فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۱- ۱۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

بررسی ترکیب بهینه سین‌بیوتیکی بین باکتری پروبیوتیکی *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک‌های اینولین، الیگوفروکتوز و زایلوالیگوساکارید

سید حسین حسینی فر: استادیار شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، hoseinifar@ut.ac.ir
علیرضا میرواقفی: دانشیار شیلات، دانشگاه تهران، ایران، vaghefi.nrf@ut.ac.ir *
محمد علی آموزگار: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir **
دانیل مریفیلد: استادیار تغذیه آبزیان، دانشگاه پلی‌موس، انگلستان، daniel.merrifield@plymoth.ac.uk

چکیده

مقدمه: استفاده هم‌زمان گونه‌های پروبیوتیکی به همراه پربیوتیک‌های مناسب (سین‌بیوتیک) به عنوان سوبسترا برای افزایش غالبیت و رشد پایدار باکتری‌های پروبیوتیکی، به علت ناتوانی گونه‌های پروبیوتیکی برای تشکیل کلونی پایدار و حفظ غالبیت در میکروبیوتای روده‌ای آبزیان پیشنهاد شده است. هدف از این مطالعه، بررسی ترکیب‌های مختلف سین‌بیوتیکی باکتری پروبیوتیکی *Pediococcus acidilactici* با پربیوتیک‌های اینولین، الیگوفروکتوز، زایلوالیگوساکارید به منظور معرفی بهترین ترکیب سین‌بیوتیکی بود.

مواد و روش‌ها: باکتری *P. acidilactici* در محیط‌های حاوی پربیوتیک‌های اینولین، الیگوفروکتوز و زایلوالیگوساکارید رشد داده شد. میزان رشد باکتری‌ها و اسیدیته نهایی محیط تحت شرایط کشت بی هوازی بررسی شد. به‌علاوه تعیین کمی مقادیر اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (بوتریک، پروپیونیک و استیک اسید) تولید شده در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان رشد باکتری *P. acidilactici* در ترکیب سین‌بیوتیکی با زایلوالیگوساکارید به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارهای سین‌بیوتیکی و تیمار شاهد فاقد پربیوتیک بود (P value <0.05). سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر رشد باکتری نداشتند (P value >0.05). همچنین اسیدیته نهایی محیط نیز در تیمار *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید کاهش معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد (P value <0.05). بیش‌ترین و کم‌ترین اسید چرب زنجیره کوتاه تولیدی در همه تیمارهای سین‌بیوتیکی به ترتیب پروپیونیک و استیک اسید بودند. اگرچه مقادیر تولید شده استیک و پروپیوتیک اسید تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای سین‌بیوتیکی نشان نداد (P value > 0.05)، بیشترین میزان بوتریک اسید تولید شده مربوط به تیمار *P. acidilactici* با زایلو الیگوساکارید بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (P value <0.05).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده همزمان از باکتری پروبیوتیکی *P. acidilactici* و زایلوالیگوساکارید، می‌تواند به عنوان ترکیب سین بیوتیکی برای آبزیان بهینه مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، *P. acidilactici*، سین‌بیوتیک، رشد، اسید چرب زنجیره کوتاه

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

** آزمایشگاه اکستریموفیل، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

تا به امروز مهم‌ترین پربیوتیک‌های مورد مطالعه در مطالعات انسانی و دامی فروکتان‌های بدست آمده از ریشه گیاه کاسنی، اینولین و الیگوفروکتوز بوده اند (۱ و ۲). علاوه براین دو مورد، سایر الیگوساکاریدها مانند زایلوالیگوساکارید بدست آمده از مواد غنی از زایلان به عنوان کربوهیدارت‌های غیر قابل هضم ولی قابل تخمیر در نظر گرفته می‌شوند که ممکن است اثرات مشابه و یا حتی بهتری را نسبت به این دو پربیوتیک شناخته شده نشان دهند (۳). با وجود این، هنوز تولید و استفاده از این دسته از پربیوتیک‌ها چندان شایع نشده است (۴). سایر الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم با اثرات بالقوه پربیوتیکی (اثر گزینشی بر تخمیر روده‌ای) شامل گالاکتوالیگوساکارید، لاکتولوز، ایزومالتوالیگوساکارید، لاکتوساکارز، الیگوساکارید سویا و گلوکوالیگوساکارید هستند. اگرچه مطالعات بی‌شماری در زمینه اثرات مفید پربیوتیک یا الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم در انسان‌ها و حیوانات اهلی انجام شده، ولی گزارش‌های محدودی در زمینه جانوارن آبزی و بخصوص ماهی‌ها وجود دارد (۵). میکروبیوتای روده‌ای ماهی برای اولین بار توسط کاهیل[1](۶) بررسی شده است که نتایج این مطالعه حاکی از وجود ارتباط مشخص بین میکروبیوتای روده ای و محیط آبی پیرامون است. همچنین گزارش شده است که باکتری‌های پروبیوتیکی آن‌ها متعلق به جنس‌هایی متفاوت نسبت به جانوارن خشکی‌زی است. باکتری‌های گرم منفی در روده ماهی غالب هستند ولی برخی از باکتری‌های گرم مثبت نیز (گونه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک) در آن مشاهده می‌شوند (۷). بعلاوه، درحالی‌که روده بزرگ در انسان‌ها شرایطی بی‌هوازی داشته و توسط باکتری‌های بی هوازی اجباری جاگذاری شده است، روده ماهی شامل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری است (۸). بنابراین، بیشتر باکتری‌های پروبیوتیکی در گونه‌های آبزی، متفاوت با جانوران خشکی‌زی هستند (۹). بیشتر پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزی‌پروری شامل باکتری‌های اسید لاکتیک، باسیلوس‌های اسپوردار و مخمرهاست (۱۰). باکتری *Pediococcus acidilactici* نیز که جزو خانواده لاکتوباسیلوس‌هاست به‌عنوان پروبیوتیک برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۱)، تیلاپیای نیل (۱۲)، توربوت (۱۳)، میگوی *Litopenaeus stylirostris* (۱۴) استفاده شده است و اثرات سودمند آن بر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی، میکروبیوتای روده‌ای و مقاومت این گونه‌ها مشخص شده است.

