینولین در محیط کشت TSA



شکل ۳- تعداد کل باکتری‌های موجود (CFU/g) در روده فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف اینولین در محیط کشت NA

لاکتوباسیلوس‌های روده در هفته چهارم و هشتم در محیط کشت MRS اختلاف معنی‌داری را در مقایسه بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی نشان داد ($P < 0.05$).

شمارش کلی لاکتوباسیلوس‌ها در محیط کشت MRS: لگاریتم واحد تعداد کل لاکتوباسیلوس‌های روده در شروع آزمایش معادل ۴/۳۷ CFU/g بود. تعداد کل

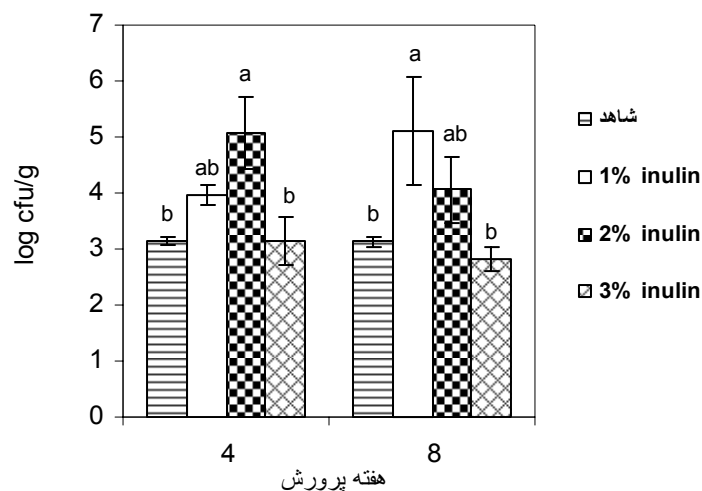
جدول ۲- مشخصات افتراقی بدست آمده از تست‌های بیوشیمیایی گونه‌های لاکتوباسیلوس

گونه	تست	کاتالاز	نیترات	مانیتول	رافینوز	رشد در ۴۵ درجه
لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	-	-	+/+	+/	+	+/_
لاکتوباسیلوس کازئی	-	-	-	+	-	+
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	-	-	-	-	+/	-
لاکتوباسیلوس لیثمانی	-	-	-	-	+/	-

+/+ منفی (کمتر مثبت) /- مثبت (کمتر منفی)

تعداد کل لاکتوباسیلوس‌های روده مشاهده گردید. نتایج حاصل از بررسی تشخیص گونه‌ای لاکتوباسیلوس موجود در روده فیل ماهیان پرورشی بر مبنای کشت مجدد کلنی و پرگنه‌های جدا شده در محیط نوترینت برات، محیط آگار خوندار و انجام آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد گونه *Lactobacillus plantarum* تحت شرایط هوایی از روده فیل ماهی جدا شد که این موضوع در جدول ۲ نشان داده شده است.

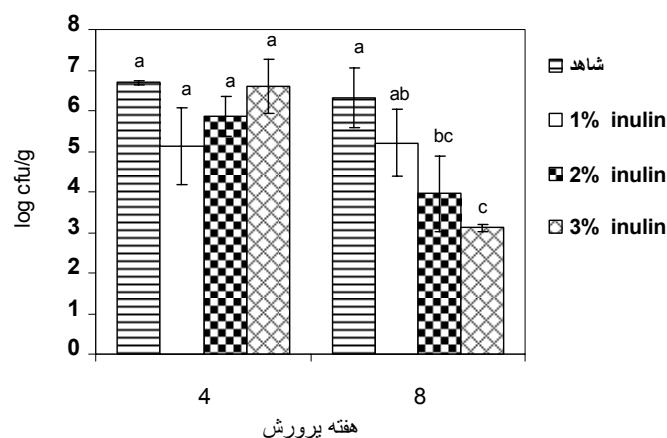
گروه شاهد و تیمار ۳ درصد اینولین در این دو زمان اختلافی را نشان ندادند ولی این دو تیمار با تیمار ۲ درصد اینولین در هفته چهارم پرورش و با تیمار ۱ درصد اینولین در هفته هشتم پرورش اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۴). بیشترین میزان لاکتوباسیلوس‌های روده در پایان دوره آزمایش در فیل ماهیان تغذیه شده در سطح ۱ درصد اینولین جیره مشاهده گردید. در هفته هشتم نیز با افزایش سطح اینولین در جیره نیز روند کاهشی در



شکل ۴- تعداد کل باکتری‌های اسید لاکتیک (cfu/g) در روده فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف اینولین

کمی (شمارش کلنی‌ها) نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید ($P < 0.05$): بدین ترتیب که با افزایش سطح پریبیوتیک اینولین تعداد کلنی مخمر و قارچ در روده کاهش یافت.

