جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت

تکاور محمدیان[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، مجتبی علیشاهی[۳]، محمدرضا تابنده[۴] و داریوش غریبی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۵

خلاصه

باکتری‌های اسید لاکتیک، متدوالترین نوع باکتری‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند. هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت بود. به این منظور ۵۰ قطعه ماهی شیربت (با میانگین وزن ۲۶۵/۹۷±۸۰۰/۸۲) از منابع آبی استان خوزستان صید و به آزمایشگاه منتقل و فلور باکتریایی روده‌ی آن‌ها بررسی گردید. باکتری‌های اسید لاکتیک روده‌ی نمونه‌ها توسط روش‌های فنوتیپی (رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) جداسازی و تخلیص گردید. سپس این باکتری‌ها بر اساس شاخص‌های اولیه پروبیوتیکی شامل: مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی و خاصیت آنتاگونیستی و عدم بیماری‌زایی برای ماهی امتیازدهی و ارزیابی گردیدند. از ۵۰ ماهی بومی شیربت بررسی شده تعداد ۳۰ جدایه مشکوک به باکتری‌های اسید لاکتیک که میله‌ای یا کوکسی شکل (۲۰ باکتری میله‌ای و ۱۰ باکتری کوکسی) بودند، جداسازی گردید. از ۳۰ جدایه‌ی مذکور، تعداد ۲۰ جدایه بر اساس نتایج بیوشیمیایی در جنس لاکتوباسیل قرار نگرفته و تعیین هویت نشدند و در مجموع ۱۰ جدایه (۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۹ و ۳۰) بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی تعیین هویت بیشتر تا حد گونه قرار گرفته و شاخص‌های اولیه پروبیوتیکی آن‌ها ارزیابی گردید. بعد از انجام آزمایش‌های تعیین توان پروبیوتیکی، چهار جدایه دارای بیشترین پتانسیل پروبیوتیکی از میان جدایه‌های لاکتوباسیلی بودند که این چهار جدایه به ترتیب شامل: *L. acidophilus*، *L.brevis* *L. delbruecki* و *L. fermentium* بودند.

کلمات کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، لاکتوباسیل، روده‌ی ماهی شیربت، پروبیوتیک

مقدمه

پرورش آبزیان به عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان، محسوب می‌شود. کمبود منابع آبی، سبب شده است که در اکثر کشورها پرورش متراکم آبزیان، جایگزین روش‌های نیمه متراکم و گسترده گردد. در تولید متراکم، موجودات آبزی همواره در معرض شرایط تنش‌زا و بیماری قرار گرفته و این تنش، موجب ایجاد بیماری و ضررهای اقتصادی می‌گردد. از آن جا که واکسن‌ها به تنهایی نمی‌توانند به عنوان کنترل کننده‌ی عمومی بیماری‌ها در آبزیان استفاده شوند یک روش جدید، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک (مانند لاکتوباسیل‌ها) در کنترل پاتوژن‌های بالقوه است. درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی در کنترل بیماری در صنعت آبزی‌پروری اهمیت دارد، با این حال استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها احتمال مقاوم شدن میکروارگانیسم‌ها به دارو را زیاد کرده و هم‌چنین ممکن است میکروب‌های معمول حاضر در روده‌ی ماهی را که بسیار مفیدند، از بین ببرند (Mesalhy Aly et al. 2008). مطالعات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها، می‌توانند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها

[۱*] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: Takavar_m2002@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] استادیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۵] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

و مواد شیمیایی شوند و در پیشگیری از پاتوژن‌های شناخته شده در بیماری‌های مختلف آبزیان استفاده شوند (Van hai et al. 2007). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با استقرار در محیط روده، مانع فعالیت میکروارگانیسم‌های غیر مفید و پاتوژن می‌شوند (Klaenhammer 2000). باکتری‌های اسید لاکتیک، مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده، که شامل باکتری‌های متنوعی مثل لاکتوباسیل است. لاکتوباسیل‌ها، باسیل‌های گرم مثبت، بدون حرکت، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی‌اند، که قندهای مختلف را به لاکتات و استات تبدیل می‌کنند (Gatesoupe 2008). اکثر لاکتوباسیل‌ها بی‌خطر بوده و ممکن است، آنتاگونیست باکتری‌های پاتوژن باشند (Azizpour et al. 2009, Cai et al. 1999). در طی دو دهه گذشته چندین مطالعه در مورد حضور باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهی صورت گرفت. Gonzalez و همکاران در سال ۲۰۰۰ باکتری‌های اسید لاکتیک ماهیان آب شیرین را مورد بررسی قرار دادند هم‌چنین Seema Nair و Surendran در سال ۲۰۰۵ باکتری‌های جدا شده از ماهی و میگو را به روش بیوشیمیایی تعیین هویت نمودند.