اگرچه تاکنون کوشش شده است که جوامع باکتریایی مانند کارنوباکتریوم و لاکتوباسیلوس‌ها در لوله گوارش ماهی از طریق بکارگیری گونه‌های باکتریایی پروبیوتیکی افزایش یابند، اما سویه‌های پروبیوتیکی قادر به حفظ غالبیت پس از حذف از جیره غذایی نبودند (۱۵ و ۱۶). برای حل این مشکل راهبرد نوینی تحت عنوان سین‌بیوتیک مطرح شده است که در آن برای کمک به حفظ غالبیت باکتری‌های پروبیوتیکی در میکروبیوتای روده‌ای ماهی از پربیوتیک‌ها یا الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم استفاده می‌شود (۱۷). اثر سین‌بیوتیکی مستلزم توانایی باکتری پروبیوتیکی برای تخمیر پربیوتیک است که متأثر از درجه پلیمریزاسیون آن است (۱۸). به همین علت برای معرفی یک ترکیب

سین‌بیوتیکی، بررسی قابلیت تخمیر و رشد باکتری تحت تأثیر پربیوتیک به‌عنوان سوبسترا باید در نظر گرفته شود (۵). با وجود این، تا به امروز تنها در یک مطالعه آزمایشگاهی ترکیب سین‌بیوتیکی برخی از باکتری‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در آبزی با پربیوتیک‌ها رایج بررسی شده (۱۷) و مطالعات انجام شده در زمینه کاربرد سین‌بیوتیک‌ها فاقد چنین پشتوانه آزمایشگاهی است.

به همین علت، در این مطالعه ترکیب سین‌بیوتیکی یکی از پروبیوتیک‌های موثر در آبزی‌پروری با پربیوتیک‌های رایج بررسی شده است تا با استفاده از شاخص‌های رشد و تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تولیدی ترکیب بهینه سین‌بیوتیکی تعیین شود.

مواد و روش‌ها

پربیوتیک‌های مورد بررسی

پربیوتیک‌هایی که در این مطالعه در ترکیب سین‌بیوتیکی بررسی شدند دارای میانگین درجه پلیمریزاسیون مختلفی بودند: اینولین ۲۵، الیگوفروکتوز ۴، زایلوالیگوساکارید ۳ (۱۷). زایلوالیگوساکارید از زایلان ذرت بدست آمده و از شرکت لانگ لایف چین تامین شد. اینولین از ریشه گیاه کاسنی و الیگوفروکتوز از هیدرولیز آنزیمی نسبی اینولین بدست آمد (Beno, Belgium).

سویه پروبیوتیکی مورد بررسی

پروبیوتیک مورد بررسی باکتری *P. acidilactici* بود که پیش‌تر اثرات پروبیوتیکی آن بر بسیاری از گونه‌های آبزی و جانوران خشکی‌زی دیگر به اثبات رسیده است (۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۹ - ۲۲). این باکتری جزو خانواده لاکتوباسیلوس‌ها بوده و کوکسی گرم مثبت است که به شکل جفتی یا چهارتایی (تتراد) دیده می‌شود (۲۳). باکتری مذکور از کشور فرانسه (Bactocell, France) به شکل لیوفیلیزه تأمین و صحت آن از طریق توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA تأیید شد.

بررسی رشد باکتری در تیمارهای سین بیوتیکی

برای بررسی توانایی مصرف پربیوتیک‌های مختلف و رشد باکتری پروبیوتیکی *P. acidilactici* تحت شرایط بی هوازی ابتدا تعداد ۷ ارلن (به عنوان stock) هر کدام حاوی ۹۰ سی سی محیط *mMRS broth* (برای ۳۰ لوله آزمایش بازای هر تیمار) تهیه و اتوکلاو شد. پربیوتیک‌ها نیز به شکل جداگانه اتوکلاو و به محیط اضافه شد. همچنین یک تیمار بدون پربیوتیک هم به عنوان شاهد درنظر گرفته شده که به ارلن‌ها به همان میزان آب مقطر اضافه شد. میزان ۰/۲ درصد حجم محیط برای هر تیمار سدیم تیوگلیکولیت به شکل تازه تهیه و پس از اتوکلاو شدن به شکل جداگانه تحت شرایط استریل به محیط‌ها اضافه شد (برای بی هوازی کردن محیط) (۲۴ و ۲۵). محیط آماده شده پس از افزودن پربیوتیک‌ها و سدیم تیوگلیکولیت (به میزان ۳ سی سی) به ۱۰ لوله آزمایش (به ازای هر نمونه برداری یک لوله مدنظر قرار گرفت) انتقال داده شد. به منظور اطمینان از ایجاد شرایط بی‌هوازی به میزان یک سی‌سی پارافین روی محیط‌ها ریخته شد (۲۴). پس از اتمام آماده‌سازی تیمارهای آزمایشی در لوله‌ها، محیط‌ها با رقتی معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ از باکتری *P. acidilactici* (کشت ۲۴ ساعته) رشد یافته روی محیط کشت MRS آگار تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. برای تعیین میزان رشد باکتری *P. acidilactici*