شمارش کلی مخمر و قارچ در محیط کشت SDA: در شروع آزمایش CFU کل مخمر و قارچ به ازای هر گرم از روده معادل ۳/۷۷ بود. در هفته چهارم پرورش اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و نیز تیمار شاهد بدست نیامد ($P > 0.05$). در هفته هشتم پرورش، از نظر



شکل ۵- تعداد کل قارچ و مخمر (CFU/g) در روده فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف اینولین

بحث

آبزی پروری از سریع‌الرشدترین بخش‌های تولید بوده و در کنار این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی روبرو بوده که از جمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد، به گونه‌ای که گسترش اقتصاد این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است و همواره راه‌حلهایی نیز برای برطرف کردن این مشکلات ارائه شده است که موفقیت‌چندانی نداشته‌اند. در سال‌های اخیر استفاده از پریبیوتیک‌ها به‌عنوان یک ایده مطرح شده است که این ترکیبات جزئی از اجزای غذایی غیرقابل هضم هستند و از طریق بهبود فلور باکتری‌های روده، اثرات زیانبار عوامل عفونت‌زا را کاهش و میزان بقا را در مواجهه با عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهند. چنین اطلاعاتی در خصوص تأثیر پریبیوتیک‌ها در موجودات آبزی محدود می‌باشد.

فلور میکروبی ماهیان شامل مجموعه‌ای از باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری می‌باشد که نقش مهمی را در هضم غذا و کنترل بیماری‌ها بر عهده دارند. فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان شامل باکتری‌های دائم^۱، موقت و در حال عبور (که جزء فلور ثابت باکتریایی شمرده نمی‌شوند)^۲ می‌باشد. اکوسیستم روده ماهیان میکروفلور چندانی ثابتی ندارد، اگرچه دستگاه گوارش ماهی اکوسیستم متفاوتی را نسبت به آب محیط پرورش فراهم می‌نماید (۲۱). با این وجود سایر محققین به هیچ شباهتی بین گروه‌های باکتریایی جدا شده از آب، روده و جیره غذایی دست نیافتند (۱۸).

حضور باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان باکتری‌های دائم در اکوسیستم روده ماهیان از جمله ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) ثابت شده است اما جزء فلور

غالب روده نیستند (۷ و ۲۱). باکتری‌های اسیدلاکتیک بواسطه تولید باکتریوسین‌ها مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زا شده و بدین ترتیب اثرات مثبتی بر میکروفلور روده ماهی دارند. در بررسی حاضر نیز با افزایش میزان اینولین جیره از ۱ تا ۳ درصد؛ شاخص تولید ماهی و تعداد کل لاکتوباسیلوس‌های روده کاهش یافت. در هر دو گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی، بخش عمده باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده متعلق به گونه *Lactobacillus plantarum* بود که احتمال می‌رود جزء فلور موقت باشد اما دقیقاً معلوم نیست. وجود این گونه لاکتوباسیلوس در فلور اولیه روده لارو ۴ روزه ماهی کاد اقیانوس اطلس که در تماس با ماهیانی که واجد این باکتری بودند، گزارش شده است (۲۰) و نتیجه‌گیری شد که فلور باکتریایی ماهیان الزاماً تابع جیره غذایی و آب محیط پرورشی نیست.

در تمامی تیمارهای مورد بررسی یک روند کاهشی در شمارش کلی باکتریایی، شمارش کلی قارچ و مخمر و شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در انتهای دوره پرورش (هفته هشتم) مشاهده گردید که دلایل متعددی را برای این موضوع از جمله تغییرات فاکتورهای تغذیه‌ای و محیطی به ویژه درجه حرارت آب می‌توان ذکر کرد. در جدا سازی باکتری‌های اسیدلاکتیک فاکتورهای نظیر نوع محیط کشت، دمای انکوباسیون و طول مدت انکوباسیون بسیار مهم به نظر می‌رسند (۷). علاوه بر موارد مذکور، RingØ و همکاران (۲۰۰۶) عدم وجود گلوکز در محیط کشت و کند رشد بودن را عامل محدود کننده دیگری برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک ذکر کرده‌اند.