لاکتوباسیل‌های با مقاومت بالا به اسید و صفرا و دارا بودن خواص ضد میکروبی قوی، می‌توانند گزینه‌ی مناسبی برای تهیه‌ی مکمل‌های پروبیوتیکی باشند. در این زمینه مطالعات جامعی توسط Buntin و همکاران در سال ۲۰۰۸، Vijavabaskar و همکاران در سال ۲۰۰۸، Balcázar و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Grześkowiak و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت. این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی چنین جدایه‌های از این باکتری از روده‌ی ماهی شیربت (*Barbus grypus*) که از ماهیان بسیار با ارزش بومی خوزستان و برخی کشورهای هم‌جوار ایران است، صورت گرفت. از نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌توان در تهیه‌ی مکمل‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در پرورش این ماهی و شاید سایر آبزیان بهره برد و زمینه‌ی تولید بیشتر این ماهی ذائقه پسند را فراهم نمود.

مواد و روش کار

تهیه ماهی

جهت جداسازی لاکتوباسیل‌های روده‌ی ماهی شیربت از چهار منطقه استان (تالاب شادگان، رودخانه‌ی کارون، رودخانه‌ی کرخه، استخرهای پرورش ماهی شهرستان شوشتر) تعداد ۵۰ قطعه ماهی با وزن‌های مختلف و ظاهری سالم به طور تصادفی صید و به کمک ظروف پلاستیکی ۱۰۰ لیتری و اکسیژن‌دهی با وسایل جانبی در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهیدچمران منتقل شدند.

جداسازی و خالص‌سازی لاکتوباسیل‌ها

ماهی‌ها آسان‌کشی شده، وزن و طول آن‌ها، به طور دقیق اندازه‌گیری و ثبت شد. روده‌ی ماهی در شرایط استریل، در کنار شعله، خارج و در جهت طولی برش داده شد. محتویات روده دور ریخته شد و داخل روده با سرم فیزیولوژی شستشو گردید. مقدار ۱ گرم از بافت هموژن شده‌ی روده به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد تا سوسپانسیون ۱:۱۰ آن به دست آید. به همین ترتیب رقت‌های بر مبنای ده از نمونه‌ی اولیه تهیه گردید. بعد از مشخص شدن بهترین رقت، نمونه در محیط MRS آگار، کشت سفره‌ای داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شده و سپس از کلنی‌های مشکوک ساب کالچر تهیه شده و مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) انجام گرفت.

تشخیص جنس لاکتوباسیل

جهت تشخیص جنس لاکتوباسیل، بر اساس روش توصیه شده توسط Sharpe در سال ۱۹۷۹ از آزمایش‌های مختلف بیوشیمیایی (تخمیر قندها، آزمایش حرکت، رشد در دماهای مختلف) استفاده شد. آزمایش مصرف قندهای

مختلف به منظور تشخیص جنس صورت گرفت، قندهای مورد استفاده شامل گلوکز، آرابینوز، رافینوز، رامنوز، گزیلوز، ترهالوز، ساکاروز، لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز و مانیتول بود. رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تا یک هفته مورد بررسی قرار گرفت (اسماعیلی و همکاران ۱۳۸۸). رشد تمامی جدایه‌ها در دو محیط انتخابی مک‌کانکی (جهت تمایز از جنس انتروکوک) و استات آگار (pH=۵/۴) (جهت تمایز جنس لاکتوباسیل از سایر باکتری‌های اسید لاکتیک) جهت تأیید آزمایش‌ها صورت گرفت (Quinn et al. 1994).

بررسی توان پروبیوتیکی

تحمل نسبت به pH

جهت بررسی تحمل نسبت به شرایط مختلف pH سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در PBS حاوی HCl با pH بین ۱/۵ تا ۹ قرار داده شد و سپس در رقت‌های متوالی PBS استریل (در سه تکرار) رقیق گردیده و شمارش شد (Grześkowiak et al. 2011).

تحمل نسبت به صفرا

برای سنجش تحمل جدایه‌های لاکتوباسیلی به دست آمده نسبت به صفرا از روش Nikoskelainen et al. 2001, 2003 استفاده شد. به طور خلاصه صفرا از ماهی شیربت تهیه گردیده و سوسپانسیون باکتری به مدت ۱ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف صفرا (صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵) در سه تکرار قرار داده شده و تعداد باکتری پس از زمان فوق، با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد صفرا) مقایسه گردید.