در هریک از تیمارها، نمونه برداری و تراکم سنجی نوری با استفاده دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzo, Japan) انجام شد (۱۷). همچنین در انتهای آزمایش اسیدیته متری در همه تیمارهای آزمایشی برای تعیین اسیدیته نهایی محیط‌ها انجام شد.

بررسی میزان تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی

برای تعیین کمی میزان اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (استیک، پروپیونیک و بوتریک اسید) تولید در انتهای فاز تصاعدی رشد نمونه برداری انجام و مقادیر اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کاریی بالا (HPLC) و براساس روش ری کرافت[۲] و همکاران (۲۶) تعیین شد. در انتهای فاز لگاریتمی رشد (براساس ترسیم منحنی رشد تعیین شد.) ۲ سی‌سی از محیط‌ها به درون میکروتیوب انتقال داده شد. برای حصول سوپرناتانت حاوی متابولیت‌های تولیدی در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی، میکروتیوب‌ها در سانتریفیوژ یخچال دار (۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سپس سوپرناتانت به میکروتیوب‌های دیگری منتقل شد. ۲۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به دتکتور U.V در طول موج ۲۱۰ نانومتر تزریق شد. ستون مورد استفاده از نوع ion-exclusion Aminex HPX-87H (طول ۳۰۰×۷/۸ میلی متر) بود (۲۶). فاز متحرک اسید سولفوریک ۰/۰۰۵ مول در لیتر آب مخصوص HPLC بود که با نرخ جریان ۰/۶ میلی لیتر در دقیقه به درون ستون پمپ شد (۲۶). کمی کردن داده از طریق رسم منحنی استاندارد برای استات، پروپیوتات و بوتریات انجام شد.

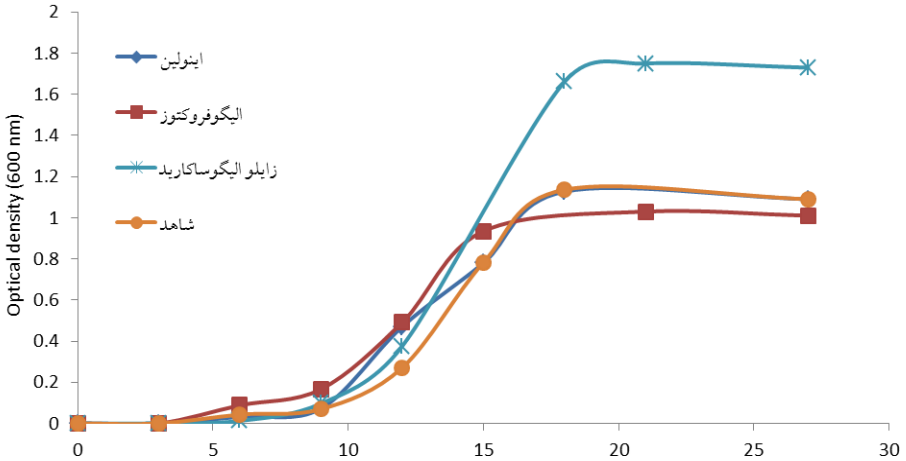
تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه بین تیمارها و نیز تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P value <0.05) از تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA[۳] و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple-range test) استفاده شد (۲۷). تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۳) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج

توانایی تخمیر و مصرف پربیوتیک‌ها تحت شرایط بی‌هوازی

منحنی رشد باکتری *P. acidilactici* در تیمارهای مختلف سین‌بیوتیکی در شکل ۱ نشان داده شده است. مدت زمان فاز تأخیری در همه تیمارهای آزمایشی در حدود ۹ ساعت بود. فاز تصاعدی رشد از ۹ ساعت پس از تلقیح شروع شده و تا ۱۸ ساعت ادامه داشت. در بین تیمارهای سین‌بیوتیکی مورد بررسی، بیشترین میزان رشد باکتری در تیمار سین‌بیوتیکی پروبیوتیک *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید مشاهده شد. پس از این تیمار بیشترین رشد نسبت به سایر تیمارها مربوط به تیمار حاوی پربیوتیک زایلوالیگوساکارید بود. سایر تیمارها روند و میزان رشد مشابهی داشتند و تفاوت چندانی نشان ندادند.



شکل ۱- منحنی رشد باکتری *P. acidilactici* تحت شرایط تخمیری در تیمارهای مختلف سین‌بیوتیکی

مقایسه آماری بیشینه رشد مشاهده شده (بیشینه کدورت‌سنجی نوری) بین تیمارهای مختلف سین بیوتیکی در جدول ۱ ارائه شده است. بیشینه رشد مشاهده شده در تیمار سین‌بیوتیکی *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (P value <0.05). سایر تیمارهای سین‌بیوتیکی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد که فاقد پریبیوتیک بود نشان ندادند (P value >0.05).