در مطالعه‌ای افزودن پریبیوتیک لاکتوسوکروز به جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی قزل‌آلا نتیجه‌گیری شد که این پریبیوتیک به‌میزان خیلی کمی توسط فلور روده این ماهیان مورد مصرف قرار گرفته است (۸). همچنین نتایج بررسی این محققین در ماهی شانک (*Pagrus major*) نشان داد لاکتوسوکروز باعث افزایش ضخامت غشاء پوششی روده گشته و این

1- indigenous
2- transit

قند به عنوان سوبسترا توسط میکروفلور روده مورد مصرف قرار گرفته است.

در مطالعه‌ای تأثیر اینولین، الیگوفروکتوز و لاکتوسوکروز به عنوان پریبیوتیک روی فلور باکتریایی روده در لارو ماهی کفشک مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق لارو ماهی توربوت (از سن ۲۹ تا ۵۵ روزگی) با جیره های آزمایشی در سطح ۲ درصد از پریبیوتیک‌های مذکور و گروه شاهد نیز به میزان ۲ درصد سلولز به عنوان منبع کربوهیدرات مورد تغذیه قرار گرفتند. فلور باکتریایی در لارو کفشک متغیر بود و در محیط کشت TCBS agar سویه *Vibrio spp* غالب بود. در گروه تغذیه شده با الیگوفروکتوز، حدود ۱۴ درصد کل فلور باکتریایی جدا شده از روده به سویه *Bacillus spp* تعلق داشت و این سویه توانست الیگوفروکتوز را به عنوان تنها منبع کربن مصرف کند و نتیجه‌گیری شد پریبیوتیک الیگوفروکتوز می‌تواند نقش مفیدی در رشد لارو ماهی کفشک داشته باشد (۱۰).

Mahious و همکاران (۲۰۰۵)، طی بررسی روی تنوع تاکسونومیک فلور میکروبی روده تاسماهی سبیری و کشت محتویات دستگاه گوارش در دو محیط کشت NA (کل باکتری‌های هترترف) و MRS و انکوباسیون در دمای اتاق، ۴۵۰ گروه باکتریایی جدا نمودند که از این تعداد اکثریت باکتری‌های جدا شده به گروه *Bacillus subtilis* (۱۹/۷۸ درصد) و اعضای خانواده *Entrobacteriaceae* شامل *Plesiomonas shigelloides* (۱۱/۷ درصد) و *Hafnia alvei* (۱۲ درصد) تعلق داشت (۱۰).

در مطالعه RingØ و همکاران (۲۰۰۶) جایگزینی اینولین به میزان ۱۵ درصد با دکسترین موجود در جیره شاهد در ماهی چار قطبی منجر به کاهش جمعیت باکتریهای روده از 4×10^8 به $3/56 \times 10^4$ به ازای هر گرم از وزن روده شد. همچنین کلنی باکتری‌ها در بخش خلفی روده در ماهیان تغذیه شده با اینولین بیشتر از نوع باکتری‌های گرم مثبت از جنس *Staphylococcus*

Bacillus و *Carnobacterium*، *Streptococcus* بود. در حالی که سویه‌هایی شبه *Carnobacterium divergen* از ماهیان تغذیه شده از دکسترین و سویه شبه *Carnobacterium maltaromicus* از بخش خلفی روده ماهیان تغذیه کرده از اینولین، جدا شد (۱۵). در بررسی حاضر نیز با افزایش سطح اینولین از ۱ تا ۳ درصد جیره، تراکم کل باکتری‌های روده کاهش یافت و با نتایج این تحقیق مطابقت می‌نماید چرا که مشخص شده که اینولین استخراج شده از ریشه کاسنی نسبت به سایر انواع پریبیوتیک نظیر الیگوفروکتوز زنجیره طولانی‌تری داشته و آهسته‌تر تخمیر می‌شود. بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها ترجیحاً الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم با درجه پلیمریزاسیون کمتر را مورد مصرف قرار می‌دهند (۱۷).

