



تأثیر پلی بتا هیدروکسی بوتیرات (Poly- β -hydroxybutyrate) بر پارامترهای رشد، بقاء، ترکیب بدن و فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

ابراهیم حسین نجدگرمی^{۱*}، اشکان جعفری^۲، فریده بخشی^۳، رامین مناف فر^۴، رضوان الله کاظمی^۵، محمدعلی یزدانی ساداتی^۵

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه اژه، ازبیر ترکیه

۳- دانشجوی دکتری، تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۴- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۵- استادیار، گروه تکثیر و پرورش، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۴/۲۲

*نویسنده مسئول مقاله: e.gerami@urmia.ac.ir

چکیده

تأثیر ناپلی غنی شده با پلی‌بتا‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) در غلظت‌های صفر (کنترل)، ۰/۱، ۰/۳ و ۱ گرم در لیتر بر پارامترهای رشد، ترکیب بدن، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور میکروبی روده در لارو تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بررسی شد. نتایج بیانگر کاهش معنی‌دار میزان پارامترهای رشد ($P < 0/05$) لارو تغذیه شده با PHB بود. همچنین PHB منجر به افزایش میزان کل اسیدهای چرب اشباع و $n6$ و کاهش اسیدهای چرب تک غیر اشباع، $C18:3n3$ و $n3$ و $n3/n6$ بدن لاروها گردید. PHB فعالیت آنزیم‌های گوارشی را نیز تغییر داد، به‌طوری‌که پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی، توتال پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در تیمارهای PHB ثبت گردید. بررسی فلور میکروبی انتهای روده لاروها از طریق PCR-DGGE نشان داد که تعدادی از باندها در تیمار با پایین‌ترین رشد، دارای غالبیت کمتری نسبت به سایر تیمارها هستند. نتایج کلی نشان داد که PHB دارای تأثیرات منفی در این مرحله از تکامل تاسماهی ایرانی است و برای یافتن غلظت بهینه PHB در محیط غنی سازی، مطالعات بیشتری باید انجام شود.

کلید واژگان: پلی بتا هیدروکسی بوتیرات، تاس ماهی، فلور میکروبی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، متابولیسم چربی‌ها

مقدمه

صنعت آبی پروری یکی از بخش‌های مهم و فعال تولید غذاهای پروتئینی است که میزان تولیدات آن برای مصارف انسانی براساس آمار فائو در سال ۲۰۰۸، بالغ بر ۵۲/۵ میلیون تن بوده که عمده این تولیدات را ماهیان آب شیرین، سخت‌پوستان، نرم‌تنان و دیگر آبزیان تشکیل می‌دهند (FAO, 2009). در میان ماهیان پرورشی آب‌های شیرین، ماهیان خاویاری یکی از گونه‌های مهم و با ارزش اقتصادی هستند که در طول دهه‌های گذشته، تخریب زیستگاه‌های این دسته از ماهیان و همچنین صید بی‌رویه آنها باعث قرار گرفتن نام این ماهیان در فهرست گونه‌های در حال انقراض شده است (Gisbert & williot, 2009). تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، یکی از گونه‌های بومی و از مهم‌ترین ماهیان خاویاری سواحل ایرانی دریای خزر است که در حال حاضر بیش از ۸۰ درصد صید طبیعی این دریا را تشکیل می‌دهد (Moghim et al., 2005). این گونه با توجه به چرخه تولیدمثلی کوتاه خود نسبت به فیل‌ماهی و نیز مرغوبیت تخمک آن، کاندید مناسبی برای پرورش به‌منظور تولید خاویار است (Moghim et al., 2005). متأسفانه عدم تکثیر طبیعی این گونه در طول دهه‌های گذشته به‌علت تخریب رودخانه‌ها، باعث افزایش مرگ‌ومیر لاروها در مراحل اولیه تکامل، به‌علت حساسیت آنها به استرس‌های محیطی و انواع بیماری‌ها شده است (FAO, 2009).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد شیمیایی از روش‌های مرسوم برای مقابله با بیماری‌های باکتریایی در بخش آبی پروری است. با این حال ممنوعیت استفاده از

آنتی‌بیوتیک‌ها در هر دو بخش آبی پروری و دام، محققان را وادار به یافتن روش‌های جایگزین برای مبارزه و کنترل بیماری‌ها کرده است (De Schryver et., 2009). جایگزین‌های مختلفی برای آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی شده است که می‌توان به پری‌بیوتیک‌ها اشاره کرد که به‌وسیله میکروارگانیسم‌های خاصی در روده تخمیر شده و اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (Short chain fatty acids) را تولید می‌کنند. تأثیرات مثبت اسیدهای چرب کوتاه زنجیره یا اسیدهای آلی بر روی شاخص‌های رشد، سیستم ایمنی، بهبود شاخص‌های سلامتی روده و قابلیت هضم مواد مغذی در انسان و سایر جانداران در مطالعات مختلف ثابت شده است (Scheppach, 1994; Topping and Clifton, 2001; Mussatto and Mancilha, 2007). در بین اسیدهای چرب کوتاه زنجیره اسید بوتیریک به‌عنوان یک اسید آلی اهمیت زیادی دارد و ۷۰ درصد انرژی مورد نیاز سلول‌های دیواره روده را تأمین می‌کند (Roediger, 1980). همچنین این اسید آلی و نمک‌های آن بر روی شاخص‌های رشد و سیستم ایمنی (Piva et al., 2002; Guilloteau et al., 2009)، مورفولوژی روده (Hu and Guo, 2007) در جانداران تأثیرات مثبت می‌گذارد.

