

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 پروبیوتیک‌های 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 مریفلد: استادیار تغذیه آبزیان، دانشگاه پلی‌موس، انگلستان، daniel.merrifield@plymoth.ac.uk

### چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** باکتری *P. acidilactici* در محیط‌های حاوی پروبیوتیک‌های اینولین، الیگوفروکتوز و زایلوالیگوساکارید رشد داده شد. میزان رشد باکتری‌ها و اسیدیته نهایی محیط تحت شرایط کشت بی‌هوازی بررسی شد. بعلاوه 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 به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارهای سین‌بیوتیکی و تیمار شاهد فاقد پروبیوتیک بود ( $P < 0.05$ ). سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر رشد باکتری نداشتند ( $P > 0.05$ ). همچنین اسیدیته نهایی محیط نیز در تیمار *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید کاهش معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد ( $P < 0.05$ ). 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 پروپیونیک اسید تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای سین‌بیوتیکی نشان نداد ( $P > 0.05$ )، بیشترین میزان بوتریک اسید تولید شده مربوط به تیمار *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ( $P < 0.05$ ).

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

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

\* نویسنده مسؤول مکاتبات

\*\* آزمایشگاه اکسترموفیل، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

## مقدمه

تا به امروز مهم‌ترین پریبیوتیک‌های مورد مطالعه در مطالعات انسانی و دامی فروکتان‌های بدست آمده از ریشه گیاه کاسنی، اینولین و الیگوفروکتوز بوده اند (۱) و (۲). علاوه بر این دو مورد، سایر الیگوساکاریدها مانند زایلوالیگوساکارید بدست آمده از مواد غنی از زایلان به عنوان کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم ولی قابل تخمیر در نظر گرفته می‌شوند که ممکن است اثرات مشابه و یا حتی بهتری را نسبت به این دو پریبیوتیک شناخته شده نشان دهند (۳). با وجود این، هنوز تولید و استفاده از این دسته از پریبیوتیک‌ها چندان شایع نشده است (۴). سایر الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم با اثرات بالقوه پریبیوتیکی (اثر گزینشی بر تخمیر روده‌ای) شامل گالاکتوالیگوساکارید، لاکتولوز، ایزومالتوالیگوساکارید، لاکتوساکارز، الیگوساکارید سویا و گلوکوالیگوساکارید هستند. اگرچه مطالعات بی‌شماری در زمینه اثرات مفید پریبیوتیک یا الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم در انسان‌ها و حیوانات اهلی انجام شده، ولی گزارش‌های محدودی در زمینه جانوران آبزی و بخصوص ماهی‌ها وجود دارد (۵). میکروبیوتای روده‌ای ماهی برای اولین بار توسط کاهیل<sup>۱</sup> (۶) بررسی شده است که نتایج این مطالعه حاکی از وجود ارتباط مشخص بین میکروبیوتای روده‌ای و محیط آبی پیرامون است. همچنین گزارش شده است که باکتری‌های پریبیوتیکی آن‌ها متعلق به جنس‌هایی متفاوت نسبت به جانوران 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، درحالی که روده بزرگ در انسان‌ها شرایطی بی‌هوازی داشته و توسط باکتری‌های بی‌هوازی اجباری جاگذاری شده است، روده ماهی شامل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری است (۸). بنابراین، بیشتر باکتری‌های پریبیوتیکی در گونه‌های آبزی، متفاوت با جانوران خشکی‌زی هستند (۹). بیشتر پریبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزی‌پروری شامل باکتری‌های اسید لاکتیک، باسیلوس‌های اسپوردار و مخمرهاست (۱۰). باکتری *Pediococcus acidilactici* نیز که جزو خانواده لاکتوباسیلوس‌هاست به‌عنوان پریبیوتیک 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 پریبیوتیکی افزایش یابند، اما سویه‌های پریبیوتیکی 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 پریبیوتیکی در میکروبیوتای روده‌ای ماهی از پریبیوتیک‌ها یا الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم استفاده می‌شود (۱۷). اثر سین‌بیوتیکی مستلزم توانایی باکتری پریبیوتیکی برای تخمیر پریبیوتیک است که متأثر از درجه پلیمریزاسیون

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 rRNA ۱۶S تأیید شد.