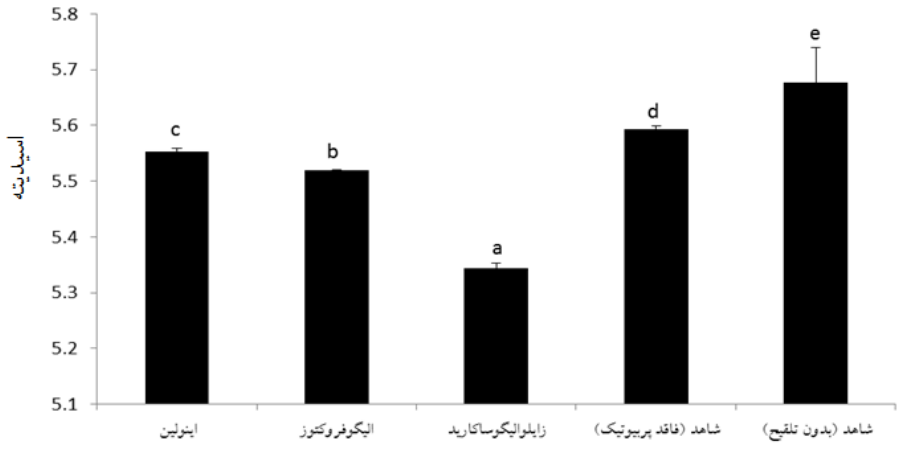
جدول ۱- بیشینه رشد (براساس کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر) باکتری *P. acidilactici* در تیمارهای مختلف سین‌بیوتیکی.

	شاهد	اینولین	الیگوفروکتوز	زایلوالگوساکارید
بیشینه رشد (براساس کدورت سنجی نوری)	۱/۱۶±۰/۰۱۳ [a]	۱/۱۵±۰/۰۹ [a]	۱/۱۷±۰/۰۲ [a]	۱/۷۵±۰/۱۰ [b]

اعداد نشانه گذاری شده در یک ردیف با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند (P value <۰/۰۵).

در انتهای نمونه‌برداری، اسیدیته محیط‌های کشت اندازه‌گیری شد تا تولید محصولات اسیدی (اعم از اسیدلاکتیک و اسیدهای چرب زنجیره کوتاه) بررسی شود. در ابتدای شروع آزمایش اسیدیته محیط‌های براساس یافته‌های سابق در زمینه بهینه‌سازی رشد باکتری *P. acidilactici* درحد ۵/۸ تنظیم شد (۲۸). در انتهای دوره، کمترین اسیدیته در تیمار سین‌بیوتیکی *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (P value <0.05) (شکل ۲). پس از این تیمار، کاهش معنی‌دار اسیدیته نسبت به سایر تیمارها در تیمار *P. acidilactici* با الیگوفروکتوز مشاهده شد

(*P* value <0.05). به‌طور کلی در انتهای دوره همه تیمارهای سین‌بیوتیکی مورد بررسی با محیط شاهد فاقد پربیوتیک و محیط تلقیح نشده که تحت شرایط مشابه نگهداری شده بود اختلاف معنی دار داشتند (*P* value <0.05).

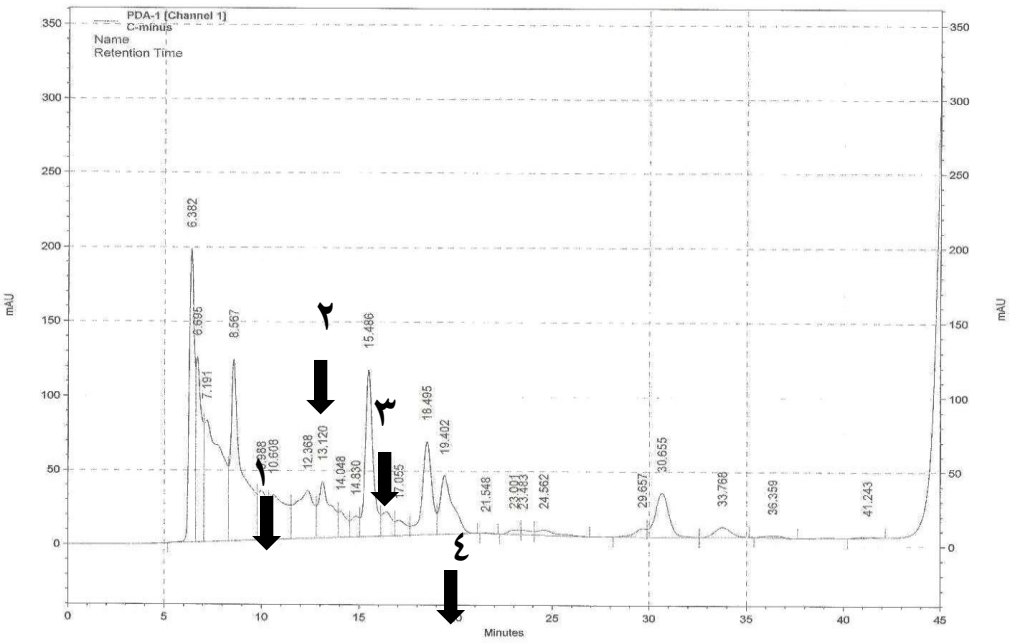


شکل ۲- اسیدیته نهایی محیط‌ها در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی پس از ۲۴ ساعت کشت بی‌هوازی؛ ستون‌ها نشانه‌گذاری شده با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (*P* value <0.05).