پلی بتا هیدروکسی بوتیرات (Poly-β-hydroxybutyrate) یک پلی‌مر طبیعی است که طیف وسیعی از باکتری‌ها در شرایط خاص (افزایش کربن محیط و کاهش نیتروژن) قادر به سنتز آن می‌باشند (Bonartseva et al., 2002). تجزیه این ماده به‌وسیله آنزیم‌های گوارشی و به‌ویژه فعالیت میکروبی در روده، باعث آزاد شدن بتا بوتیریک اسید می‌شود که دارای خواص مشابه آنچه برای

اسیدهای چرب کوتاه زنجیره توضیح داده شد، است (Defoirdt et al., 2009). افزایش میزان زنده‌مانی در آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) در مواجهه با باکتری (*Vibrio harveyi*) (Defoirdt and Halet, 2007; Van Cam et al., 2009)، افزایش شاخص‌های رشد و همچنین تغییر فلور میکروبی روده در بچه ماهیان سی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*)، لارو میگو (Macrobrychium rosenbergii) و بچه ماهیان تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) در مطالعات مختلف گزارش شده است (De Schryver et al., 2009; Nhan et al., 2010; Najdegerami et al., 2011). با توجه به مطالب بالا و همچنین برای افزایش دانش درباره کاربرد PHB در آبی‌پروری، طرحی با هدف بررسی تأثیرات استفاده از ناپلی آرتمیای غنی شده با PHB بر روی رشد، زنده‌مانی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور میکروبی روده در تغذیه لارو تاس‌ماهی ایرانی انجام گرفت.

مواد روش‌ها

تعداد ۲۴۰۰ لارو تاس‌ماهی ایرانی (Persian sturgeon) از مؤسسه بین‌المللی تحقیقات تاس‌ماهیان دریای خزر برای انجام این پژوهش و هشتکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه منتقل شدند. لاروها پس از طی مرحله خوابوشنای فعال، در حوضچه‌های فایبرگلاس ۸ لیتری با تراکم ۲۷ لارو در لیتر در ۴ تیمار غذایی با ۳ تکرار ذخیره‌سازی شدند. هر کدام از حوضچه‌های پلاستیکی با یکلولهمس متقلجریا نابافاکتورهای فیزیکیوشیمیایی مناسب درجه حرارت آب (۱۶ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۷ میلی‌گرم در لیتر) و pH (۷/۶) تغذیه شدند. رژیم‌وروری مورد استفاده در این طرح ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی

بود. لاروها به مدت ۵ روز در این حوضچه‌ها تا سازگاری کامل و شروع به مدت ۳ هفته، با ناپلی آرتمیا تغذیه شدند. در این نظر حلال‌روهای تاس‌ماهی ایرانی با ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا غنی شده با پلی بتا هیدروکسی بوتیرات (98% PHB, 2% poly-β-hydroxyvalerate,) (Goodfellow, Huntingdon, England)، ۴ بار در شبانه‌روز (۲۰:۰۰، ۱۶:۰۰، ۱۲:۰۰ و ۸:۰۰) در طول دوره هر تحقیقاتی تغذیه شدند. ناپلی‌های آرتمیا پس از چشیدن بر اساس روش‌های رایج، شمارش و با تراکم ۲۰۰ هزار ناپلی در لیتر به ظروف شیشه‌ای مخروطی برای غنی‌سازی می‌توانست منتقل شوند. میزان PHB مورد استفاده در محیط غنی‌سازی با توجه به نتایج تحقیقات (Najdegerami et al., 2013) و بررسی‌های مقدماتی، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۱

گرم در لیتر محیط غنی‌سازی در نظر گرفته شد که پس از شمارش ناپلی‌ها و انتقال آنها به ظروف شیشه‌ای، به ناپلی‌های ۲۰۰ سانتی‌نای با با این ماده غنی‌سازی شدند. پس از اتمام مدت زمان غنی‌سازی و جدا سازی ناپلی‌ها، تغذیه لاروهای تاس‌ماهی ایرانی بر اساس تعداد ۳/۳ ناپلی در لیتر در مراحل اولیه افزایش آن به ۵ ناپلی در لیتر با توجه به رشد لاروها انجام گرفت.

بررسی شاخص‌های رشد

برای بررسی شاخص‌های رشد، هر ۴ روز یکبار تعداد ۲۰ عدد لارو از هر تکرار به صورت تصادفی نمونه‌برداری می‌شد و پس از زیست‌سنجی نمونه‌ها، میزان ناپلی آرتمیا در ۴ روز بعدی محاسبه و وارد حوضچه می‌شد. میزان تلفات روزانه لاروها نیز با توجه به بررسی‌های روزانه ثبت می‌گردید. میزان متوسط وزن لاروها پس از ۳ هفته (Weight gain) و ضریب رشد ویژه (SGR) آنها با توجه به فرمول‌های زیر محاسبه شد (Najdegerami et al., 2013):