#### بررسی رشد باکتری در تیمارهای سین بیوتیکی

برای بررسی توانایی مصرف پروبیوتیک‌های مختلف و رشد باکتری پروبیوتیکی *P. acidilactici* تحت شرایط بی‌هوایی 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. پروبیوتیک‌ها نیز به شکل جداگانه اتوکلاو و به محیط اضافه شد. همچنین یک تیمار بدون پروبیوتیک هم به عنوان شاهد در نظر 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 بی‌هوایی کردن محیط) (۲۴ و ۲۵). محیط آماده شده پس از افزودن پروبیوتیک‌ها 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 بی‌هوایی به میزان یک سی سی پارافین روی محیط‌ها ریخته شد (۲۴). پس از اتمام آماده‌سازی تیمارهای آزمایشی در لوله‌ها، محیط‌ها با رقتی معادل  $10^8 \times 1/5$  از باکتری *P. acidilactici* (کشت ۲۴ ساعته) رشد یافته روی محیط کشت MRS آگار تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون

آن است (۱۸). به همین علت برای معرفی یک ترکیب سین بیوتیکی، بررسی قابلیت تخمیر و رشد باکتری تحت تأثیر پروبیوتیک به عنوان سوبسترا باید در نظر گرفته شود (۵). با وجود این، تا به امروز تنها در یک مطالعه آزمایشگاهی ترکیب سین بیوتیکی برخی از باکتری‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در آبی با پروبیوتیک‌ها رایج بررسی شده (۱۷) و مطالعات انجام شده در زمینه کاربرد سین بیوتیک‌ها فاقد چنین پشتوانه آزمایشگاهی است.

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

#### مواد و روش‌ها

##### پروبیوتیک‌های مورد بررسی

پروبیوتیک‌هایی که در این مطالعه در ترکیب سین بیوتیکی 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 تأمین 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 آبی و جانوران خشکی‌زی دیگر به اثبات رسیده است (۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۹ - ۲۲). این باکتری جزو

درون ستون پمپ شد (۲۶). کمی کردن داده از طریق رسم منحنی استاندارد برای استات، پروپیونات و بوتیرات انجام شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه بین تیمارها و نیز تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ( $P < 0.05$ ) از تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA<sup>۲</sup> 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

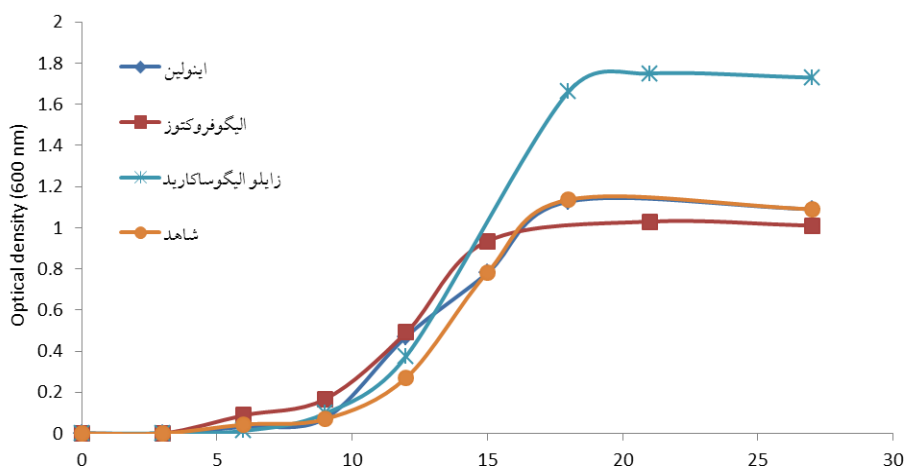
#### توانایی تخمیر و مصرف پروبیوتیک‌ها تحت شرایط بی‌هوازی

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 زیلولیگوساکارید مشاهده شد. پس از این تیمار بیشترین رشد نسبت به سایر تیمارها مربوط به تیمار حاوی پروبیوتیک زیلولیگوساکارید بود. سایر تیمارها روند و میزان رشد مشابهی داشتند و تفاوت چندانی نشان ندادند.

