15(1) 221-226, Spring 2023

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

## Original Research Paper

# Alteration of intestinal bacterial flora as a result of using different levels of spirulina powder and cloves in the diet of ordinary carp

***Davoud Mohammadrezaei*** [1*], ***Kave Khosraviani*** [2]

[1] *Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran*

[2] *Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*

**Key Words**

Spirulina
Clove
Firmicutes
Bacteroides
Molecular study
Carp

## Abstract

**Introduction:** The composition of the intestinal microflora of animals is affected by the type of food, on the other hand, the use of natural compounds and traditional medicinal plants such as spirulina and etc. as a new component in fish diets is expanding today. The aim of this study was to investigate the effect of spirulina algae powder and clove powder on the gastrointestinal microflora of common carp juveniles.

**Materials & Methods:** 160 juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) (average weight 16.20±1) were fed for 8 weeks with diets containing different amounts of spirulina algae powder (5, 10, and 15%) and Cloves powder (2, 4, and 6%) per kg of food. At the end of the period, the Guts and viscera of juveniles were harvested. DNA was extracted after preparing the required sample. The extracted DNA was used to build a new generation molecular library and sequencing. The abundance of intestinal bacteria was determined by molecular study and DNA extraction by quantitative analysis based on Real-Time PCR.

**Result:** The results showed that increasing the amount of spirulina powder in fish diets by up to 10% and clove powder by up to 4% increased the activity of firmicutes bacteria. While the activity of Bacteroides was observed in the treatment containing 15% spirulina and 4% of clove powder. Bacterial activity decreased in both bacterial groups by increasing the percentage of clove powder in the diet. This activity was lower than the control treatment. Therefore, the addition of spirulina powder (up to 10%) and cloves (up to 4%) can improve the intestinal microflora of juvenile common carp.

**Conclusion:** Based on the findings, it was found that herbal supplements have a positive effect on the beneficial bacteria of carp gut microbiota and they can provide an effective strategy for aquaculture activities.

* Corresponding Author's email: d.mrezaei@malayeru.ac.ir

Received: 22 December 2021; Reviewed: 21 January 2022; Revised: 22 March 2022; Accepted: 24 April 2021

(DOI): 10.22034/AEJ.2022.336177.2784

**مقاله پژوهشی**

# تغییر فلور باکتریایی روده در نتیجه استفاده از سطوح مختلف پودر اسپیرولینا و گل میخک در جیره غذایی بچه‌ماهی کپور معمولی

داود محمدرضائی[1*]، کاوه خسرویانی[2]

[1] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

[2] گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

**کلمات کلیدی**

اسپرولینا
گل میخک
فرمی کویت
باکتروئیده
بررسی مولکولی
کپور معمولی

**چکیده**

**مقدمه:** ترکیب میکروفلور روده جانوران تحت تاثیر غذا قرار دارد، از سوی دیگر استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی سنتی در آبزی پروری امروزه روبه گسترش است. تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر وجود پودر جلبک اسپرولینا و گل میخک بر میکرو فلور دستگاه گوارش بچه ماهی کپور انجام گردید.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۶۰ عدد بچه‌ماهی انگشت‌قد کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* با میانگین وزنی ۱±۱۶/۲۰ به‌مدت ۸ هفته با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف پودر جلبک اسپیرولینا (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) و پودر گل‌میخک (۲، ٤ و ٦ درصد) بر حسب کیلوگرم غذا تغذیه شدند. پس از پایان دوره احشا بچه‌ماهیان برداشت شد. DNA مورد نیاز بعد از آماده‌سازی از نمونه‌ها استخراج گردید. DNA استخراج شده جهت ساخته شدن کتابخانه مولکولی و توالی‌یابی نسل جدید مورد استفاده قرار گرفت. در پایان، فراوانی و تراکم باکتری‌ها روده از طریق مطالعه مولکولی و ساختار ژنتیکی به‌روش آنالیز کمی‌سازی مبتنی برReal Time PCR بررسی گردید.

**نتایج:** نتایج نشان داد که افزایش میزان پودر اسپرولینا به جیره ماهیان تا سطح ۱۰ درصد و پودر گل میخک تا ٤ درصد منجر به افزایش فعالیت باکتری‌های فرمی کویت افزایش گردید. درحالی‌که فعالیت باکتری‌های باکتروئیده در تیمار حاوی ۱۵ درصد پودر اسپرولینا و تیمار حاوی ٤ درصد پور گل میخک مشاهده شد. با افزایش درصد پودر گل میخک در جیره غذایی کاهش فعالیت باکتریایی در هر دو گروه باکتریایی کاهش یافت. این فعالیت در مقایسه با تیمار شاهد نیز از سطح کم‌تری برخودار بود. لذا، افزودن پودر اسپرولینا (تا ۱۰ درصد) و گل میخک (٤ درصد) می‌تواند منجر به بهبود عملکرد میکرو فلور روده بچه‌ماهی انگشت‌قد ماهی کپور معمولی گردد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** براساس یافته‌ها مشخص گردید که مکمل‌های گیاهی به‌طور مثبت بر باکتری‌های مفید میکروبیوتای روده کپور معمولی تأثیر می‌گذارند و می‌توانند یک استراتژی کارآمد برای آبزی‌پروری فراهم نمایند.