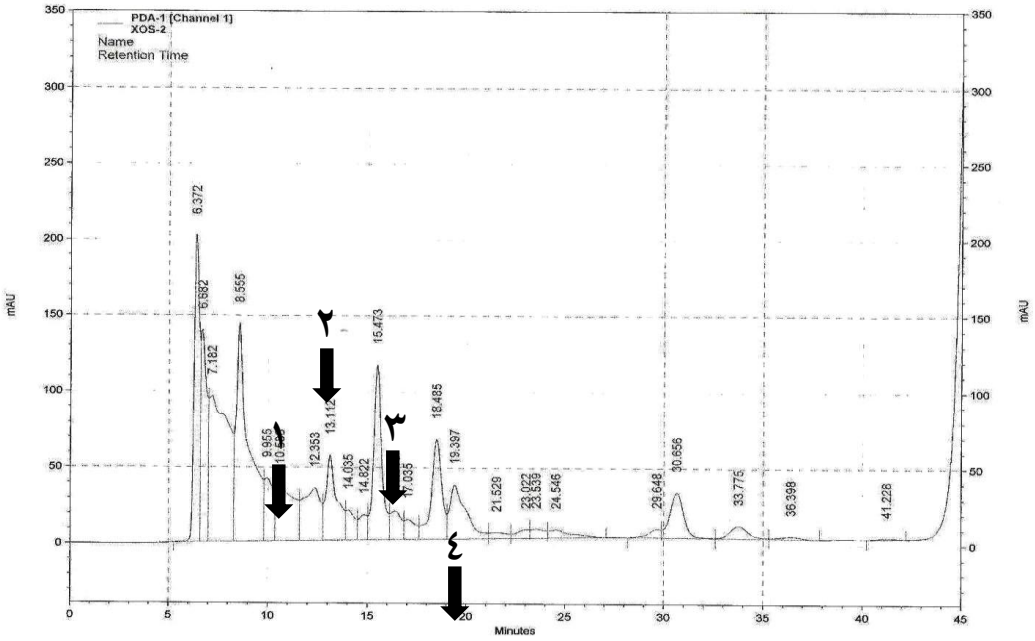
تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه

برای تعیین کمی میزان اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تولیدی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی ابتدا استانداردهای اسیدهای مدنظر (لاکتیک، بوتریک، پروپیوتیک و استیک) به دستگاه تزریق شد. زمان ظهور پیک هریک از اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و اسید لاکتیک به ترتیب به شکل ذیل بود: لاکتیک اسید ۱۵/۵۱، بوتریک اسید ۱۳/۱۳، پروپیونیک اسید ۱۸/۰۸ و استیک اسید ۲۱/۹۵ دقیقه

پس از بدست آوردن زمان ظهور پیک مربوط به هریک از اسیدهای چرب منحنی استاندارد با استفاده از تزریق رقت‌های مختلف استاندارد ترسیم شد. تعیین میزان تولید هریک از اسیدهای چرب زنجیره کوتاه براساس محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگراف و قرار دادن آن در فرمول بدست آمده برای منحنی استاندارد انجام شد. در شکل۳ و ۴ کروماتوگراف بدست آمده برای تیمار سین‌بیوتیکی باکتری *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید و گروه شاهد فاقد پربیوتیک ارائه شده است. همانطور که در کروماتوگراف ملاحظه می‌شود بیشترین اسید چرب زنجیره کوتاه تولیدی پروپیونیک بوده است. کمترین اسید چرب زنجیره کوتاه در همه تیمارهای سین‌بیوتیکی استیک اسید بود.

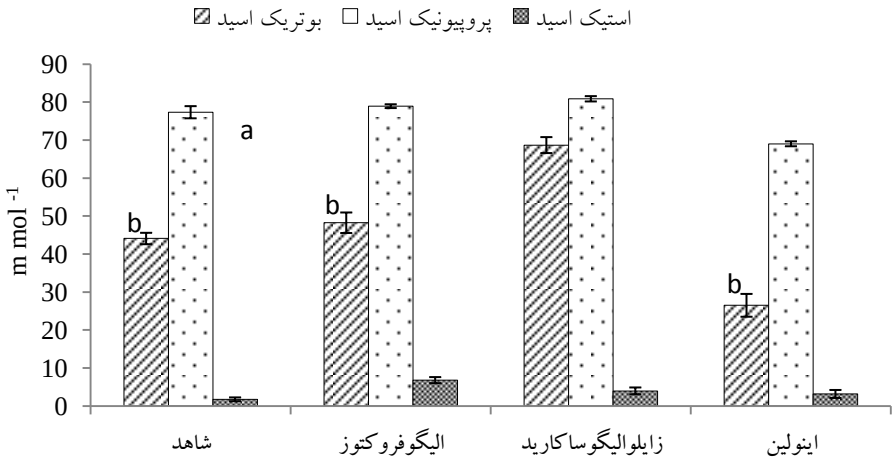


شکل ۳- منحنی کروماتوگراف بدست آمده برای تیمار شاهد فاقد پربیوتیک؛ ۱، بوتریک اسید؛ ۲، لاکتیک اسید؛ ۳، پروپیونیک اسید؛ ۴، استیک اسید