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 شده و مقادیر اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و براساس روش ری کرافت<sup>۲</sup> و همکاران (۲۶) تعیین شد. در انتهای فاز لگاریتمی رشد (تعیین شده براساس ترسیم منحنی رشد) 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 شد 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 ۷/۸×۳۰۰ میلی‌متر) بود (۲۶). فاز متحرک اسید سولفوریک ۰/۰۰۵ مول در لیتر آب مخصوص HPLC بود که با نرخ جریان ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه به



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

زایلوالیگوساکارید به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ( $P$  value  $<0.05$ ). سایر تیمارهای سین بیوتیکی اختلاف معنی داری با گروه شاهد که فاقد پروبیوتیک بود نشان ندادند ( $P$  value  $>0.05$ ).

مقایسه آماری بیشینه رشد مشاهده شده (بیشینه کدورت سنجی نوری) بین تیمارهای مختلف سین بیوتیکی در جدول ۱ ارائه شده است. بیشینه رشد مشاهده شده در تیمار سین بیوتیکی *P. acidilactici* با

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

زایلوالیگوساکارید	الیگوفروکتوز	اینولین	شاهد	
$1/75 \pm 0/10^b$	$1/17 \pm 0/02^a$	$1/15 \pm 0/09^a$	$1/16 \pm 0/013^a$	بیشینه رشد (براساس کدورت سنجی نوری)

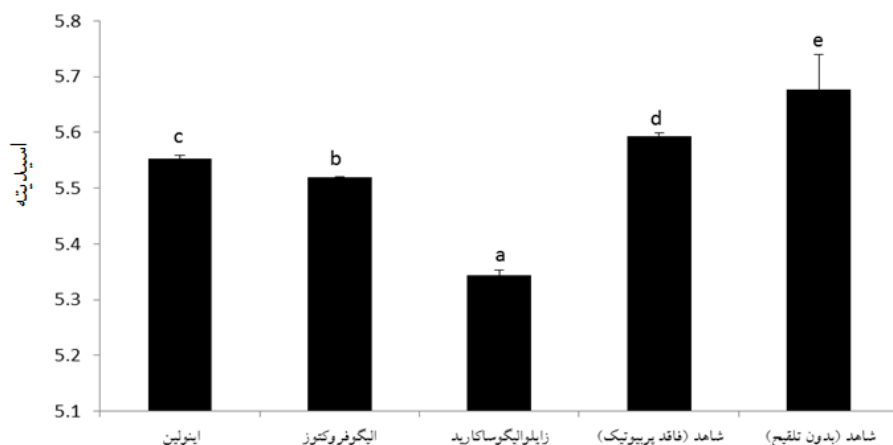
اعداد نشانه گذاری شده در یک ردیف با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ( $P$  value  $<0/05$ ).

دوره، کمترین اسیدیته در تیمار سین بیوتیکی *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید مشاهده شد که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشت ( $P$  value  $<0.05$ ) (شکل ۲). پس از این تیمار، کاهش معنی دار اسیدیته نسبت به سایر تیمارها در تیمار *P. acidilactici* با الیگوفروکتوز مشاهده شد

در انتهای نمونه برداری، اسیدیته محیط‌های کشت اندازه گیری 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 بهینه سازی رشد باکتری *P. acidilactici* در حد ۵/۸ تنظیم شد (۲۸). در انتهای

نگهداری شده بود اختلاف معنی دار داشتند  
( $P$  value < 0.05).

( $P$  value < 0.05). به‌طور کلی در انتهای دوره همه تیمارهای سین‌بیوتیکی مورد بررسی با محیط شاهد فاقد پریوتیک و محیط تلقیح نشده که تحت شرایط مشابه