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: d.mrezaei@malayeru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ دی ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۱ بهمن ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲ فروردین ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: ٤ اردیبهشت ۱۴۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.336177.2784

## مقدمه

طیف گسترده‌ای از میکروب‌هایی که در محیط‌های آبی، خاکی، رسوبات و غذا یافت می‌شوند در دستگاه گوارش ماهیان نیز متمرکز شده و تشکیل میکروبیوتای روده‌ای را می‌دهند. اطلاعات محدودی در زمینه جوامع میکروبی، استقرار، تنوع و مهم‌تر از همه امکان تغییر آن به سمت جوامع باکتریایی مفید وجود دارد (۱). ثبات جمیعتی باکتریایی از آن‌جهت حائز اهمیت است که روده ماهیان جایگاه مهمی از نظر بروز عفونت‌های میکروبی و بیماری ماهیان به‌شمار می‌آید (۲). تعداد نرمال جمعیت باکتری در روده ماهیان حدودا $10^8$ باکتری هتروتروفیک هوازی در گرم روده و تقریبا $10^5$ باکتری غیرهوازی در گرم می‌باشد (۳). هر گونه بسته به شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی خود میکرو فلور سازگار با دستگاه گوارش خود را داراست. مشخص شده که ترکیب میکروفلور روده تحت تاثیر غذا قرار دارد. هر گونه بسته به شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی خود میکروفلور سازگار با دستگاه گوارش خود را داراست. (۴). باکتری‌های بلعیده شده همراه آب در مرحله لاروی می‌توانند میکروفلور دستگاه گوارش را در بچه ماهیان تشکیل دهند. از سوی دیگر میکروب‌های موجود در جیره‌های آغازین نیز می‌توانند بر میکروفلور دستگاه گوارش تاثیرگذار باشند. این باکتری‌ها جهت تشکیل میکروفلور روده باید با شرایط محیطی دستگاه گوارش نظیر: قابلیت دسترسی به مواد مغذی، pH و آنزیم‌های گوارشی سازگاری یابند (۵). پژوهش‌های پیشین نشان دادند که میکرو فلور روده با تغییر شرایط محیطی، مرحله تکاملی، فیزیولوژی هضم، استراتژی غذایی و نوع جیره تغییر می‌نماید (۶). باکترویئده‌ها (Bacteroides) و کلستریدیوم‌ها (Clostridium) با فراهم‌سازی اسیدهای چرب و ویتامین‌ها، سبب بهبود تغذیه می‌گردند (۷). پروتوباکترها (Proteobacteria) ریبوتایپ در همه ماهیان یافت شده و اغلب جامعه غالب فلور دستگاه گوارش را در بسیاری از گونه‌ها شکل می‌دهند. فرمی کویت‌ها نیز جزو گونه‌های رایج جمعیت دستگاه گوارش هستند (۴). ترکیبات گیاهی می‌توانند بر ساختار و عملکرد فلور میکروبی روده اثرگذار باشند (۷). وجود برخی عناصر ضدتغذیه‌ای در ترکیبات گیاهی مثل فیتات، ساپونین، پلی‌فنل و تانن، لاتیروژن و گالاکتوزید آلفا و بازدارنده می‌توانند باعث کاهش جمعیت میکروبی روده گردند (۸). هم‌چنین استفاده از پروتئین‌های گیاهی باعث کاهش سلول‌های اپیتلیال روده و کوتاه شدن پرزهای آن می‌شود و مکان اتصال باکتری به روده را کاهش می‌دهد. این امر در طولانی مدت منجر به کاهش بار باکتریایی روده می‌شود. فلور میکروبی روده می‌تواند برخی مواد مغذی که میزبان قادر به هضم آن‌ها نیست را متابولیزه کرده و به محصولات نهایی قابل هضم تبدیل نماید، که این فرآیند بر کارایی فیزیولوژیکی دستگاه گوارش موجود تأثیر مستقیم می‌گذارد (۹). نتایج مطالعات پیشین نشان داده است که استفاده از سطوح بالای منابع مختلف پروتئین گیاهی علاوه بر تأثیر منفی روی رشد ماهیان، بر روی میکروفلور طبیعی روده تأثیر گذاشته و سبب کاهش بار باکتریایی روده ماهیان می‌گردد (۱۰، ۱۱). استفاده از ترکیبات زیست فعال طبیعی امروزه به‌طور گسترده در آبزی‌پروری رایج شده است. ترکیبات گیاهی دارویی امروزه در صنایع غذایی مختلف و در خوراک‌های دام و آبزیان به‌عنوان مکمل استفاده می‌شوند (۱۲). اسپرولینا (*Arthrospira platensis*) از ترکیبات گیاهی نوظهور امروزه به‌عنوان یک مکمل نسبی یا جایگزین کامل پروتئین‌ها در غذای آبزیان مطرح شده است (۱۳). مطالعات نشان داده افزایش مکمل اسپیرولینا به جیره غذایی به‌میزان ۵ درصد می‌تواند سبب بهبود عملکرد شاخص‌های رشد در بچه کپور ماهیان به‌میزان ۵ درصد جیره غذایی (۱۴) و در ماهی تیلاپیا تا ۱۰ درصد جیره غذایی سبب بهبود عملکرد رشد می‌گردد (۱۵). گل میخک (*Syzygium aromaticum*) به‌دلیل داشتن خواص دارویی فراوان در صنایع مختلف کاربردهای فراوانی دارد. این گیاه دارای خواص محرک اشتها، ضدعفونی کننده و بهبود دهنده فعالیت گوارشی است (۱۶). امروزه، گزارش‌های بسیاری از تایید خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی میخک به‌دلیل قدرت حفاظتی آن از تثبیت رادیکال‌های آزاد وجود دارد (۱۷). Mohammadrezaei، تاثیر مثبت حضور گل میخک در جیره را بر عملکرد رشد بچه‌ماهی کپور بیان کرد و این افزایش را به خاصیت ضدباکتریایی این ترکیب و حذف باکتری‌های غیرسودمند نسبت داد (۱۴). علی‌رغم مطالعات صورت گرفته اطلاعات زیادی در خصوص اثرات کاربرد گل میخک و اسپرولینا بر فلور روده ماهیان وجود ندارد. لذا این مطالعه با هدف بررسی میزان اثرگذاری این ترکیبات بر فلور باکتریایی روده انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶۰ عدد بچه‌ماهی انگشت‌قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی ۱±۱۶/۲۰ گرم به‌مدت ۸ هفته با دو جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف پودر جلبک اسپیرولینا ((A1) ۵، (A2) ۱۰ و (A3) ۱۵ درصد) و پودر گل میخک ((B1)۲، (B2) ۴ و (B3) ۶ درصد) برحسب کیلوگرم غذا تغذیه شدند. دمای آکواریوم‌ها در طی دوره آزمایش ۰/۵±۲۴ درجه سانتی‌گراد و تعویض آب به‌صورت روزانه به‌میزان ۲۰ درصد بود. جهت آماده‌سازی تیمارها از غذای بچه‌ماهی ماهی کپورمعمولی شرکت دانه رز بروجرد (پروتیئن ۴۲ درصد، چربی