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی

جهت بررسی فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده‌ی ماهی شیربت، از روش Jayanth و همکاران در سال ۲۰۰۱ با کمی تغییرات استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا از کشت ۱۸ ساعته لاکتوباسیلوس‌ها در محیط آبگوشت MRS به کمک میکروپیپت کشت خطی در مرکز پلیت روی محیط MRS آگار تهیه و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری گردید، سپس از کشت ۱۸ ساعته‌ی *آئروموناس هیدروفیلا* در محیط TSB عمود بر کشت لاکتوباسیل تا ۱ میلی‌متری آن (در سه تکرار) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوباسیون و منطقه مهار رشد (فاصله‌ی بین لاکتو باسیل و آئروموناس) با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

عدم بیماری‌زایی برای ماهی

اثرات مضر احتمالی باکتری‌های جدا شده از روده‌ی ماهی شیربت، بر اساس روش Brunt و Austin در سال ۲۰۰۵ اندازه‌گیری شد. برای این کار پس از کشت و شستشوی باکتری‌های پروبیوتیک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی ۳×۱۰^{۸} CFU/ml به صورت عضلانی و داخل صفاقی در گروه‌های مجزا (در هر گروه تعداد ۲۰ قطعه) به ماهی شیربت تزریق گردید و پرورش در حوضچه‌های ۹۰ لیتری فایبرگلاس انجام گرفت. به ماهیان گروه کنترل فقط سرم فیزیولوژی تزریق می‌شود. از ماهیان تلف شده احتمالی، بی‌حال و زنده پس از گذشت هفت روز بررسی‌های باکتری‌شناسی به عمل آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS به طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. به منظور مقایسه‌ی شاخص‌های تیمارهای تحت بررسی از آنالیز واریانس یک طرفه، دو طرفه و آزمون توکی استفاده گردید. α=۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید. نتایج به صورت Means±SD مطابق روش Kulikovsky و همکاران در سال ۱۹۹۶ ارائه شد.

نتایج

ماهیان مورد مطالعه ۲۶۵/۹۷±۸۰۰/۸۲ گرم وزن بودند. در ۱۷ قطعه ماهی (۷ قطعه از آب‌های رودخانه کرخه، ۵ قطعه از آب‌های رودخانه کارون، ۳ قطعه از تالاب شادگان و ۲ قطعه از آب‌های پرورش ماهی منطقه شوشتر)، حتی بعد از ۷۲ ساعت هیچ کلونی متعلق به باکتری‌های اسید لاکتیک در پلیت MRS آگار مشاهده نشد. از مجموع ۳۳ نمونه باقی‌مانده، باکتری‌های متعددی جدا شد که از آن میان تعداد ۳۰ جدایه باکتری مشکوک به باکتری‌های اسید لاکتیک که میله‌ای یا کوکسی شکل (۲۰ باکتری میله‌ای و ۱۰ باکتری کوکسی) با کلونی‌های کرمی رنگ ۱ تا ۲ میلی‌متری، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند، مورد بررسی‌های بیشتر قرار گرفتند. از ۳۰ جدایه‌ی مذکور، تعداد ۲۰ جدایه بر اساس نتایج بیوشیمیایی (ویژگی‌های حرکت، احیاء نیترات و تولید اورآز، رشد در محیط مکانکی، عدم رشد در محیط استات آگار با pH=۵/۴ و غیره) در جنس لاکتوباسیل قرار نگرفته و تعیین هویت نشدند (Gonzalez et al. 2000). در مجموع ۱۰ جدایه (جدایه‌های ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۹ و ۳۰) بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی مورد تعیین هویت بیشتر تا حد گونه قرار گرفته و از نظر توان پروبیوتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۲: تعداد و نسبت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از روده‌ی ماهیان شیربت در استان خوزستان

کل ماهیان نمونه‌گیری شده	کل باکتری‌های جدا شده		لاکتوباسیلوس		اینتروکوکوس		کارنوباکتریوم		باکتری‌های اسید لاکتیک نامشخص		باکتری‌های خارج از گروه اسید لاکتیک	
	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد
۵۰	۳۰	۱۰۰	۱۰	۳۳/۳	۵	۱۶/۶	۴	۱۳/۳	۸	۲۶/۶	۳	۱۰

تحمل نسبت به pH

در pH های ۱/۵ و ۳ هیچ کدام از باکتری‌ها از خود رشدی نشان ندادند. نتایج حاصل از تست تحمل pH در جدول ۳ نشان داده شده است. جدایه‌های ۱۲، ۲۴، ۱۵ و ۲۲ دارای بیشترین و جدایه‌های ۱۷ و ۲۱ کم‌ترین توان تحمل در برابر اسیدیته‌های مختلف را دارا بودند به طوری که در pH های مختلف اختلاف معنی‌داری با دیگر جدایه‌ها داشتند.