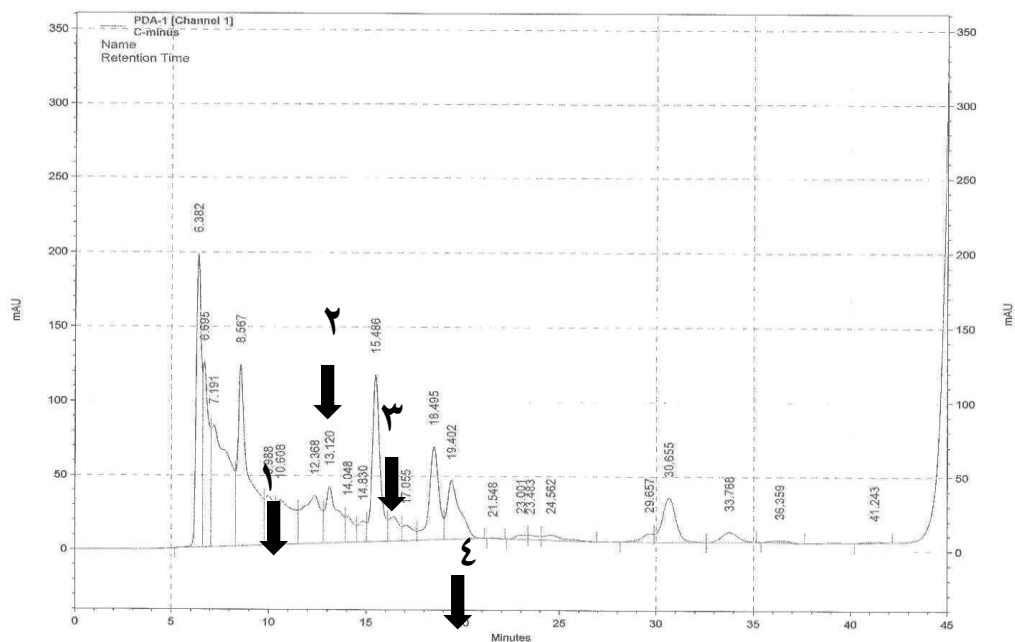
شکل ۲- اسیدیته نهایی محیط‌ها در هریک از تیمارهای سین‌بیوتیکی پس از ۲۴ ساعت کشت بی‌هوازی؛ ستون‌ها نشانه‌گذاری شده با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ( $P$  value < 0.05).

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 شکل ۳ و ۴ کروماتوگراف بدست آمده برای تیمار سین‌بیوتیکی باکتری *P. acidilactici* با زایلوالیگوساکارید و گروه شاهد فاقد پریوتیک 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.

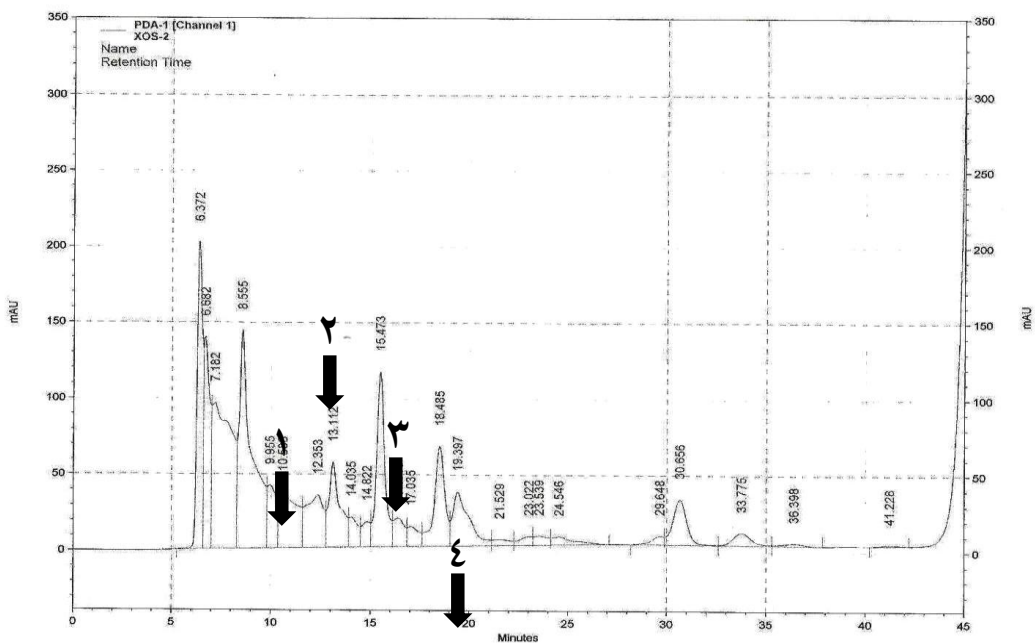
### تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه

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، پروپیونیک 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



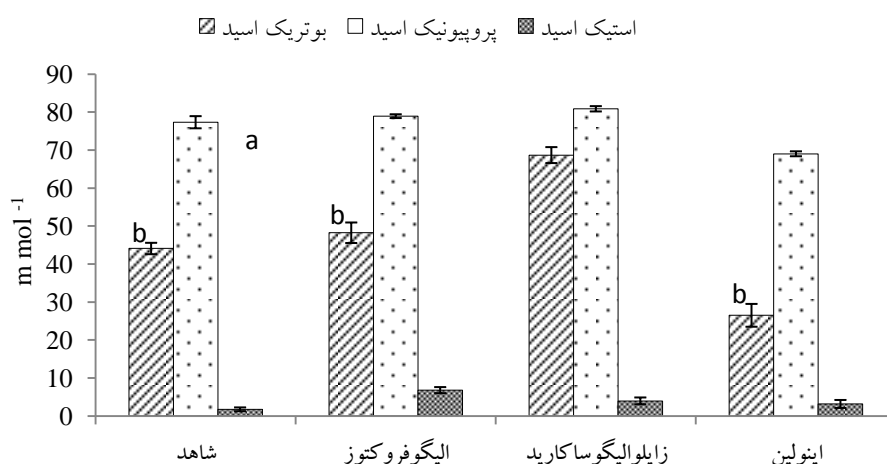
شکل ۳- منحنی کروماتوگراف بدست آمده برای تیمار شاهد فاقد پروبیوتیک؛ ۱، بوتریک اسید؛ ۲، لاکتیک اسید؛ ۳، پروپیونیک اسید؛ ۴، استیک اسید



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

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 زیلولیگوساکارید به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ( $P$  value  $<0.05$ ). با وجود این، سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تولید بوتریک اسید نشان ندادند ( $P$  value  $>0.05$ )

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 پریوتیک



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

بررسی اثرات پریوتیک‌ها و پروبیوتیک‌های مختلف، اطلاعات محدودی در زمینه سوبسترای ترجیحی هریک از باکتری‌های پروبیوتیکی برای انتخاب ترکیب بهینه سین‌بیوتیکی وجود دارد (۱۷). بررسی رشد باکتری *P. acidilactici* تحت تیمارهای مختلف سین‌بیوتیکی با پریوتیک‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان رشد پروبیوتیک مذکور مربوط به تیمار سین‌بیوتیکی با زیلولیگوساکارید است که دارای کمترین درجه پلیمریزاسیون بود. مطالعه منتشر شده‌ای در خصوص بررسی رشد باکتری *P. acidilactici* در تیمار

## بحث و نتیجه‌گیری

مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به شکل خودسرانه برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها در آبزیان به ظهور باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک منجر شده است. به همین علت در بسیاری از کشورها قوانین بسیار سخت و اکیدی در زمینه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها وضع شده است (۲۹). یکی از این راه‌ها حل این مشکل استفاده از مکمل‌های غذایی چون پروبیوتیک، پریوتیک و سین‌بیوتیک است که اثرات سومندی بر ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها دارند (۳۰). با وجود