۱۳ درصد، خاکستر ۱۲ درصد، فیبر ۴/۵ درصد، فسفر ۱ درصد، کلسیم ۱/۶ درصد و رطوبت ۱۰ درصد) استفاده گردید. پس از پودر نمودن غذا، مقادیر پودر اسپیرولینا و گل میخک برحسب درصد حضور در جیره به‌هر کدام از تیمارها اضافه و سپس به‌خوبی مخلوط گردیده و مجدداً توسط چرخ گوشت به شکل گرانول تبدیل و پس از خشک شدن در اختیار بچه ماهیان قرار گرفت.

**استخراج DNA:** پس از پایان دوره لوله‌گوارش ماهیان در شرایط استریل برداشته شد و با استفاده از روش تغییر یافته فنل کلروفرم و هم‌چنین استفاده از کیت شستشو شرکت GeneAll (Combo kit, DNA GeneAll S Korea) استخراج شد. نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده و پس از انتقال به تیوب ۲ سی‌سی مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE (100mM NaCl، 50mM Tris-HCl pH8، 100mM EBTA) ۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد، ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و ۱۰ میکرولیتر آنزیم لایزوزیم به آن‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۵۶ درجه قرار گرفتند. به هر نمونه مقدار ۰/۵ گرم ذرات بیدشیشه‌ای اضافه‌و به‌مدت ۱۵ دقیق ورتکس و بر روی شیکر دورانی قرار گرفتند. محلول هضم شده برای مرحله فنل-کلروفرم به تیوب جدید انتقال داده‌شد. به نمونه ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۲۵:۲۴:۱ فنول/کلروفرم/ایزوآمیل الکل اضافه شد و به‌مدت ۱ دقیق ورتکس صورت گرفت. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس لایه رویی برداشته و به تیوب جدید انتقال داده شد. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و پس از هم زدن سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. لایه رویی به آرامی برداشته و وارد تیوب جدید شد. به نمونه مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه شد و سانتریفوژ به دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. الکل رویی تخلیه و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به نمونه اضافه شد. سانتریفوژ با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. الکل نمونه تخلیه و پلاک DNA در زیر هود خشک گردید. مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به‌نمونه اضافه‌شد. برای سنجش کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و جهت تشخیص کیفیت رشته DNA از ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد (۱۸).