در مطالعه ای توسط Askarian و همکاران (۲۰۰۷) حضور باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان پریبیوتیک در دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایران (*Acipenser persicus*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج باکتریایی در محیط کشت TSA و MRS تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی نشان داد که *Lactobacillus sp.* از مری، معده و روده بزرگ فیل ماهی تحت شرایط هوازی جدا شد. این سویه نیز تحت شرایط بی‌هوازی علاوه بر بخش‌های مذکور، از روده کوچک نیز جدا شد. همچنین در بین گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک، سویه *Enterococcus sp.* فقط از روده بزرگ و آن هم تحت شرایط هوازی جدا شد و یک فرآورده باکتریایی را تحت عنوان Belugatex® به عنوان پریبیوتیک معرفی کردند (۱). همچنین این محققین طی بررسی روی باکتری‌های اسید لاکتیک در فیل ماهی و تاسماهی ایران نتیجه‌گیری کردند که کلنی قابل شمارش باکتریایی در دو گونه مذکور مشابه نیستند و در فیل ماهی نسبت به تاسماهی ایران واحد شمارش کلنی بطور معنی‌داری بیشتر بود. در این مطالعه، دو گونه از باکتری‌های اسید لاکتیک شامل *Enterococcus seriolicida* و *Leuconostoc mesenteroides* از

کارایی تولید در فیل ماهی پرورشی ندارند و این نوع پریبیوتیک نمی‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی فیل ماهی باشد. بنابراین بکارگیری سایر پریبیوتیک‌ها نظیر لیگوفروکتوز و همچنین اینولین در ترکیب با سایر مکمل‌های غذایی میکروبی نظیر پریبیوتیک‌ها که در اصلاح سین بیوتیک (*Synbiotic*) نامیده می‌شود، شاید بتواند در کارایی تولید فیل ماهی مؤثر واقع شود. سین بیوتیک‌ها ترکیبی از پریبیوتیک و پریبیوتیک هستند و احتمال می‌رود برای بهبود رشد و سلامتی ارگانیزم‌های آبی در پرورش متراکم مناسب باشند.

سپاسگزاری

از مدیر کل محترم وقت شیلات گلستان آقای دکتر جعفری، ریاست محترم کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی آقای مهندس علی محمدی و کارشناسان و پرسنل محترم زحمتکش آن مرکز به دلیل مساعدت و فراهم آوردن تسهیلات لازم در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

دستگاه گوارش تاسماهی ایران جدا شد. شمارش کلنی *Leuconostoc mesenteroides* بطور معنی‌داری بیشتر از *Enterococcus seriolicida* بود. همچنین *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus lactis* و *Streptococcus sp.* از دستگاه گوارش فیل ماهی جدا شد و بیشترین کلنی متعلق به *Lactobacillus curvatus* بود (۲). نتایج مطالعه حاضر نیز حضور باکتری‌های اسید لاکتیک در روده فیل ماهیان جوان پرورشی را تأیید می‌نماید.

Cerezuela و همکاران (۲۰۰۸) با بکارگیری اینولین به میزان ۰/۵ تا ۱ درصد جیره (۵ تا ۱۰ گرم در هر کیلوگرم جیره) ماهی سیم دریایی (*Spaus aurata*) گزارش کردند که اینولین نمی‌تواند محرک ایمنی مناسبی برای این گونه باشد (۳) که نتایج یافته این تحقیق را تأیید می‌نماید.

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح متفاوت پریبیوتیک اینولین قابلیت تأثیرگذاری بالایی بر

منابع

1. Askarian, F., and Kousha, A. 2007. Introduce of Belugatex® as natural probiotics isolated from Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). International Training Course on Fish Nutrition & Disease. Ghaemshahr, Islamic Azad University September 5th 2007. pp. 26. (Ghaemshahr, Iran).
2. Askarian, F., Kousha, A., Shenavar, A., RingØ, E., Bahmani, M., Khorshidi, K., and Matinfar, A., 2007. Isolated of lactic acid bacteria as probiotic from gastrointestinal tracts of Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). International Training Course on Fish Nutrition & Disease. Ghaemshahr, Islamic Azad University September 5th 2007. pp: 28. (Ghaemshahr, Iran).
3. Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, A., 2008. Effect of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Journal of Aquaculture. 24:663-668.
4. Fooks, L.J., and Gibson, G.R., 2002. Probiotic as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition, Suppl. 1: S39-S49.
5. Gibson, G.R., and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 125:1401-1412.
6. Gibson, G.R. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. British Journal of Nutrition, Suppl. 2: S209-S212.
7. Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., and Hoshino, T., 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Journal of Aquaculture. 234:335-346.
8. Kihara, M., and Sakata, T., 2001. Influence of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in a micro-scale batch culture. J. Comp. Physiol. B. 171: 441-447.