$$\text{Weight gain} = \text{final weight (mg)} - \text{initial weight (mg)}$$

$$SGR = 100 \times (\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / t$$

بررسی ترکیب بدنی

پس از ۳ هفته تغذیه با تیمارهای غذایی ترکیبی بدنی لاروهای باتوجه به روش های استاندارد (AOAC, 1997) بررسی شد. باتوجه به اندازه و تعداد ذخیره سازی آنها در حوضچه ها، امکان اندازه گیری نیتروژن در نتیجه محاسبه درصد پروتئین لاروها وجود نداشت. درصدد چربی ترکیبی بدنی لاروهای باتوجه به روش Folch و همکاران در سال ۱۹۵۷ که از سوی Way and Hanahan در سال ۱۹۶۴ اصلاح شده بود، انجام گرفت. پروفیل اسیدهای چرب لاروها به وسیله گاز کروماتوگرافی انجام شد و FAME (Fatty acid methyl ester) با استفاده از روش Lepage and Roy در سال ۱۹۸۴ انجام گرفت.

اندازه گیری آنزیم های گوارشی

در انتهای دوره پرورشی و قطع غذای لاروها برای ۲۴ ساعت، تعداد ۳ لارو از هر تکرار، در کل ۱۲ لارو از هر تیمار برای بررسی فعالیت آنزیم های گوارشی نمونه برداری شد. هر کدام از لاروها در یک بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با نسبت ۹ به یک دستگاه هموژنایزر (Heidolph, Instruments Switzerland) هموژنایز شدند. باتوجه به شرایط خاص آنزیم های گوارشی تمام مراحل تهیه محلول آنزیم های گوارشی از هموژنایز کردن تا آنالیز فیوژ در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. محلول هموژنایز شده با سرعت ۲۰۰۰۰ برای ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی پس از جمع آوری به فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

برای اندازه گیری توتال پروتئین از روش Walter و همکاران در سال ۱۹۸۴، پسین از روش Zambonino and Cahu در سال ۱۹۹۴، آنزیم آمیلاز از روش Metais and Bieth در سال ۱۹۶۸، آنزیم لیپاز با روش Iijima در سال ۱۹۹۴ و برای اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش Bessy و همکاران در سال ۱۹۴۶ استفاده شد.

میزان پروتئین کلدرو هموژنات بر اساس روش Bradford در سال ۱۹۷۶ با استفاده از آلبومین گاو به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم های آنزیم ها بر اساس فعالیت آنزیم به ازای میلی گرم پروتئین باشد (U/mg protein).

بررسی فلور میکروبی روده

پس از اتمام آزمایش ۳ لارو از هر تکرار، در محلول ۲ میلی لیتر در لیتر 2-phenoxyethanol بیهوش و سپس کل سیستم گوارش خارج و پس از مخلوط کردن در دمای ۲۰-، برای استخراج DNA نگهداری شد. استخراج DNA بر اساس روش Boon et al., 2003 انجام شد و PCR بر روی ژن 16S rRNA و با استفاده از پرایمر 338f و 518r انجام گرفت. همچنین DGGE با استفاده از یک دستگاه Bio-Rad و با گرادیانت ژل ۴۰ و ۶۰ و با ولتاژ ۳۸ و درجه حرارت ۶۰ درجه به مدت ۱۶ ساعت انجام شد.

محاسبات آماری

داده های به دست آمده در این نظر حیطه از انجام هر گونه آنالیز آماری از نظر همسایه نمودن و آنالیز آنالیز آماری شدند. سپس بر اساس روش های موجود، آنالیز واریانس یکطرفه در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ (SPSS Inc., IL, USA) بر روی داده ها اجرا شد و تست دانکن (Duncan, s multiple range) برای تعیین معنادار بودن میانگین ها، در سطح حاطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

تأثیر PHB بر شاخص‌های رشد

نتایج زیست‌سنجی لاروها در انتهای دوره پرورش نشان داد که استفاده از ناپلی غنی‌شده با PHB با غلظت‌های مورد استفاده، تأثیر منفی در رشد و میزان ضریب رشد ویژه لاروها دارد. چنانچه در جدول ۱ دیده می‌شود PHB میزان افزایش رشد لاروها و ضریب رشد ویژه آنها را در تیمارهای دوم تا چهارم به‌طور معناداری ($p < 0/05$) کاهش

داده و پایین‌ترین میزان این شاخص‌ها در تیمار سوم مشاهده شد.

همچنین بررسی نتایج طرح نشان داد که استفاده از این ماده، باعث افزایش معنادار تلفات در تیمارهایی می‌شود که در آنها از ناپلی غنی‌شده از PHB استفاده شده بود (جدول ۱). پایین‌ترین میزان زنده‌مانی در تیمار سوم دیده شد که با تیمارهای اول و چهارم اختلاف معنادار داشت ($p < 0/05$).

جدول ۱ تأثیر ناپلی غنی‌شده با غلظت‌های مختلف PHB بر روی شاخص‌های رشد در لارو نرس تاس‌ماهی ایرانی

PHB ۱	PHB ۰/۳	PHB ۰/۱	Control	
$80/4 \pm 6/0^b$	$62/1 \pm 4/6^c$	$71/1 \pm 7/3^{bc}$	$115/6 \pm 11/1^a$	افزایش وزن بدن
$0/04 \pm 0/0^b$	$0/024 \pm 0/0^c$	$0/034 \pm 0/0^{bc}$	$0/057 \pm 0/0^a$	ضریب رشد ویژه
$61/8 \pm 6/1^a$	$46/2 \pm 7/5^b$	$59/2 \pm 3/2^{bc}$	$71/5 \pm 2/9^a$	درصد بازماندگی

• داده‌ها در هر ردیف با حروف مختلف انگلیسی دارای اختلاف معنادار هستند ($p < 0/05$).