**توالی‌یابی نسل جدید:** مقدار ۲ میکروگرم از DNA استخراج شده جهت ساخته شدن کتابخانه مولکولی و توالی‌یابی نسل جدید (BGI, shenzhen, China) illumina Miseq مورداستفاده قرار گرفت. جهت ساخت کتابخانه بر طبق دستورالعمل استاندارد از پرایمرهای طراحی شده زیر جهت تکثیر ناحیه v3-v4ژن 16srRNA استفاده‌شده است. توالی‌یابی به طول ۳۰۰ جفت باز از دو طرف رفت و برگشت صورت گرفت.

Bakt_341F: (5'Barcode sequence) CCTACGGGNGGCWGCAG
Bakt_805R: (5'Barcode sequence) GACTACHVGGGTATCTAATCC

| گروه باکتری هدف | نام پرایمر | توالی پرایمر | منبع |
|---|---|---|---|
| Firmicutes | Firm934F | GGAGYATGTGGTTTAA TTCGAAGCA | ۱۹ |
| | Firm1060R | AGCTGACGACAACCAT GCAC | ۱۹ |
| Bacteroides | Bact934F | GGARCATGTGGTTTAA TTCGATGAT | ۱۹ |
| | Bact1060R | AGCTGACGACAACCAT GCAG | ۱۹ |

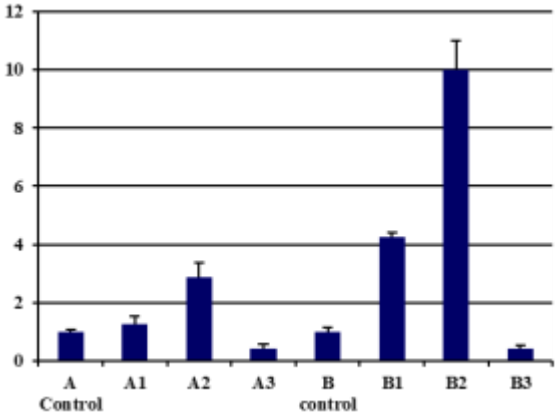
**آنالیز توالی:** نتیجه توالی‌یابی به‌صورت فایل Fastq خام رفت و برگشت به‌دست آمد. توالی‌های به‌دست آمده جهت ارزیابی کیفی وارد نرم‌افزار FastQC (۲۰) شد. خوانش واجد کمیت phred بالاتر از ۳۰ جهت آنالیزهای بعدی استفاده شد. توالی‌ها وارد نرم‌افزار geneious IR9.1.8 شدو در بخش Trim and filter بخش‌های بارکدو توالی‌های با طول کم‌تر از ۵۰ جفت باز حذف شدند. سپس در بخش Merge توالی‌های متناظر دوطرفه بر روی هم مرتب و یکپارچه‌سازی شدند. توالی نهایی شده در بخش bacterial diversity آنالیز مبتنی بر BLAST بانک اطلاعاتی RDP بارگذاری شد و مورد آنالیز شناسایی OTU قرار گرفت. هم‌چنین نتیجه نهایی در بانک اطلاعاتی SilvaNGS (۲۱) بارگذاری و مورد آنالیز کیفی و کمی قرار گرفت.

**آنالیز کمی‌سازی مبتنی بر Real Time PCR:** نمونه‌های DNA استخراج‌شده با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر نرمال‌سازی و جهت واکنش‌های کمی‌سازی PCR در دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI, USA) با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در ۳ تکرار اجرا شد. مقدار ۵ میکرولیتر مخلوط کیت SYBRgreen 2x (Ampliqon high ROX, Denmark) به همراه ۰/۲ میکرومولار پرایمرهای رفت و برگشت (جدول زیر) و ۱ میکرولیتر DNA در واکنش استفاده شد. برنامه دمایی شامل دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه سپس ۴۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه و درنهایت ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. جهت تایید اختصاصی بودن پرایمرها برای گروه‌های باکتریایی هدف از آزمون نقطه ذوب از دمای ۷۰ درجه تا ۹۵ درجه با شیب دمایی ۰/۳ درجه استفاده شد. نتایج به‌صورت اعداد Ct نرمال شده وارد نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ شد و مورد ارزیابی کمی‌سازی نسبی قرار گرفت. نمونه‌های کنترل و ژن 16srDNA با پرایمرهای عمومی به‌عنوان مبنای نرمالی‌سازی استفاده شدند (۲۰).