جدول ۳: تحمل جدایه‌های لاکتوباسیلی (CFU/ml) به صورت Means±STDV در غلظت‌های متفاوت pH در طول یک ساعت

باکتری / pH	۱/۵	۳	۴/۵	۶	۷/۵	۹
۱۰(CFU/ml)	–	–	^{Cc}۷/۱۸±۱/۲*$۱۰^{۷}$	^{BCa}۶/۱۳±۱/۴*$۱۰^{۷}$	^{ABa}۸/۵۳±۱/۶*$۱۰^{۷}$	^{Ab}۷/۸۹±۱/۸*$۱۰^{۸}$
۱۲(CFU/ml)	–	–	^{Bg}۱۸/۳±۲/۸*$۱۰^{۷}$	^{Ad}۳۱/۴۱±۳/۸۵*$۱۰^{۷}$	^{Ae}۱۶/۰۵±۳/۲*$۱۰^{۷}$	^{Ae}۱۲/۴۴±۳/۸۳*$۱۰^{۷}$
۱۵(CFU/ml)	–	–	^{Dc}۴۷/۶±۱/۲*$۱۰^{۷}$	^{Cb}۱۲/۲۸±۲*$۱۰^{۷}$	^{Af}۱۴/۸۱±۵/۲*$۱۰^{۷}$	^{Bde}۶/۶۰±۳/۲*$۱۰^{۷}$
۱۷(CFU/ml)	–	–	^{Cb}۱۰/۸۴±۰/۷*$۱۰^{۷}$	^{Ba}۸/۸۳±۱/۰۸*$۱۰^{۷}$	^{Aa}۸/۷۷±۱/۴*$۱۰^{۷}$	^{Ba}۲/۱۶±۰/۷*$۱۰^{۷}$
۱۸(CFU/ml)	-	–	^{Bf}۵/۴۷±۲/۱*$۱۰^{۷}$	^{Ac}۱۷/۴۰±۲/۸*$۱۰^{۷}$	^{Cab}۷/۸۷±۱/۶*$۱۰^{۷}$	^{Bb}۵/۱۲±۲/۱*$۱۰^{۷}$
۲۱(CFU/ml)	–	–	^{Ca}۴/۲۷±۰/۲۵*$۱۰^{۷}$	^{Ba}۱۰/۷۳±۱/۱*$۱۰^{۷}$	^{Ab}۱۰/۵۹±۲*$۱۰^{۷}$	^{Ba}۱۲/۶۰±/۹۷*$۱۰^{۷}$
۲۲(CFU/ml)	–	–	^{Bc}۴/۸±۱/۱*$۱۰^{۷}$	^{Ba}۵/۰۵±۱/۳*$۱۰^{۷}$	^{Ba}۸/۸۳±۱/۶*$۱۰^{۷}$	^{Acd}۲۷/۹۸±۲/۹*$۱۰^{۷}$
۲۴(CFU/ml)	–	–	^{Bef}۷/۵۵±۲*$۱۰^{۷}$	^{Bb}۲۲/۹۸±۲/۱*$۱۰^{۷}$	^{Ad}۷/۰۷±۳/۲*$۱۰^{۷}$	^{Ac}۳۵/۰۹±۳/۸*$۱۰^{۷}$
۲۹(CFU/ml)	–	–	^{Bcd}۵/۳۱±۱/۳*$۱۰^{۷}$	^{Ab}۴/۲۷±۲/۰۳*$۱۰^{۷}$	^{Bb}۷/۴۱±۱/۳*$۱۰^{۷}$	^{Ab}۶/۵۵±۱/۸*$۱۰^{۷}$
۳۰(CFU/ml)	–	–	^{Cce}۶/۳۵±۱/۶*$۱۰^{۷}$	^{Da}۵/۴۴±۱/۳*$۱۰^{۷}$	^{Ac}۴/۸۵±۲/۷۸*$۱۰^{۷}$	^{Bbc}۸/۱۸±۲/۴*$۱۰^{۷}$

* حروف لاتین کوچک غیر مشابه در هر سطر به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است و حروف لاتین بزرگ غیر مشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

تحمل نسبت به صفرا

در این مطالعه بقاء لاکتوباسیل‌ها در جدایه‌های ۲۲، ۳۰، ۲۴ و ۱۸ نسبت به دیگر جدایه‌ها بیشتر بوده و نسبت به گروه کنترل (PBS) دارای اختلاف معنی‌داری بودند (جدول ۴). در بین غلظت‌های مختلف صفرا برای سویه‌های ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۷ و ۲۱ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید اما در سایر جدایه‌ها، میان غلظت‌های صفرا اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). این نکته حائز اهمیت است که غلظت صفرای استفاده شده در این بررسی نسبتاً بالا بود.