تأثیر PHB بر روی ترکیب بدنی لاروها

یکی از اهداف طرح بررسی تأثیر این ماده بر ترکیب بدنی لاروها بوده که تأثیرات آن بر روی پروفیل اسیدهای چرب لاروها بررسی شد که نتایج آن در جدول ۲ دیده می‌شود. نتایج طرح نشان داد که PHB تأثیر معناداری بر روی میزان اسیدهای چرب اشباع در بافت بدنی لارو تاس‌ماهی ایرانی دارد. میزان کل اسیدهای چرب اشباع (Saturated fatty acid) در تیمارهای غذایی دارای اختلاف معنادار بود و نتایج نشان داد که تیمارهایی که از PHB استفاده کرده بودند، دارای مقادیر بالایی از این گروه اسیدهای چرب بودند که اختلاف معناداری با تیمار کنترل داشتند ($p < 0/05$) و کمترین میزان آن در این تیمار کنترل مشاهده شد.

تأثیرات استفاده از PHB بر روی ترکیب اسیدهای چرب تک غیراشباع (Monounsaturated fatty acid) در

بافت لاروهای تاس‌ماهی ایرانی بررسی شد و نتایج نشان داد که استفاده از این ماده می‌تواند ترکیب اسیدهای چرب تک غیراشباع را در لاروها تغییر دهد. بالاترین مقادیر کل اسیدهای چرب تک غیراشباع در تیمارهای اول و چهارم مشاهده شد که دارای اختلاف معنادار با تیمارهای دوم و سوم بودند ($p < 0/05$) و کمترین میزان کل این اسیدهای چرب در تیمار سوم مشاهده شد. بالاترین مقادیر اسید لینولئیک C18:2n6 در بین تیمارهای غذایی، در تیمار سوم دیده شد که با تیمار چهارم اختلاف معنادار داشت ($p < 0/05$). همچنین بالاترین میزان اسید چرب آراشیدونیک اسید C20:4n6 در بین تیمارهای غذایی تغذیه شده با PHB دیده شد. PHB میزان کل اسیدهای چرب n6 را در تیمار سوم افزایش داد که با تیمار دوم اختلاف معنادار نداشت ($p > 0/05$). همچنین نتایج طرح نشان داد که لاروهای تغذیه شده با مقادیر مختلف PHB در محیط

غنی‌سازی، دارای میزان پایینی از اسید چرب لینولنیک اسید C18:3n3 هستند و کمترین مقدار آن در تیمار سوم مشاهده شد که با تیمارهای اول و چهارم دارای اختلاف معنادار بود ($p < 0.05$). در مورد اسیدهای چرب EPA، DHA و همچنین میزان کل اسیدهای چرب n3 اختلاف

جدول ۲ پروفیل اسیدهای چرب لارو تاس‌ماهی ایرانی در تیمارهای مختلف غذایی پس از دوره پرورش (میلی گرم اسید چرب در

گرم چربی)

PHB ۱	PHB ۰/۳	PHB ۰/۱	Control	
30.4 ± 2^a	26.9 ± 6.2^a	33.3 ± 1.8^a	16.9 ± 0.8^b	Total saturated
32.1 ± 3.2^a	20.9 ± 4.1^b	25.1 ± 0.4^b	30.7 ± 0.1^a	Total monounsaturated
4.1 ± 0.8^b	6.2 ± 1.6^a	4.7 ± 0.6^{ab}	4.4 ± 0.4^{ab}	C18 :2n6
3.0 ± 0.6^{ab}	3.8 ± 0.2^a	3.6 ± 0.3^a	2.5 ± 0.4^b	C20 :4n6
7.5 ± 1.4^c	9.6 ± 0.6^a	8.4 ± 0.3^b	7.2 ± 0.2^c	Total n6
9.0 ± 1.8^{ab}	6.5 ± 1.3^c	7.4 ± 0.1^{bc}	10.7 ± 0.8^a	C18 :3n3
3.8 ± 0.6	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.6	4.1 ± 0.0	C20 :5n3 (EPA)
8.5 ± 1.7	10.0 ± 1.5	10.4 ± 0.5	7.8 ± 1.2	C22 :6n3 (DHA)
22.5 ± 1.1	20.5 ± 4.2	23.3 ± 0.8	24 ± 0.4	Total n3
3.0 ± 0.1^a	2.1 ± 0.5^b	2.7 ± 0.0^a	3.3 ± 0.1^a	n3 / n6

داده‌ها در هر ردیف با حروف مختلف انگلیسی دارای اختلاف معنادار هستند ($p < 0.05$).