**آنالیز آماری:** این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی ساده انجام گردید که در پایان در پایان داده‌های به‌دست آمده پس از بررسی نرمال بودن، با استفاده از نرم‌افزار Spss تجزیه و تحلیل شدند.

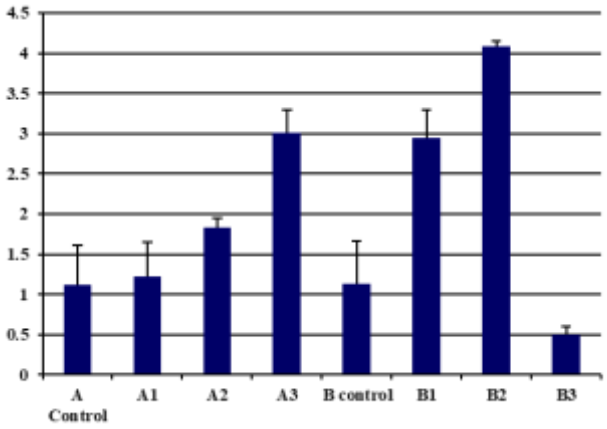
## نتایج

آنالیز نتایج حاصل از مطالعه اثر اسپرولینا و گل میخک بر روی فلور باکتریایی بچه‌ماهی کپور نشان داد که افزایش پودر اسپرولینا و گل میخک می‌تواند بر میزان فعالیت باکتری‌های روده‌ای تاثیرگذار باشد. طبق شکل ۱ با افزایش میزان پودر اسپرولینا به جیره ماهیان تا سطح ۱۰ درصد فعالیت باکتری‌های فرمی کویت افزایش یافته به شکلی که بالاترین سطح فعالیت در این سطح مشاهده می‌گردد ولی با افزایش این میزان به سطح ۱۵ درصد این فعالیت کاهش نشان داد و به سطح کم‌تر از تیمار شاهد رسید. در بچه‌ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف پودر گل میخک نیز روند مشابه‌ای مشاهده گردید، در این گروه نیز افزایش تا ۴ درصد به جیره سبب افزایش فعالیت باکتری‌های فرمی کویت گردید. این روند با افزایش این سطح به ۶ درصد متوقف و روند کاهشی شدیدی را نشان داد (شکل ۱).



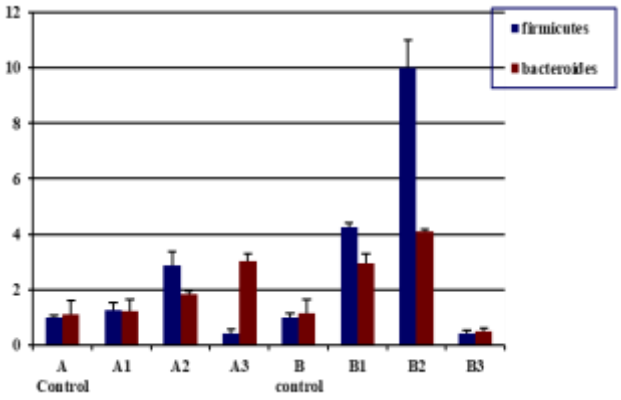

**شکل ۱: نمودار میزان فعالیت باکتری‌های فرمی کویت در دستگاه گوارش بچه‌ماهی کپور تغذیه شده با سطوح مختلف پودر جلبک اسپرولینا (A) و پودر گل میخک (B)**

طبق شکل ۲ حضور پودر اسپرولینا در جیره غذایی سبب افزایش فعالیت باکتری‌های باکتروئیده شده و این فعالیت با افزایش درصد حضور این ماده غذایی در جیره روند افزایشی را نشان می‌دهد. به این ترتیب بیش‌ترین فعالیت این سری از باکتری‌ها در تیمار حاوی ۱۵ درصد پودر اسپرولینا مشاهده گردید. از سوی دیگر در بچه‌ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی گل میخک این افزایش فعالیت باکتریایی باکتروئیده‌ها در تیمار حاوی ۴ درصد پودر گل میخک مشاهده گردید. این روند با افزایش درصد این ترکیب در جیره غذایی سبب کاهش فعالیت باکتروئیده‌ها شد. این فعالیت در مقایسه با تیمار شاهد نیز از سطح کم‌تری برخودار بود.




**شکل ۲: نمودار میزان فعالیت باکتری‌های باکتروئیده‌ها در دستگاه گوارش بچه‌ماهی کپور تغذیه شده با سطوح مختلف پودر جلبک اسپرولینا (A) و پودر گل میخک (B)**

مقایسه میزان فعالیت باکتری‌های فرمی کویت و باکتروئیده‌ها تحت تاثیر حضور دو ترکیب پودر اسپرولینا و گل میخک نشان داد وجود ترکیبات فوق سبب تغییر فعالیت باکتریایی می‌گردد. طبق شکل ۳ میزان فعالیت فرمی کویت‌ها بیش‌تر از باکتروئیده می‌باشد. در تیمار شاهد سطح فعالیت هر دو سری باکتری‌ها یکسان بوده ولی با تغییر سطح پودر اسپرولینا و گل میخک تغییرات در میزان فعالیت باکتری‌ها در تیمارهای متفاوت مشاهده شد.