جدول ۴: تحمل سویه‌های لاکتوباسیلی (CFU/ml) به صورت Means±STDV در غلظت‌های متفاوت صفرا در طول یک ساعت

باکتری / صفرا	۱۰(CFU/ml)	۱۲(CFU/ml)	۱۵(CFU/ml)	۱۷(CFU/ml)	۱۸(CFU/ml)	۲۱(CFU/ml)	۲۲(CFU/ml)	۲۴(CFU/ml)	۲۹(CFU/ml)	۳۰(CFU/ml)
۲/۵	۰/۵۶±۳۹/۳۰^{ABef}	۰/۵±۱۲/۹۶^{Adef}	۰/۲۴±۲/۵^{Babc}	۰/۱۲±۶/۲۳^{Cab}	۰/۵±۱۳/۰۷^{Adef}	۰/۰۸±۴/۳۴^{Ca}	۰/۶۲±۱۲/۳^{Af}	۰/۳۳±۷/۹۳^{Abcd}	۰/۳۷±۱۲/۴۴^{Acde}	۰/۵۸±۳۲/۰۶^{Aef}
۵	۰/۲۸±۱۱/۸۳^{Babc}	۰/۳۲±۵/۵۶^{Abcd}	۰/۲۸±۱۶/۸۷^{Aabc}	۰/۲±۵/۷۳^{BCab}	۰/۵۹±۹/۸۸^{Acd}	۰/۰۸۶±۱۱/۸۳^{Ca}	۰/۵۳±۱۵/۸۸^{Acd}	۰/۳۱±۳/۳۰^{Aabc}	۰/۳۴±۱۳/۰۷^{Aabc}	۰/۷۲±۷۷/۸۳^{Ad}
۷/۵	۰/۳۶±۱۴/۹۷^{Bab}	۰/۴۲±۵/۶۸^{Babc}	۰/۳۶±۳/۵^{ABab}	۰/۱۶±۱۰/۰۳^{ABa}	۰/۶±۱۵/۸۷^{Ad}	۰/۱۵±۶^{Ba}	۰/۴۹±۱۶/۸۵^{Abcd}	۰/۳۵±۲۳/۷۶^{Aabc}	۰/۲۵±۳۶/۵۶^{Aa}	۰/۵۲±۲۹/۳۷^{Acd}
PBS	۱/۲±۱۱۷/۱۵^{Ab}	۰/۳۳±۴/۷۹^{Ba}	۰/۳۵±۷/۶۳^{Aa}	۰/۲۶±۵/۷۳^{Aa}	۰/۵۲±۱۹/۶۱^{Aa}	۰/۲۳±۳/۴^{Aa}	۰/۵±۴۴/۹۲^{Aa}	۰/۲۷±۱۷/۰۵^{Aa}	۰/۳±۳۵/۲۹^{Aa}	۰/۷۶±۴۰/۷۱^{Aab}

* حروف لاتین کوچک غیر مشابه در هر سطر به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است و حروف لاتین بزرگ غیر مشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی

همه‌ی جدایه‌های لاکتوباسیلی دارای خاصیت آنتاگونیستی بر علیه باکتری بیماری‌زا *آئروموناس هیدروفیلا* بودند. جدایه‌های ۲۴، ۲۲، ۱۵ و ۱۸ به ترتیب دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بودند.

عدم بیماری‌زایی برای ماهی

نتایج حاصل از مطالعات In vivo نشان داد که این لاکتویاسیلوس‌ها هیچ گونه تلفات و ضایعه‌ی بافتی مشخص در ماهی شیربت ایجاد نمی‌کنند.

جدول ۵: فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتوباسیلی (تعداد پرگنه) به صورت Means±STDV بر علیه باکتری بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا

باکتری	۱۰	۱۲	۱۵	۱۷	۱۸	۲۱	۲۲	۲۴	۲۹	۳۰
قطر منطقه مهار (میلی‌متر)	۱۸/۵±۱/۹۱^{a}	۲۴/۵±۱^{ab}	۴۰/۲۵±۹/۲۹^{bc}	۱۵±۱۱/۴۸^{a}	۳۹/۵±۷/۵۴^{bc}	۲۰±۳/۶۵^{a}	۴۰/۵±۱^{bc}	۴۶/۵±۱۲/۷۹^{c}	۳۹±۶^{bc}	۳۹±۴^{c}

* حروف غیر مشابه در هر سطر به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

جدایه‌های مورد بررسی، بر اساس جدول ۱ تعیین هویت تا حد گونه شدند. ایزوله‌های ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۱، ۲۲ و ۲۴ بر اساس نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی به ترتیب *L. farciminis*، *L. carnis*، *L. brevis*، *L. plantarum*، *L. fermentum*، *L. sakei*، *L. delbrueckii*، *L. acidophilus* نامیده شدند و جدایه ۲۹ و ۳۰ تا حد جنس تعیین هویت قرار گرفتند.