سین‌بیوتیکی که بیشترین رشد باکتری مشاهده شد تولید بوتریک اسید به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. تفاوت نتایج مطالعه حاضر با مطالعه یاد شده، ممکن است ناشی از تفاوت در نوع پروبیوتیک استفاده شده به عنوان سوبسترا و نیز سویه پروبیوتیکی مورد استفاده باشد. اگرچه در همه تیمارهای سین‌بیوتیکی مورد بررسی در مطالعه رورنگاوا و همکاران (۱۷) میزان تولید بوتریک اسید پایین بود، اما در مطالعه انجام شده در زمینه اثرات پروبیوتیک فروکتوالیگوساکارید بر تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه توسط میکروبیوتای روده-ای موش (۳۴) مقادیر تولید بوتریک اسید در تیمار فروکتوالیگوساکارید به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود؛ درحالی‌که سایر اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. مشخص شده است که اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و بخصوص بوتریک اسید از طریق اتصال به برخی از گیرنده‌های موجود در سطح اجزا دستگاه ایمنی قادر به تحریک ایمنی هستند (۳۵). بنابراین، با توجه به افزایش معنی‌دار تولید بوتریک اسید در تیمار سین‌بیوتیکی *P. acidilactici* با زیلولیگوساکارید، این ترکیب پتانسیل افزایش ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ماهیان و سایر جانوران و به تبع آن کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد. همچنین اسیدها چرب زنجیره کوتاه به عنوان عوامل ضد سرطان مطرح بوده و نیز به عنوان یک منبع انرژی برای انتروسیت‌ها روده نقش ایفا می‌کنند. از طرفی ورود اسیدهای چرب زنجیره کوتاه به روده سبب افزایش جریان خون می‌شود که به نظر می‌رسد افزایش جریان خون به اکسیژن‌رسانی بهتر به بافت‌ها و انتقال مواد مغذی منجر شده و به تبع آن باعث بهبود وضعیت

سین‌بیوتیکی با پروبیوتیک‌های رایج وجود ندارد. تنها در یک مطالعه مندل<sup>۴</sup> و همکاران گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک‌های مانتول، مالتودکسروز و سوریتول در ترکیب سین‌بیوتیکی با *P. acidilactici* اثری بر رشد باکتری نداشت. پروبیوتیک‌ها استفاده شده در مطالعه مذکور جزو پروبیوتیک‌ها شناخته شده و کارا نبودند. باوجود اطلاعات محدود و گاهی متناقض در زمینه گونه‌های مختلف باکتریایی، مطالعات نشان داده است که باکتری *Carnobacterium piscicola* نیز قادر به تخمیر پروبیوتیک با درجه پلیمریزاسیون بالا نیست (۳۱). قابلیت استفاده و تخمیر پروبیوتیک‌های متأثر از درجه پلیمریزاسیون آن‌هاست (۴ و ۳۲). به‌طوری‌که با افزایش درجه پلیمریزاسیون سرعت تخمیر کند می‌شود که این مورد خود می‌تواند سبب انباشت پروبیوتیک و اثرات مضر شود (۳۳). بنابراین استفاده از پروبیوتیک‌ها در ترکیب‌های سین‌بیوتیکی باید با دقت و براساس پشتوانه مطالعات آزمایشگاهی انجام شود.

همانطور که در بخش نتایج بیان شد تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (استیک، پروپیونیک و بوتریک اسید) در همه تیمارهای سین‌بیوتیکی مشاهده شد. بیشترین اسید چرب زنجیره کوتاه تولیدی در همه تیمارها، پروپیونیک اسید بود. اگرچه تاکنون گزارشی در خصوص تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه توسط باکتری *P. acidilactici* تحت شرایط تخمیری و در اثر مصرف سوبسترای پروبیوتیکی ارائه نشده است، در مطالعه آزمایشگاهی انجام شده توسط رورنگاوا<sup>۵</sup> و همکاران (۱۷) در زمینه ترکیب‌های مختلف سین‌بیوتیکی آبریان مهم‌ترین اسید چرب زنجیره کوتاه تولید شده در همه تیمارهای سین‌بیوتیک استیک اسید بود. همچنین یافته‌های این مطالعه نشان داد که در تیمار

## 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 & 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..

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 زایلوالیگوساکارید است. این پروبیوتیک پتانسیل استفاده به عنوان سوپسترا برای افزایش رشد و فعالیت باکتری پروبیوتیکی موردنظر را دارد. بررسی کارایی این ترکیب سین‌بیوتیکی در شرایط روده آبزبان و سایر جانوران و مقایسه آن با استفاده جداگانه از هر کدام از این پروبیوتیک و پروبیوتیک‌ها باید به منظور تایید اثر هم‌افزایی (سین‌ریسم) 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.

- (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, Delaet 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) Khouti 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.

---

<sup>1</sup>. Cahill

<sup>2</sup>. Rycroft

<sup>3</sup>. one-way analysis of variance (ANOVA)

<sup>4</sup>. Mandal

<sup>5</sup>. 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@plymouth.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