تأثیر PHB بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی

تأثیرات استفاده از ناپلی غنی‌شده با غلظت‌های مختلف PHB در محیط غنی‌سازی بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی در لارو تازه هچ شده تاس‌ماهی ایرانی بررسی شد و نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده است. چنانچه در این جدول مشاهده می‌شود، تأثیر PHB بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی معنادار بوده و این ماده فعالیت این آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار داده است. بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت توتال پروتئاز در بین تیمارهای غذایی به‌ترتیب در تیمار کنترل و تیمار سوم مشاهده شد که دارای اختلاف معنادار با یکدیگر بودند ($p > 0.05$). اختلاف

معنادار در بین تیمارهای غذایی در مورد فعالیت آنزیم پپسین مشاهده نشد و PHB فعالیت این آنزیم را در لارو تاس‌ماهی ایرانی تغییر نداد ($p > 0.05$). بالاترین میزان فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز در تیمار کنترل مشاهده شد که با تیمار سوم و چهارم دارای اختلاف معنادار نبود. پایین‌ترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار دوم مشاهده شد که با تیمارهای کنترل و چهارم دارای اختلاف معنادار بود ($p < 0.05$).

بالاترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای کنترل و چهارم مشاهده شد که با تیمار سوم، که دارای کمترین میزان فعالیت این آنزیم بود، دارای اختلاف معنادار بودند

($p < 0/05$). آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیم‌هایی است که به‌وسیله سلول‌های جداره روده و برخی از بافت‌ها ترشح می‌شود. نتایج این طرح نشان داد که ترشح این آنزیم تحت تأثیر استفاده از ناپلی غنی‌شده با PHB قرار گرفته و میزان ترشح آن در تیمارهای سوم و چهارم کمتر از تیمار کنترل بوده و اختلاف معنادار بین آنها و کنترل دیده می‌شود ($p < 0/05$).

جدول ۳ فعالیت ویژه آنزیم‌های گوارشی لارو تاس‌ماهی ایرانی بعد از تغذیه با تیمارهای غذایی

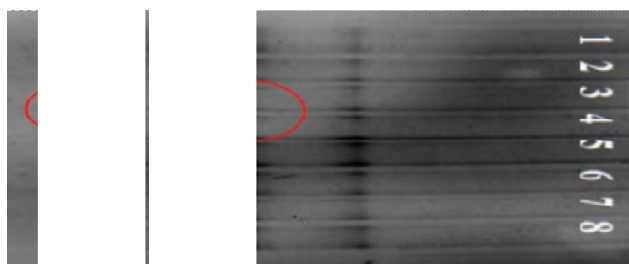
PHB	PHB ۰/۳	PHB ۰/۸	Control	
$8/0 \pm 0/7^{ab}$	$6/2 \pm 1/7^b$	$6/1 \pm 0/5^b$	$8/8 \pm 1/7^a$	پروتئاز کل
$7/7 \pm 3/8$	$6/4 \pm 1/3$	$4/9 \pm 2/6$	$8/0 \pm 2/5$	پسین
$3/1 \pm 0/4^a$	$2/4 \pm 0/3^{ab}$	$1/8 \pm 0/3^b$	$3/3 \pm 0/7^a$	آمیلاز
$0/11 \pm 0/04^a$	$0/05 \pm 0/01^b$	$0/08 \pm 0/01^{ab}$	$0/13 \pm 0/03^a$	لیپاز
$0/00043 \pm 0/000^b$	$0/00037 \pm 0/000^b$	$0/00063 \pm 0/000^{ab}$	$0/0013 \pm 0/000^a$	آلکالین فسفاتاز

• فعالیت ویژه آنزیم‌های گوارشی بر اساس: توتال پروتئاز و پسین بر اساس $\text{mmol of tyrosine released} / \text{min} / \text{mg protein}$ / آمیلاز $\text{mg starch hydrolyzed} / \text{min} / \text{mg protein}$ / لیپاز $\text{mmole of substrate hydrolyzed} / \text{minute} / \text{mg protein}$ / آلکالین فسفاتاز $\text{mmol substrate released} / \text{min} / \text{mg protein}$ at 37°C داده‌ها بر اساس $\text{average} \pm \text{SEM}$ گزارش شدند و داده‌هایی با حروف مختلف در هر ردیف دارای اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند.

تأثیر PHB بر روی فلور میکروبی روده

تأثیرات استفاده از PHB در تغذیه لارو تاس‌ماهی ایرانی بر روی فلور باکتریایی انتهای روده از نظر مولکولی (PCR-DGGE) بررسی شد و نتایج طرح نشان داد که از نظر میزان تنوع میکروبی تغییر خاصی در باکتری‌های انتهای روده دیده نمی‌شود، بنابراین محاسبه میزان غنای میکروبی (Rang weighted richness) و همچنین اختلافات آنها با توجه به نتایج PCR-DGGE امکان‌پذیر نیست. چنانچه در شکل ۱ دیده می‌شود Lane‌های ۱ و ۲ تیمار دوم (۰/۱ گرم PHB)، Lane‌های

۳ و ۴ تیمار سوم (۰/۳ گرم PHB)، Lane‌های ۵ و ۶ تیمار چهارم (۱ گرم PHB) و Lane‌های ۷ و ۸ تیمار کنترل هستند که با توجه به الگوی باندهای این تصویر، تعدادی از باندها در تیمار سوم در مقایسه با سایر تیمارها دارای غالبیت کمتری هستند که به نظر می‌رسد استفاده از PHB در این سطح باعث کاهش تراکم باکتری‌های مورد نظر شده است (باندهای مورد نظر با دایره‌های قرمز در شکل مشخص شدند). نکته جالب در این بحث در این است که کمترین رشد و بقا در این تیمار دیده شده است.