بحث

با تغییرات در محتویات غذا می‌توان فلور میکروبی روده‌ی ماهی را تغییر داد. پروبیوتیک‌ها میکروب‌هایی هستند که وقتی به غذا اضافه شوند، بر سلامتی و رشد میزبان تأثیر می‌گذارند (Vijavabaskar and Somasundaram 2008). پروبیوتیک باید با گونه‌ی هدف سازگاری داشته باشد چون در این صورت شانس بهتری برای رقابت با میکروب‌های بومی روده و استقرار در میزبان جدید را خواهد داشت. اثر ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها به تولید آنتی‌بیوتیک، باکتریوسین، سیدروفور، لیزوزیم، پروتئاز و تغییر pH با تولید اسیدهای آلی مربوط می‌شود (Sugita et al. 1998, Bucia et al. 2006). در سال‌های اخیر، جهت افزایش راندمان تولید آبزیان، محققین به دنبال معرفی پروبیوتیک‌های بهتر بوده‌اند. لاکتوباسیل‌ها، می‌توانند پروبیوتیک‌های مناسبی باشند که مطالعه‌ی حاضر به منظور یافتن جدایه‌هایی از لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده‌ی ماهی شیربت که ماهی بومی استان خوزستان است، صورت گرفت. باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک شامل جنس‌های متنوعی هم‌چون: *Lactobacillus*، *Aerococcus*، *Pediococcus*، *Enterococccus*، *Alloicoccus*، *Tetragenococcus* و غیره می‌باشند (Stiles and Holpzapfel 1997, Axelsson 1998). در مطالعه‌ی حاضر باکتری اسید لاکتیک غالب جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شیربت لاکتوباسیلوس بود. لاکتوباسیل‌ها در حال حاضر دارای ۸۸ گونه و ۱۵ تحت گونه است (Coeuret et al. 2003) که در این مطالعه بدون حرکت، فاقد قدرت احیاء کنندگی نیترات و دارای قابلیت رشد در pH پایین بودند. لاکتوباسیل‌ها از روده‌ی ماهی قره‌برون (Askarian et al. 2008)، شاه ماهی، ماهی کریل شمالی و گربه ماهی (Seema Nair and Surendran 2005)، ماهی کپور (Cai et al. 199)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Azizpour 2009)، میگو (Seema Nair and Surendran 2005)، نیز جداسازی شده‌اند. هم‌چنین لاکتوباسیل‌ها قسمتی، از فلور میکروبی روده‌ی ماهیان چار قطبی، فیل ماهی، آزاد ماهی اقیانوس اطلس، روغن ماهی اقیانوس اطلس، فیتوفاگ، کپور معمولی و قزل‌آلای قهوه‌ای را تشکیل می‌دهند (اسماعیلی و همکاران ۱۳۸۸).

در مطالعه‌ی حاضر ۱۰ جدایه لاکتوباسیل جدا شده از روده‌ی شیربت مورد ارزیابی از نظر تحمل شرایط اسیدی

قرار گرفتند. تقریباً تمامی لاکتوباسیل‌ها (به استثنای جدایه‌های ۱۸ و ۳۰) در pH=۴/۵، پس از یک ساعت، با یک روند کاهش تعداد مواجه بودند که با نتایج Succi و همکاران (۲۰۰۵) در مورد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جدا شده از پنیر هم‌خوانی دارد. بعضی از سویه‌های لاکتوباسیل حتی قادر به زنده ماندن در pH=۱، به مدت یک ساعت می‌باشند (Maragkoudakis et al. 2006) اما جدایه‌های لاکتوباسیل این مطالعه حتی در pH=۳، رشد نکردند. در اغلب ماهیان، دستگاه گوارش اسیدی است و تحمل شرایط اسیدی یکی از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد، البته در صورت عدم تحمل قابل توجه شرایط اسیدی و داشتن سایر خصوصیات پروبیوتیکی مثل مقاومت بالا در برابر نمک‌های صفراوی، توان اتصال به سلول‌های اپی‌تلیالی روده و سایر خصوصیات بیولوژیکی مفید می‌توان میکروارگانیسم‌های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارش رساند (لطفی و همکاران ۱۳۸۹).