شکل ۴- منحنی کروماتوگراف بدست آمده برای تیمار سین‌بیوتیکی باکتری *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید ۱، بوتریک اسید؛ ۲، لاکتیک اسید؛ ۳، پروپیونیک اسید؛ ۴، استیک اسید

مقادیر کمی محاسبه شده برای تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی و مقایسه آماری آن‌ها در شکل ۵ ارائه شده است. همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌شود اگرچه بیشترین اسید چرب زنجیره کوتاه تولیدی در همه تیمارها پروپیونیک بوده است، ولی هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای سین‌بیوتیکی و تیمار شاهد فاقد پربیوتیک وجود نداشت (P value >0.05). روند مشابهی در خصوص استیک اسید مشاهده شد. میزان تولید بوتریک اسید در تیمار سین‌بیوتیکی باکتری *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (P value <0.05). با وجود این، سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تولید بوتریک‌اسید نشان ندادند (P value >0.05).



شکل ۵- مقادیر اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تولیدی در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی پس از ۱۸ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برحسب میلی مول بر لیتر). ستون‌های نشانه‌گذاری شده با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P value <0.05).

بحث و نتیجه گیری

مصرف آنتی بیوتیک‌ها به شکل خودسرانه برای پیشگیری از بروز بیمارها در آبزیان به ظهور باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک منجر شده است. به همین علت در بسیاری از کشورها قوانین بسیار سخت و اکیدی در زمینه استفاده از آنتی بیوتیک‌ها وضع شده است (۲۹). یکی از این راه‌ها حل این مشکل استفاده از مکمل‌های غذایی چون پروبیوتیک، پربیوتیک و سین‌بیوتیک است که اثرات سومندی بر ایمنی و مقاومت در برابر بیماری میزبان دارند (۳۰). باوجود بررسی اثرات پربیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌های مختلف، اطلاعات محدودی در زمینه سوبسترای ترجیهی هریک از باکتری‌های پروبیوتیکی برای انتخاب ترکیب بهینه سین بیوتیکی وجود دارد (۱۷). بررسی رشد باکتری *P. acidilactici* تحت تیمارهای مختلف سین‌بیوتیکی با پربیوتیک‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان رشد پروبیوتیک مذکور مربوط به تیمار سین‌بیوتیکی با زایلوالیگوساکارید است که دارای کمترین درجه پلیمریزاسیون بود. مطالعه منتشر شده ای درخصوص بررسی رشد باکتری *P. acidilactici* در تیمار

سین‌بیوتیکی با پربیوتیک‌های رایج وجود ندارد. تنها در یک مطالعه منـدال[۴] و همکـاران گـزارش کردنـد کـه اسـتفاده از پربیوتیـک‌هـای مـانیتول، مالتودکتسـروز و سوربیتول در ترکیـب سـین‌بیـوتیکی بـا *P. acidilactici* اثری بر رشد باکتری نداشت. پربیوتیک‌ها استفاده شـده در مطالعه مذکور جزو پربیوتیک‌ها شناخته شـده و کـارا نبودند. بـاوجود اطلاعـات محـدود و گـاهی متنـاقض در زمینه گونه‌های مختلف باکتریـایی، مطالعـات نشـان داده است که باکتری *Carnobacterium piscicola* نیز قادر به تخمیر پربیوتیـک بـا درجـه پلیمریزاسـیون بـالا نیسـت (۳۱). قابلیت اسـتفاده و تخمیـر پربیوتیـک‌هـای متـأثر از درجه پلیمریزاسیون آن‌هاست (۴ و ۳۲). به‌طـوری‌کـه بـا افزایش درجه پلیمریزاسیون سرعت تخمیر کند مـی‌شـود که این مورد خود مـی‌توانـد سـبب انباشـت پربیوتیـک و اثرات مضر شود (۳۳). بنابراین استفاده از پربیوتیک‌ها در ترکیب‌های سین‌بیوتیکی باید با دقت و براسـاس پشـتوانه مطالعات آزمایشگاهی انجام شود.