شکل ۱ الگوی باند DGGE بر پایه تکثیر ناحیه 16S در DNA باکتری‌های انتهای روده در لارو تاس‌ماهی ایرانی که با تیمارهای مختلف PHB تغذیه شده بودند.

بحث

نتایج مطالعات انجام شده در رابطه با استفاده از PHB در تغذیه مرحله لاروی آبزیان متناقض است. استفاده از ناپلی غنی شده با PHB (۶ گرم در لیتر محیط غنی سازی) باعث افزایش معنادار شاخص‌های رشد در لارو میگوی آب شیرین شد (Nahn et al., 2010). در حالی که نتایج مطالعات Najdegerami و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی لارو تاس‌ماهی سیبری نشان داد که استفاده از PHB (۶ گرم در لیتر محیط غنی سازی)، میزان رشد این لاروها را به طور معناداری کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر و ادامه مطالعه قبلی (Najdegerami et al., 2013)، میزان PHB در محیط غنی سازی به کمتر از ۱۰ درصد مطالعه قبلی کاهش داده شد و با این حال میزان شاخص‌های رشد در لارو تاس‌ماهی ایرانی به طور معناداری کاهش یافت. دلیل تأثیر منفی PHB بر روی لاروهای تاس‌ماهی سیبری و ایرانی دقیقاً مشخص نیست. به نظر می‌رسد میزان PHB حتی در مقادیر پایین (۰/۱ و ۰/۳ گرم در لیتر) برای تغذیه لاروها در این مرحله از تغذیه مناسب نبوده و فلور میکروبی روده و آنزیم‌های گوارشی آنها در این مرحله قادر به تجزیه این ماده و تبدیل آن به بتا بوتیریک اسید نمی‌باشند. فلور میکروبی روده و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (بوتیرات، استات و پروبیونات)، نقش اساسی در

متابولیسم چربی‌ها در سیستم گوارشی روده بازی می‌کنند (Delzenne and Williams, 2002; Delzenne et al., 2008). افزایش غلظت هر کدام از اسیدهای چرب کوتاه زنجیره دارای عملکرد خاص خود است. برای مثال افزایش اسید آلی (اسید چرب کوتاه زنجیره) پروبیونات در روده، میزان فعالیت آنزیم‌های لیپوژنیک مانند استیل کوآنزیم کربوکسیلاز، ATP citrate Lyse و Fatty acid synthase را کاهش می‌دهد در حالی که افزایش میزان اسید آلی استات در روده، مسیری Cholesterogenesis و Lipogenesis را فعال می‌کند (Delzenne and Kok, 1999; Delzenne and Williams, 2002). همچنین اسید آلی استات در سنتز اسیدهای چرب بلند زنجیره و بتا هیدروکسی بوتیرات به کار می‌رود (Reilly and Rombeau, 1993). نتایج آزمایش‌های مربوط به تأثیر PHB بر روی پروفیل اسیدهای چرب در لارو تاس‌ماهی سیبری و تاس‌ماهی ایرانی به وسیله Najdegerami و همکاران در سال ۲۰۱۳ و این آزمایش متناقض بود. استفاده از PHB در لارو تاس‌ماهی سیبری باعث کاهش معنادار اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع، اسیدهای چرب n6، n3 و EPA نسبت به تیمار کنترل می‌شود. برخلاف نتایج به دست آمده در تاس‌ماهی سیبری، استفاده از مقادیر پایین PHB در تاس‌ماهی ایرانی، باعث تغییر پروفیل اسیدهای چرب، برعکس آنچه

در تاس ماهی سیبری به دست آمد، می شود؛ یعنی PHB باعث افزایش معنادار پروفیل اسیدهای چرب ذکر شده در بالا می شود. به نظر می رسد مکانیسم اثر اسیدهای چرب کوتاه زنجیره و اثر آنها، با توجه به غلظت متفاوت PHB در دو آزمایش و همچنین محتوای فلور میکروبی آنها، از جمله عوامل تأثیرگذار در تغییر پروفیل اسیدهای چرب در دو گونه تاس ماهی سیبری و ایرانی بوده است. ولی برای اظهار نظر و نتیجه گیری دقیق، استفاده از PHB نشاندار (C14) می تواند در ردیابی مسیر متابولیسمی این ماده در آبزیان کمک زیادی کند.

فعالیت آنزیم های گوارشی به عنوان یک شاخص گوارشی و وضعیت تغذیه ای در لارو ماهیان مطرح است (Ueberschar, 1988) و هر گونه دستکاری در جیره ماهیان باعث تغییرات فوری در فعالیت آنزیم های گوارشی موجود می شود (Mohapatra et al., 2001). تأثیرات مثبت اسیدهای چرب کوتاه زنجیره بر روی فعالیت آنزیم های گوارشی در مطالعات مختلف ثابت شده است (Dibner and Buttin, 2002; Guilloteau et al., 2010). در میان آنزیم های گوارشی، بررسی فعالیت آنزیم های پانکراس (آمیلاز، لیپاز و تریپسین) به طور عمومی به عنوان یک شاخص عملکرد و تکامل سیستم گوارشی مطرح بوده است (Shan et al., 2008). در بررسی تأثیر PHB بر روی فعالیت آنزیم های گوارشی در لارو تاس ماهی سیبری نتایج نشان داد که استفاده از PHB به میزان ۶ گرم در لیتر به ترتیب باعث افزایش و کاهش معنادار پپسین و آمیلاز می شود، ولی بر روی سایر آنزیم های گوارشی (توتال پروتئاز، تریپسین، لیپاز، آلکالین فسفاتاز و آمینوپپتیداز) تأثیر معنادار نمی گذارد. در این آزمایش نتایج نشان داد که استفاده از PHB به ویژه به میزان 0.3 گرم در لیتر، فعالیت آنزیم های گوارشی توتال پروتئاز، آمیلاز، لیپاز و آلکالین