**شکل ۳: نمودار میزان فعالیت باکتری‌های فرمی کویت و باکترویئده در دستگاه گوارش بچه‌ماهی کپور تغذیه شده با سطوح مختلف پودر جلبک اسپرولینا (A) و پودر گل میخک (B)**

## بحث

مطالعات بسیار زیادی نشان داده‌اند که تحت شرایط فیزیولوژیک نرمال ویژگی شیمیایی غذای هضم شده نقش اساسی در کنترل فلور

باکتریایی روده دارد (۲۲). میکروبیوتای دستگاه گوارش جمعیت متنوعی از میکروارگانیسم‌ها است که نقش‌های مهم متنوعی در بیولوژی سلول‌های میزبان دارد. ژنتیک، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، فعالیت متابولیکی، شیمی آب، دما و سطح غذایی بر میکروبیوتای دستگاه گوارش تاثیر قابل توجه‌ای دارد (۱۲). در مطالعه حاضر باکتری‌های فرمی کویت و باکترویئده گروه تحت تاثیر تیمارهای غذایی اختلافاتی را نشان دادند. مطالعات بسیاری نشان داده که Proteobacteria، Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes و Actinobacteria کلونی‌های باکتریای غالب در دستگاه گوارش ماهی هستند (۲۳). در مطالعه luo و همکاران، مشخص کردند که میزان بار باکتری فرمی کویت‌ها در روده ماهی کپور سرگنده بر حسب حضور نوع فیتوپلانکتون‌ها در آب متفاوت است (۲۴). مطالعات مشابه‌ای نیز در تیلاپیا، کپور معمولی و گربه‌ماهی نیز گزارش شده است. آنالیزها نشان داد افزایش ترکیبات گیاهی به جیره می‌تواند سبب افزایش فعالیت‌های باکتری فرمی کویت‌ها و باکتروئیده‌ها شود. البته این افزایش برای فرمی کویت‌ها در دو ترکیب تا سطح مشخصی مشاهده گردید (پودر اسپرولینا ۱۰ درصد و گل میخک ۴ درصد) و افزایش بیش‌تر از این سطوح سبب کاهش فعالیت حتی در مقایسه با تیمار شاهد شد. کاهش بار باکتریایی روده در اثر افزایش منابع گیاهی در فیل‌ماهی (۲۵) و قزل‌آلای رنگین کمان (۲۶) گزارش شده است. این عملکرد را شاید به توان به تغییر ساختار و عملکرد روده در اثر مواجه با حجم بالای پروتئین گیاهی و ترکیبات ضدتغذیه‌ای موجود در آن‌ها نسبت داد، که منجر به التهاب روده می‌گردد (۲۵). فرمی کویت‌ها و باکتروئیده‌ها می‌توانند سبب بهبود عملکرد رشد در آبزیان شوند (۲۷). اعضا شاخه فرمی کویت‌ها نقش مهمی در متابولیسم، هضم و جذب پروتیئن و سایر مواد مغذی دارند (۲۸). در مطالعه شاخص‌های رشد کپور ماهی با تیمارهای غذایی مشابه چنین افزایش و روندی توسط Mohammadrezaei گزارش شده است (۱۴). طبق نتایج افزایش سطح فرمی کویت‌ها می‌تواند با افزایش جذب مواد مغذی در ارتباط باشد در حالی‌که افزایش باکترویئده‌ها با بالا رفتن گلیکوژن، نشاسته و پلی‌ساکاریدهای هیدرولیز شده مرتبط می‌باشد (۱۲). میکروبیوتای روده اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه مهم را در اختیار میزبان قرار می‌دهد. در ماهی، تخمیر کربوهیدرات بیش‌تر توسط اعضای جنس *Bacteroides*، (تولیدکنندگان شناخته شده اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه) نقش مهمی در برابر التهاب روده ایفا می کنند، انجام می شود (۲۹). بر این اساس می‌توان افزایش میزان باکترویئده‌ها با افزایش سطح اسپرولینا در ماهیان تغذیه شده با این ترکیب را ناشی از انباشت کربوهیدرات در دستگاه گوارش دانست. این روند نیز در ماهیان تغذیه شده با گل میخک نیز مشاهده می گردد با این تفاوت که در غلظت‌های بالای ترکیبات ضدباکتریایی گل میخک مانع رشد گروه از باکتری‌ها شده است. این موضوع را می‌توان به افزایش ترکیبات ضدتغذیه‌ای ناشی از مصرف زیاد گل میخک نسبت داد. طبق مطالعات نسبت فرمی کویت‌ها به باکتروئیده‌ها در کپور ماهیان تغذیه شده با ترکیب ضدتغذیه‌ای افزایش می‌یابد. درحالی‌که این نسبت در ماهیان تغذیه شده با کاراتنوئیدها بسیار اندک می‌باشد (۱۲). Roohi و همکاران، نتایج مطالعات پیشین نشان داده‌اند که استفاده از سطوح بالای منابع مختلف پروتئین گیاهی علاوه بر تأثیر منفی روی رشد ماهیان، بر روی میکروفلور طبیعی روده تأثیر گذاشته و سبب کاهش بار باکتریایی روده ماهیان می‌گردد. هم‌چنین این اختلاف را می‌توان به تفاوت ساختاری هر دو ترکیب نسبت داد. نسبت‌های مختلف فیبر ممکن است منجر به ساختارهای مختلف میکروبیوتای روده شود (۳۰). به‌طورکلی، دستگاه گوارش کپور گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار به‌دلیل زمان نگه‌داری کوتاه‌تر، سطح اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه کم‌تری را نشان می‌دهد. بنابراین، استفاده از مکمل‌های پیش و پروبیوتیک در جیره این ماهی مناسب می‌باشد (۳۱). فراوانی نسبی بین Firmicutes و Bacteroidetes با چاقی مرتبط است و با هم، میزبان را به جذب موثر انرژی در غذا کمک می کند (۳۲). در این مطالعه، فراوانی فرمی‌کویت‌ها در اکثر گروه‌ها بیش‌تر از باکترویدیت‌ها بود که ممکن است با متابولیسم انرژی مرتبط باشد. بررسی استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی سنتی در آبزی‌پروری یک نیاز ضروری جهت اجرای موفقیت‌آمیز یک سیستم تولید گوشت امن و عاری از آنتی‌بیوتیک است که ممکن است با اهمیت اقتصادی بالایی همراه باشد. براساس یافته‌ها مشخص گردید که مکمل‌های گیاهی به طور مثبت بر باکتری‌های مفید میکروبیوتای روده کپور تأثیر می‌گذارند و می‌توانند یک استراتژی کارآمد برای آبزی‌پروری فراهم کنند که ایمنی میزبان و پایداری تولید ماهی را بهبود ببخشند.

## تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه ملایر و معاونت پژوهشی آن دانشگاه (۵۱۸-۱-۸۴/۹) به‌انجام رسید که بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خویش را اعلام می‌دارند.

## منابع

1. **Nayak, S.K., 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research. 41(11): 1553-1573.
2. **Birkbeck, T.H. and Ringo, E., 2005.** Pathogenesis and gastrointestinal tract of growing fish. In: Microbial Ecology in Growing Animals (eds. Holzapfel, W. and Naughton, P.,). Elsevier, Edinburgh, UK. 208-234.

**3.** **Ringo, E., Strom, E. and Tabachek, J.A., 1995.** Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquaculture Research. 26: 773-789.

**4.** **Cahill, M.M., 1990.** Bacterial flora of fishes: a review. Microbial Ecology. 19: 21-41.

**5.** **Hansen, G. and Olafsen, H.J.A., 1999.** Bacterial Interactions in early life stages of marine Cold-water Fish. Microbial Ecology. 38(1): 1-26.

**6.** **Uchii, K., Matsui, K., Yonekura, R., Tani, K., Kenzaka, T., Nasu, M. and Kawabata, Z., 2006.** Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of Bluegill *(Lepomis macrochirus)* with three different feeding habits. Microb Ecol. 51(3): 277-284. doi: 10.1007/s00248-006-9018-z. Epub 2006 Apr 5. PMID: 16596440.

**7.** **Ringo, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S. and Krogdahl, Å., 2006.** Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. Aquaculture. 261: 829-841.

**8.** **Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2001.** Antinutritional factors present on plant-derived alternate fish feed ingredient and their effects in fish. Aquaculture. 199: 197-222.

**9.** **Shangong, W., Tianheng, G., Yingzhen, Z., Weiwei, W., Yingyin, C. and Guitang, W., 2010.** Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture. 303: 1-7.

**10.** **Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.R., Bøgwald, J., Castex, M. and Ringø, E., 2010.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture. 302: 1-18

**11.** **Cappuccino, N., Mackay, R. and Eisner, C., 2002.** Spread of the invasive alien vine *Vincetoxicum rossicum*: trade-offs between seed dispersibility and seed quality. Am Mus Novit. 148: 263-270.