همانطور که در بخش نتایج بیان شد تولیـد اسـیدهای چرب زنجیـره کوتـاه (اسـتیک، پروپیونیـک و بوتریـک اسـید) در همـه تیمارهـای سـین بیـوتیکی مشـاهده شـد. بیشـترین اسـید چـرب زنجیـره کوتـاه تولیـدی در همـه تیمارها، پروپیونیک اسید بود. اگرچـه تـاکنون گزارشـی در خصوص تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتـاه توسـط باکتری *P. acidilactici* تحت شرایط تخمیری و در اثـر مصـرف سوبسـترای پربیـوتیکی ارائـه نشـده اسـت، در مطالعـه آزمایشـگاهی انجـام شـده توسـط رورنگـاوا[۵] و همکـاران (۱۷) در زمینـه ترکیـب‌هـای مختلـف سـین-بیوتیکی آبزیان مهم‌ترین اسید چرب زنجیره کوتاه تولید شده در همه تیمارهای سین‌بیوتیـک اسـتیک اسـید بـود. همچنـین یافتـه‌هـای ایـن مطالعـه نشـان داد کـه در تیمـار سین‌بیوتیکی که بیشترین رشد باکتری مشاهده شد تولیـد بوتریک اسید به‌طـور معنـی‌داری بیشـتر از سـایر تیمارهـا بود. تفاوت نتایج مطالعه حاضر با مطالعه یاد شده، ممکن است ناشی از تفاوت در نوع پربیوتیک استفاده شـده بـه عنـوان سوبسـترا و نیـز سـویه پروبیـوتیکی مـورد اسـتفاده باشـد. اگرچـه در همـه تیمارهـای سـین‌بیـوتیکی مـورد بررسی در مطالعه رورنگاوا و همکاران (۱۷) میزان تولیـد بوتریک اسید پـایین بـود، امـا در مطالعـه انجـام شـده در زمینه اثـرات پربیوتیـک فروکتوالیگوسـاکارید بـر تولیـد اسیدهای چرب زنجیره کوتاه توسط میکروبیوتای روده-ای مـوش (۳۴) مقـادیر تولیـد بوتریـک اسـید در تیمـار فرکتوالگوسـاکارید بـه‌طـور معنـی‌داری بیشـتر از تیمـار شـاهد بـود؛ درحـالی‌کـه سـایر اسـیدهای چـرب زنجیـره کوتاه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. مشخص شده است که اسیدهای چرب زنجیره کوتـاه و بخصـوص بوتریـک اسید از طریق اتصال به برخی از گیرنده‌هـای موجـود در سطح اجزا دستگاه ایمنی قادر به تحریـک ایمنـی هسـتند (۳۵). بنابراین، با توجه به افزایش معنی‌دار تولید بوتریک اسـید در تیمـار سـین‌بیـوتیکی *P. acidilactici* بـا زایلوالیگوساکارید، این ترکیب پتانسیل افزایش ایمنـی و مقاومت در برابر بیماری ماهیان و سایر جانوران و به تبـع آن کـاهش مصـرف آنتـی‌بیوتیـک‌هـا را دارد. همچنـین اسیدها چرب زنجیره کوتاه به عنوان عوامل ضـد سـرطان مطـرح بـوده و نیـز بـه عنـوان یـک منبـع انـرژی بـرای انتروسیت‌هـا روده نقـش ایفـا مـی‌کننـد. از طرفـی ورود اسیدهـای چـرب زنجیـره کوتـاه بـه روده سـبب افـزایش جریان خون می‌شود که به نظر می‌رسـد افـزایش جریـان خون به اکسیژن رسـانی بهتـر بـه بافـت‌هـا و انتقـال مـواد مغـذی منجـر شـده و بـه تبـع آن باعـث بهبـود وضـعیت

فیزیولوژیک دستگاه گوارش می‌شود که از این جهت نیز نتایج بدست آمده حائز اهمیت است.

در مجموع، نتایج این مطالعه حاکی از آن است که در بین ترکیب‌های سین‌بیوتیکی بررسی شده، بهینه‌ترین ترکیب سین‌بیوتیکی استفاده از پروبیوتیک *P. acidilactici* به همراه زایلو الیگوساکارید است. این پربیوتیک پتانسیل استفاده به عنوان سوبسترا برای افزایش رشد و فعالیت باکتری پروبیوتیکی موردنظر را دارد. بررسی کارایی این ترکیب‌سین بیوتیکی در شرایط روده آبزیان و سایر جانوران و مقایسه آن با استفاده جداگانه از هرکدام از این پروبیوتیک و پربیوتیک‌ها باید به منظور تایید اثر هم‌افزایی (سینرژیسم) در مطالعات آتی مدنظر قرار گیرد. همچنین، بررسی کنش‌های متقابل بین جوامع میکروبی بومی روده با ترکیب سین‌بیوتیکی معرفی شده نیز نیازمند تحقیقات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر رضایی، دانشیار گروه صنایع غذایی دانشگاه تهران، مهندس علی مویدی، متیو کاستکس نماینده شرکت باکتوسل و همچنین از سرکار خانم علوی و مهرشاد که با مساعدت‌هایشان راه را در انجام این مطالعه هموار نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Niness KR. Inulin and oligofructose: What are they? *J Nutr* 1999; 129(7): 1402S-6S.

(2) Flickinger EA, Van Loo J, Fahey GC. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43(1): 19-60.

(3) Vázquez MJ, Alonso JL, Domínguez H & Parajó J. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science & amp; Technology* 2000; 11(11): 387-93.

(4) Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition* 2007; 137(3): 830S.

(5) Ringø E, Olsen RE, Gifstad Tø, Dalmo RA, Amlund H, Hemre G.-I, et al. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 2010; 16(2): 117-36.

(6) Cahill MM. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial ecology* 1990; 19(1): 21-41.

(7) Ringø E, Gatesoupe F-J. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 1998; 160(3-4): 177-203.

(8) Ringø E, Strøm E, Tabachek J. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research* 1995; 26(10): 773-89.

(9) Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999; 180(1-2): 147-65.

(10) Gatesoupe FJ. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; 14(1-3): 107-14.

(11) Merrifield D, Bradley G, Harper G, Baker R, Munn C, Davies S. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized Pediococcus acidilactici on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 2011; 17(1): 73-9..

(12) Ferguson RM, Merrifield DL, Harper GM, Rawling, MD, Mustafa S, Picchietti S, et al. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* 2010; 109(3): 851-62.

(13) Villamil L, Figueras A, Planas M, & Novoa B. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 2003; 219(1-4): 43-56.

(14) Castex M, Chim L, Pham D, Lemaire P, Wabete N, Nicolas JL, et al. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 2008; 275(1): 182-93.