پروتئاز را به طور معناداری کاهش می دهد. تأثیر منفی PHB بر روی آنزیم های گوارشی دقیقاً معلوم نیست. به نظر می رسد کاهش آنزیم های گوارشی به ویژه توتال پروتئاز می تواند به دلیل کاهش دریافت مواد مغذی (ناپلی ها) از نظر وزنی نسبت به تیمار کنترل باشد. نتایج متفاوت تأثیر این ماده در تاس ماهی سیبری و تاس ماهی ایرانی بر روی آنزیم های گوارشی با تفاوت غلظت این ماده در محیط غنی سازی در دو آزمایش یاد شده قابل تفسیر است.

به طور کلی PHB از طریق تقویت باکتری هایی که می توانند این ماده را تجزیه کنند، باعث تغییر فلور میکروبی روده ماهی می شود. تجزیه این ماده در روده باعث تولید بتا هیدروکسی بوتیریک اسید می شود که به عنوان سوسترا مورد استفاده باکتری های خاصی قرار می گیرد که در ترکیب فلور میکروبی روده تغییراتی ایجاد می کند (Defroidt et al., 2009). این مسئله نشان می دهد که تغییر در فلور میکروبی روده نتیجه تجزیه PHB است (De Schryver et al., 2009). در رابطه با این مسئله Najdegerami و همکاران در سال ۲۰۱۱ و ۲۰۱۳ از PHB به عنوان یک عامل کنترل میکروبی در پرورش لارو و بچه ماهی تاس ماهی سیبری استفاده کردند. نتایج طرح نشان داد که استفاده از این ماده در غلظت ۲ درصد در جیره غذایی بچه ماهیان، علاوه بر تقویت رشد نسبت به سایر تیمارها، باعث تقویت برخی از باکتری ها می شود که آنالیزهای مولکولی نشان داد که این باکتری ها از گونه های *Ruminococcaceae* SP. و *Bacillus* sp. می باشند. لازم به ذکر است که در برخی از مطالعات خاصیت پروبیوتیکی این گونه ها گزارش شده است (Saki et al., 1995; Rengpipt et al., 1998). همچنین در ادامه، نتایج تحقیقات آنها نشان داد که استفاده از این ماده در لارو تاس ماهی سیبری به میزان ۶ گرم در لیتر محیط غنی سازی، باعث

protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

De Schryver, P. Sinha, A. Kunwar, P. Baruah, K. Verstraete, W. Boon, N. 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*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1535-1541.

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.

Defoirdt, T. Boon, N. Sorgeloos, P. Verstraete, W. and Bossier, P. 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27, 680-685.

Delzenne, N. and Kok, N. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *Journal of Nutrition*, 129, 1467S-1470S.

Delzenne, N. and Williams, C. 2002. Prebiotics and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 13, 61-67.

Delzenne, N. Cani, P. and Neyrinck, A. 2008. Prebiotics and lipid metabolism. CRC press, ISBN: 978-0-8493-8182-9, Pp 218.

Dibner, J. and Buttin, P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*, 11, 453-463.

FAO, 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. FAO fishery and aquaculture department. Rome, Italy p. 18.

Folch, J. Lees, M. and Sloane-Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Gisbert, E. and Williot, P. 2002. Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon. *Journal of Fish Biology*, 60, 1071-1092.

Guilloteau, P. Zabielski, R. David, J. Blum, J. Morisset, J. Biernat, M. Wolinski, J. Laubit, D. and Hamon, Y. 2009. Sodium-butyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young

کاهش تراکم گونه‌های خاصی از باکتری‌ها می‌شود. کمترین میزان افزایش رشد پس از یک ماه در همین تیمار PHB مشاهده شد که به نظر می‌رسد کاهش تراکم این گونه از باکتری‌ها در روده لارو تاس‌ماهی سیبری، یکی از عوامل تأثیرگذار در این مسئله باشد. نتیجه تأثیر PHB بر روی فلور میکروبی روده تاس‌ماهی ایرانی در این تحقیق مشابه نتایج به دست آمده در تحقیقات Najdegerami و همکاران در سال ۲۰۱۳ است. چنانچه در تصویر PCR-DGGE فلور میکروبی روده در بخش نتایج مشاهده می‌شود، تراکم تعدادی از باکتری‌ها در روده لاروها در تیمار سوم (۰/۳ گرم در لیتر PHB در محیط غنی‌سازی)، که دارای کمترین میزان رشد بودند، کاهش پیدا کرده است که این عامل می‌تواند از عوامل کاهش رشد در لاروها در این تیمار باشد. شناسایی این باکتری‌ها و بررسی عملکرد آنها در لاروها، می‌تواند از تحقیقاتی باشد که باید در آینده برای تکمیل این پروژه انجام گیرد.