صفرا نقشی اساسی در مکانیسم دفاعی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله‌ی غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارش میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ تا ۱/۵ درصد است، اما چون تمامی جدایه‌ها به غلظت‌های پایین صفرا مقاوم بودند، غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد صفرا برای ارزیابی قابلیت رشد در حضور نمک‌های صفراوی انتخاب گردید و مشاهده شد، مقاومت جدایه‌ها در برابر این غلظت‌ها یکسان نیست. در مطالعه‌ای Chateau و همکاران (۱۹۹۴)، تأثیر نمک‌های صفراوی بر رشد ۳۸ جدایه لاکتوباسیل، نیمی از جدایه‌های مورد آزمایش به آرامی تحت تأثیر نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد قرار گرفته‌اند و تأخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به یک جذب نوری ۰/۳ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک‌های صفراوی مشاهده شده است. در مطالعه‌ی حاضر نیز در مورد بعضی از سویه‌های آزمایش شده مانند ایزوله‌های ۱۰، ۱۵، ۲۱ و ۳۰ تأخیر در رشد سویه‌های تیمار داده شده با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل (PBS) مشهود بود. احتمالاً نوسان در میزان مقاومت در بین گونه‌های مختلف، ناشی از توانایی لاکتوباسیل‌ها در کاهش اثرات دترجنتی نمک‌های صفراوی است. هیدرولیز آنزیمی نمک‌های صفراوی باعث این مقاومت می‌شود (Maragkoudakis et al. 2006). این آنزیم‌ها حلالیت صفرا را کاهش داده و اثر دترجنتی آن را ضعیف می‌کنند. با این حال تا کنون در مورد غلظت دقیق صفرا جهت ارزیابی تحمل باکتری‌های پروبیوتیکی وجود توافق کلی ندارد (Balcázar et al. 2008).

اولین بار در مورد وجود باکتری‌هایی با خاصیت مهارکنندگی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا مانند جنس آئروموناس، توسط Leonel Ochoa-Solano and Olmos-Soto در سال ۲۰۰۶ گزارش شد. از آن پس اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل‌ها بر عوامل پاتوژن به وفور مورد بررسی قرار گرفته است (Balcázar et al. 2008). در مطالعه‌ی حاضر تمامی جدایه‌های لاکتوباسیل دارای خاصیت ضد باکتریایی بودند اما جدایه‌های ۲۴، ۲۲، ۱۵، ۳۰ و ۱۸ به ترتیب بیشترین مهار رشد *آئروموناس هیدروفیلا* را باعث شدند. Adolfo در سال ۲۰۰۴ گزارش نمود که برخی جدایه‌های لاکتوباسیل قادرند که عوامل بیماری‌زای ماهی و حتی انسان را با ایجاد حالت اسیدی ناشی از وجود غلظت بالای گلوکز مهار کنند.

در کپور ماهیان، به علت اسیدی نبودن دستگاه گوارش، توان تحمل اسید در رتبه سوم پس از قدرت مهار کنندگی و تحمل صفرا قرار می‌گیرد. در این مطالعه باکتری‌های ۲۴، ۲۲ و ۱۵ که به عنوان *L. acidophilus*، *L. delbrueckii*، *L. brevis* شناسایی شدند به ترتیب دارای بیشترین پتانسیل پروبیوتیکی از میان جدایه‌های لاکتوباسیلی بودند و می‌توان به صورت مکمل پروبیوتیکی به غذای آبزیان اضافه گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاری علمی و عملی جناب آقای سعید غلیم‌پور، مهندس سواری، سرکار خانم اصفهانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند.

منابع

اسماعیلی، پریسا؛ مظفری‌نور، امیر و شناورماسوله، علیرضا (۱۳۸۸) . جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در روده تاس‌ماهی ایرانی. مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، سال سوم، شماره سوم، صفحه ۱۳-۱۸.

لطفی، حاجیه؛ حجازی، محمدامین؛ زنجانی، بهرام‌ملکی و برزگری، ابوالفضل (۱۳۸۹). جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های با پتانسیل پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب. مجله پژوهش‌های صنایع غذایی. جلد ۳، شماره ۱، صفحات ۱-۱۷.

Adolfo, B.G. (2004). Lactobacillus plantarum 44A as a live feed supplements for freshwater fish. PhD Thesis, The Netherlands with Summaries in English, Dutch and Spanish, Wageningen Universities, Wageningen The Netherlands ISBN., 90: 5808- 5943.

Askarian, F.; Matinfar, A.; Kousha, A.; Bahmani, M.; Khorshidi, K.; Shenavar, A. et al. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in the gastrointestinal tracts of reared Beluga (*Huso Huso*) and Persian sturgeon (*Asipenser persicus*): a Comparative study Journal of Fisheries and Aquatic Science. 3(5):302-311.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classi¢ca tion and physiology. In lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects 2nd ed. (Eds S. Salminen and A. wonWright) pp. 1-72. NewYork, Marcel Dekker Inc.

Azizpour, K. (2009). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west Azerbaijan, Iran. Journal of Biological Science. 4(3):324-326.