9. Mahious, A.S., and Ollevier, F., 2005. Probiotics and Prebiotics in Aquaculture: Review. 1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture-AAARC, P: 17-26 (Urmia, Iran).
10. Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., and Ollevier, F., 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture International*. 14: 219-229.
11. Makridis, P., Bergh, Q., Skjermo, J., and Vadstein, O., 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International* 9: 225-235.
12. Olsen, R.E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T.M., and RingØ, E., 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture Research*. 32: 931- 934.
13. Peter, H., and Sneath, A. 1986. *Bergeys manual of systematic Bacteriology*. Vol 2: 1104-1154.
14. Rengpipat, S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S., and Menasveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on survival and growth of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Aquaculture* 167: 301-313.
15. RingØ, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T.M., and Olsen, R.E. 2006. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) *Aquaculture Research*. 37: 891- 897.
16. Roberfroid, M.B. 1993. Dietary fiber, inulin, and oligofructose - A review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33: 103-148.
17. Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A., and Gibson, E.R. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*. 128: 11-19.
18. Sakata, T., Okabayashi, J., and Kakimoto, D., 1980b. Variation in the intestinal flora of tilapia reared in fresh and seawater. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 967-975.
19. Schley, P.D., and Field, C.J. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Brit. J. Nutr.* 87: 221-230.
20. Strøm, E., and RingØ, E. 1993. Changes in the bacterial composition of early developing cod (*Gadus morhua*), larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development* (ed. by B. Walther & H.J. Fyn), pp: 226-228.
21. Sugita, H., Tokuyama, K., and Deguchi, Y. 1985. The intestinal microflora of Carp (*Cyprinus carpio*), Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Tilapia (*Sarotherodon niloticus*). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51: 1325-1329.
22. Yoshimizu, M., Kimura, T., and Sakai, M. 1980. Microflora of the embryo and the fry of salmonids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 967-975.

Effect of dietary prebiotic inulin on production and intestinal microflora density of juvenile Beluga, *Huso huso*

*R. Akrami¹, A.M. Hajimoradloo², A. Matinfar³,
A.M. Abedian Kenari⁴ and R. Mazandarani⁵

¹Ph.D. Student, Science & Research Branch, Islamic Azad University, ²Dept. of Fisheries, Gorgan University Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran, ³Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran, ⁴Department of Fisheries, Tarbiat Modarres University, Noor, Iran, ⁵Department of Microbiology, Gorgan University Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran

Email : akrami202@yahoo.com

Abstract

Use of prebiotics, indigestible dietary ingredients that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth of and/or activating the metabolism of health-promoting bacteria in the intestinal tract, is a novel concept in aquaculture. Three replicate groups of fish (initially averaging weight and biomass were 16.14 ± 0.38 g and 821.58g, respectively in each group) were kept in 800L fiberglass tanks under homogenous condition and fed diets containing prebiotic inulin levels ranging from 1% to 3%. The basal diet was contained 3% cellulose. An 8-week feeding experiment was conducted to investigate the effect of different dietary prebiotic inulin on production and intestinal micro flora density of juvenile Beluga, *Huso huso*. The results of linear regression showed there was a negative relationship between production index and supplementation level of inulin. At the end of trial, the density of colony count, yeasts and moulds and lactobacillus count was decreased with supplementation level of inulin. The 1% inulin treatment showed an enhanced survival without any significance among treatments, and intestinal lactic acid bacteria (LAB) increased in this group in comparison with other groups. The experiment indicated that the prebiotic inulin didn't influence the increase of the production and it is not appropriate for supplementation in the diet of beluga.

Keywords: Inulin; Prebiotic; Intestinal microflora density; Production; Beluga