(15) Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss. Aquaculture* 2005; 243(1-4): 241-54.

(16) Robertson P, O'Dowd C, Burrells C, Williams P, Austin, B. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 2000; 185(3-4): 235-43.

(17) Rurangwa E, Laranja JL, Van Houdt R, Delaedt Y, Geraylou Z, Van de Wiele T, et al. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono cultures in vitro. *Journal of applied microbiology* 2009; 106(3): 932-40.

(18) de Vrese M & Schrezenmeir J. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics*. *Food Biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer; 2008.

(19) Castex M, Lemaire P, Wabete N, & Chim L. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 2010; 28(4): 622-31.

(20) Perera S. *The Probiotic Pediococcus acidilactici Protects Goldfish (Carassius auratus) Undergoing Induced Stress*. New York: Hood College; 2008.

(21) Planas M, Vazquez JA, Marques J, Perez-Lomba R, Gonzalez MP, Murado M. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 2004; 240(1-4): 313-29.

(22) Villamil L, Figueras A, Planas M & Novoa B. *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: Administration pathways. *Aquaculture* 2010; 307(1-2): 83-8.

(23) Mandal V, Sen SK, Mandal NC. Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 and its characterization. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2008; 45(2): 106-10.

(24) Elliott SD, Dole VP. An inactive precursor of streptococcal proteinase. *The Journal of experimental medicine* 1947; 85(3): 305.

(25) Mandal V, Sen SK, Mandal NC. Effect of prebiotics on bacteriocin production and cholesterol lowering activity of *Pediococcus acidilactici* LAB 5. World *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; 25: 1837-47.

(26) Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, Rastall R. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of applied microbiology* 2001; 91: 878-87.

(27) Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, , 1994.

(28) Mandal V, Sen S, Mandal N. Isolation and Characterization of Pediocin NV 5 Producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from Vacuum-Packed Fermented Meat Product. *Indian Journal of Microbiology* 2011; 51(1): 22-9.

(29) Cabello FC. Antibiotics and aquaculture in Chile: Implications for human and animal health. *Rev Medica Chile* 2004; 132(8): 1001-6.

(30) Hoseinifar SH, Mirvaghefi A, Mojazi Amiri B, Rostami HK, & Merrifield DL. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 2011; 17(5): 498–504.

(31) Khouiti Z, Simon J. Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* 213. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 1997; 19(1): 28-33.

(32) Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *The American journal of clinical nutrition* 2001; 73(2): 415S.

(33) Olsen RE, Myklebust R, Kryvi H, Mayhew TM, Ringø E. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research* 2001; 32(11): 931-4.

(34) Juskiewicz J, Semaskaite A, Zdunczyk Z, Wróblewska M, Gruzauskas R, Juskiewicz M. Minor effect of the dietary combination of probiotic *Pediococcus acidilactici* with fructooligosaccharides or polysaccharidases on beneficial changes in the cecum of rats. *Nutrition Research* 2007; 27(3): 133-9.

(35) Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology* 2010; 12(1): 5-9.

[1]. Cahill
[2]. Rycroft
[3]. one-way analysis of variance (ANOVA)
[4]. Mandal
[5]. Rurengawa

Determination of the best synbiotic between probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* and prebiotics inulin, oligofructose and xylooligosaccharide

Seyed Hossein Hoseinifar
Assistant Professor of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, hoseinifar@ut.ac.ir
Alireza Mirvaghefi *
Associated Professor of Fisheries, University of Tehran, Karaj, Iran, vaghefi.nrf@ut.ac.ir
Mohammad Ali Amoozegar **
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Daniel L. Merrifield
Assistant Professor of Fisheries, The University of Plymouth, UK, daniel.merrifield@plymoth.ac.uk

Abstract

Introduction: Inability of probiotic bacteria for stable colonization and dominance in intestinal microbiota of aquatic animals, combination of administration with proper prebiotics (Synbiotic) as substrate for increasing growth and stable domination have been suggested. The aim of the present study was determination of the best synbiotic between a probiotic bacteria, *P. acidilactici* and prebiotics, inulin, oligofructose and xylooligosaccharide.

Materials and methods: *P. acidilactici* was cultured in media containing inulin, oligofructose and xylooligosaccharide as prebiotic. Growth of bacteria and final pH of media were determined in each treatment under anaerobic culture. In addition, short chain fatty acids (Butyric, Propionic and Acetic acid) productions in synbiotic treatments were measured using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system.

Results: Our results revealed that bacteria growth in *P. acidilactici* with XOS treatments was significantly higher compared to the other synbiotics and to the control groups ($P < 0.05$). There were no significant differences between other treatments regarding bacteria growth ($P > 0.05$). Moreover, final pH of media in *P. acidilactici* with XOS group was significantly lower when compared to the other treatments ($P < 0.05$). The highest and lowest SCFA produced in all synbiotic treatments were propionic and acetic acid, respectively. While acetic and propionic production showed no significant variation between treatments ($P > 0.05$), the highest production of butyric acid was observed in *P. acidilactici* with XOS treatment ($P < 0.05$).

Discussion and conclusion: The results of this study confirmed that simultaneous administration of in *P. acidilactici* and XOS could be a potential optimum synbiotic.

Key words: Probiotic, *P. acidilactici*, Synbiotic, Growth, SCFA

* Corresponding Author
** Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran
Received: September 24, 2012/ **Accepted:** February 11, 2013