**12.** **Feher, M., Fauszt, P., Tolnai, E., Fidler, G., Pesti-Asboth, G. and Stagel, A., 2021.** Effects of phytonutrient-supplemented diets on the intestinal microbiota of *Cyprinus carpio*. PLoS ONE. 16(4): e0248537. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248537

**13.** **Volkman, H., Imianovsky, U. and Oliveira, J.L.B., 2008.** Santanna ES. Cultivation of arthrospira *(Spirulina platensis)* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. Braz. J. Microbiol. 39(1): 98-101. http://dx.doi.org/10. 1590/S1517- 83822008000100022.

**14.** **Mohammadrezaei, D., 2020.** Effect of spirulina and clove powder on growth performance and carcass composition in common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environment. 12(2): 189-194. (In Persian)

**15.** **Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Abdel-Hadi, Y.M. and Seden, M.E.A., 2008.** Use of spirulina (*Arthrospir platensis*) as a growth and immunity promoter for nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry challenged with pathogenic Aeromonas hydrophila. 8 th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 1015- 1032.

**16.** **Zargari, A., 1999.** Medicinal plants. Second volume. Tehran University Publications.

**17.** **Merchan, A., Munoz Acevedo, A.Y., Vargas Mendez, L. and Kouznetsov, V., 2011.** Scavenger activity evaluation of the Clove Bud Essential Oil (*Eugenia caryophyllus*) & Eugenol Derivatives Employing ABTS+• Decolorization. Scientia Pharmaceutica. 79: 779-791.

**18.** **Tabarrok, M., Seyfabadi, J., Salehi Jouzani, Gh. and Younesi, H., 2021.** Fungal metagenome diversity of recirculating aquaculture and biofloc rearing systems of common carp (*Cyprinus carpio*) by using ITS 2. Journal of Animal Environment. 13(1): 305-312. (In Persian)

**19.** **Lee, J.R., Muthukumar, T., Dadhania, D., Toussaint, N.C., Ling, L., Pamer, E. and Suthanthiran, M., 2014.** Gut Microbial Community Structure and Complications Following Kidney Transplantation: A Pilot Study. Transplantation. 98(7): 697-705. doi:10.1097/TP.000000 0000000370.

**20.** **Brown, J., Meg, P., Lee, A.M., 2017.** FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. Bioinformatics. 33(19): 3137-3139.

**21.** **Glöckner, F.O., 2019.** The SILVA database project: an ELIXIR core data resource for high-quality ribosomal RNA sequences. Biodiversity Information Science and Standards. 3: p.e36125.

**22.** **Cannon PR. 1921** The Effects of Diet on the Intestinal Flora. The Journal of Infectious Diseases. 29(4): 369-385.

**23.** **Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E. and Zhou, Z.G., 2018.** Progress in fish gastrointestinal microbiota research. Rev Aquac. 10: 626-640.

**24.** **Luo, M., An, R., Fu, J., Wan, S., Zhu, W. and Wang, L., 2022.** Comparative analysis of the gut microbiota in bighead carp under different culture patterns. Journal of Applied Microbiology. 132: 1357-1369. https://doi.org/ 10.1111/jam.15248.

**25.** **Roohi, M., Agh, N. and Rezazadbari, M., 2015.** Effects of plant-based diets on the bacterial counts and bacterial community composition of beluga sturgeon (*Huso huso*). J of Veterinary Research. 17(1): 117-125. (In Persian)

**26.** **Desai, A.R., Links, M.G., Collins, S.A., Mansfield, G.S., Drew, M.D., Van Kessel, A.G. and Hill, J.E., 2012.** Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 134: 350-353.

**27.** **Tran, N.T., Li, Z., Wang, S., Zheng, H., Aweya, J.J. and Wen, X., 2020.** Progress and perspectives of shortchain fatty acids in aquaculture. Rev. Aquac. 12: 283-298. https://doi.org/10.1111/raq.12317.

**28.** **Berry, D., 2016.** The emerging view of firmicutes as key fibre degraders in the human gut. Environ. Microbiol. 18: 2081-2083. doi: 10.1111/1462-2920.13225

**29.** **Ramı´rez, C., Coronado, J., Silva, A. and Romero, J., 2018.** Cetobacterium Is a Major Component of the Microbiome of Giant Amazonian Fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. Animals. 8: 189. https://doi.org/10.3390/ani 8 110189

**30.** **Llewellyn, M.S., Boutin, S., Hoseinifar, S.H. and Derome, N., 2014.** Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. Front. Microbiol. 5: 207. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207

**31.** **Hao, Y.T., Wu, S.G., Jakovlić, I., Zou, H., Li, W.X. and Wang, G.T., 2017.** Impacts of diet on hindgut microbiota and short-chain fatty acids in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquac. Res. 48: 5595-5605. https://doi.org/10.1111/are.13381

**32.** **Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H. and Wang, K., 2008.** Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. Lett. Appl. Microbiol. 47: 367-373.