با توجه به تحقیق انجام شده و همچنین سایر نتایج، در رابطه با استفاده از PHB در تغذیه لارو ماهیان می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از این ماده با مقادیر آزمایش شده در این مرحله تکاملی، تأثیر منفی بر روی فعالیت‌های تغذیه‌ای و آنزیمی لاروها می‌گذارد. بررسی‌های بیشتر برای علل دقیق این تأثیرات می‌تواند از اهداف آینده تحقیقات در این زمینه باشد.

منابع

Bessey, O.A. Lowry, O.H. and Brock, M.J. 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*. 164, 321-329.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- nauplii enriched with poly-b-hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests, *Aquaculture Research*, 1-12
- Nhan, D. 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.
- Piva, A. Prandini, A. Fiorentini, L. Morlacchini, M. Galvano, F. and Luchansky, J. 2002.** Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 80, 670-680.
- Rengpipat, S. Phianphak, W. Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998.** Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) survival and growth. *Aquaculture*, 167, 301-313.
- Reilly, J.K. and Rombeau, J.L. 1993.** Metabolism and potential clinical applications of short-chain fatty acids. *Clinical Nutrition*, 12, 97-105.
- Roediger, W. 1980.** Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21, 793-798.
- Sakai, M. Yoshida, T. Astuta, S. and Kobayashi, M. 1995.** Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria. *Journal of Fish Diseases*, 18, 187-190.
- Scheppach, W. 1994.** Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35, S35-S38.
- Shan, X. Xiao, Z. Huang, W. and Dou, S. 2008.** Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. *Aquaculture*, 281, 70-76.
- Topping, D. and Clifton, P. 2001.** Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81, 1031-1064.
- Ueberschar, B. 1988.** Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforschung-Reports on Marine Research*, 32, 144-154.
- calves. *Journal of Dairy Science*, 92, 1038-1049.
- Guilloteau, P. Martin, L. Eeckhaut, V. Ducatelle, R. Zabielski, R. and Van Immerseel, F. 2010.** From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23, 366-384.
- Hu, Z. and Guo, Y. 2007.** Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive functions and gut flora in chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 132, 240-249.
- Iijima, N. Tanaka, S. and Ota, Y. 1998.** Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 18, 59-69.
- Lepage, G. and Roy, C.C. 1984.** Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25, 1391-1396.
- Métais, P. and Bieth, J. 1968.** Détermination de l'amylase par une microtechnique. *Annales de Biologie Clinique*, 26, 133-142.
- Mohapatra, S. Chakraborty, T. Prusty, A. Paniprasad, K. and Mohanta, K. 2011.** Use of different microbial probiotics in the diet of rohu (*Labeo rohita*) fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18, 1-11.
- Moghim, M. Fazli, H. and Khoshbavar, H. 2005.** Sturgeon fingerlings by catch in fishing company in Mzandaran province. Iranian journal of fishery science, Vol. 1, Pp 183-190, Abstract in english
- Mussatto, S. and Mancilha, I. 2007.** Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68, 587-597.
- Najdegerami, E. 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. *Microbiology ecology*, 79, 25-33
- Najdegerami, E.H. Baruah, K. Shiri, A. Rekecki, A. Van den Broeck, W. Sorgeloos, P. Boon N. Bossier, P. and De Schryver, P. 2013.** Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed Artemia

Van Cam, D.T. Hao, N.V. 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.

Ways, P. and Hanahan, D. 1964. Characterizations and quantification of red cell lipids in normal man. *Journal of Lipid Research*, 5, 318-328.

Zambonino, J.L. and Cahu, C.L. 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*, **109**, 209-212.



Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth performance, body composition, digestive enzymes activity, gut microbial community of the hatchling Persian sturgeon (*Acipenser persicus*)

Ebrahim H. Najdegerami^{1*}, Ashkan Jafari², Farideh Bakhshi³, Ramin Manaffar⁴, Rezvanollah Kazemi⁵, Mohammad A. Yazdani⁵

1- Assistant Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

2- MSc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries, EgeUniversity, Izmir, Turkey

3- Ph.D Student, Department of Fisheries, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

4- Assistant Prof., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, UrmiaUniversity, Urmia, Iran.

5- Assistant Prof., International sturgeon Research Institute, Rasht, Iran

*Corresponding author: e.gerami@urmia.ac.ir

Abstract

Effects of feeding *Artemianauplii* enriched with PHB (0, 0.1, 0.3 and 1 g/L concentration) on the growth performance, body composition, digestive enzyme activity and hindgut bacterial community in the Persian sturgeon hatchlings were investigated. PHB treatment significantly ($p \leq 0.05$) decreased growth performances of the hatchlings. The PHB also significantly increased the total saturated fatty acids (SFA) and n6, but decreased the total MUFAs, C18:3n3, n3 and n3/n6. PHB also altered digestive enzyme by significantly decreasing the total protease, amylase, and lipase. Based on molecular analysis, PHB changed the microbial community in the hindgut of the hatchlings where less dominant bands were observed. Our results show that PHB has negative effects on the Persian sturgeon hatchlings. Further studies are needed to find out the optimal concentration of PHB to apply in early larval rearing of sturgeon.

Keywords: Poly- β -hydroxybutyrate, Sturgeon, Microbial community, Digestive enzymes, Lipid metabolism