Azizpour, K.; Tkmechi, A. and Agh, N. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp of west Azerbaijan, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances. 8(6):1162-1164.

Balcázar, J.; Vendrell, D.; Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J.L. and Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. 278:188-191.

Brunt, J. and Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control laclococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 28: 693-701.

Bucio, A.; Hartemink, R.; Schrama, J.W.; Verreth, J. and Rombouts, F. M. (2006). Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiology. 23(5):476-482.

Buntin, N.; Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin Journal of Science and Technology,30 (Suppl.1): 141-148.

Cai, Y.; Suyanandana, P.; Saman, P. and Benno, Y. (1999). Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General and Applied Microbiology. 45:177-184.

Chateau, N.; Deschamp, A.M. and Hadj Sassi, A. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology, 18: 42–44.

Coeuret, V.; Dubernet, S.; Bernardeau, M.; Gueguen, M. and Vernoux, J.P. (2003). Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. EDP Sciences. 83: 269–306.

Gatesoupe F.J. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14(1-3):107-114.

Gonzalez, C.J.; Encinas, J.P.; Garcia-Lopez, M.L. and Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. Food Microbiology. 17: 383-391.

Grześkowiak, L.; Collado, M.C.; Vesterlund, S.; Mazurkiewicz, J. and Salminen, S. (2011). Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: Quantitative analysis. Aquaculture, 318, 33–36.

Jayanth, K.; Jeyasekaran, G. and Shakila, R.J. (2001). Biocontrol of Fish Bacterial Pathogens by the Antagonistic Bacteria isolated from the Coastal Waters of Gulf of Mannar, India. Bulletin of European Association of Fish Pathologist, 21: 12-18.

Klaenhammer, T.R. (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition 130: 415s- 416s.

Kulikovsky, Z.; Martin, F.J.B. and Yaron, Z. (1996). A comparison of two spawning inducing agent for common carp. Israel Journal of Aquacultuare, 48: 108-111.

Leonel Ochoa-Solano, J. and Olmos-Soto J. (2006). The functional property of Bacillus for shrimp feeds. Food Microbioogy, 23; 519-525.

Maragkoudakis, P.A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. and Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy Journal, 16: 189-199.

Mesalhy Aly, S.; Abd-Rahman, A.Z.; John, G. and Mohamed, M.F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture. 277: 1-8.

Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology, 15:443-452.

Nikoskelainen, S.; Salminen, S., Bylund, G. and Ouwehand, A.C. (2001). Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseasea in fish. Applied and Environment Microbiology, 67(6):2430-2435.

Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.K. and Carter, G.R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe publication British Library.

Seema Nair, P. and Surendran, P. (2004-2005). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of Culture Collections. 4:48-52.

Sharpe, M.E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. In: . Skinner, F.A., Lovelock, D.W. (Eds.), Identification Methods For Microbiologists, Academic Press, London, pp. 233–259.

Stiles, M.E. and Holpzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology. 36, 1-29.

Succi, M.; Tremonte, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L.; Pacifico, S. et al. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol. 244: 129-137.

Sugita, H.; Hirose, Y.; Matsuo, N. and Deguchi, Y. (1998). Production of the antibacterial substance by *Bacillus spp.* strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture. 165:269-280.

Van hai, N.; Fotedar, R. and Buller, N., (2007). Selection of probiotics by various inhibition test method for use in the culture of western king prawns. Aquaculture. 272: 231-239.

Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S.T. (2008). Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila.* Biotechnology. 7(1): 124-128.

Isolation and Biochemical Identification of Potentially Probiotic Bacteria from *Barbus grypus* intestine

Mohammadian, T.[1]; Ghorbanpoor, M.[2]; Alishahi, M.[3]; Tabandeh, M.R.[4] and Gharibi, D.[5]

Received: 5.03.2013 Accepted: 6.07.2013

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are the most common type of microbes used as probiotics. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) from *Barbus grypus* intestine, based on their probiotic effects, were aimed in this study. Fifty *B.grypus* (800.82±265.97) were captured from natural water resources of Khuzestan province and transferred to laboratory. The bacterial flora of fish intestine were assessed. The intestinal LABs isolated and identified according to biochemical and morphometrical tests. Isolated LABs were evaluated and ranked based on probiotical indication tests (acid resistance, bile salt resistance , bacterial antagonistic effects and lack of pathogencity in fish). A total of thirty bacillus or cocci shape bacteria, suspected LABs, were isolated. Ten isolates identified as Lactobacillus and more identified to species based on biochemical tests. The probiotical identities of these ten isolates compared and finally four respectively isolates including *L. acidophilus* ،*L. delbruecki* *L.brevis* and *L. fermentium*, were selected as potentially probiotic LABs of *B.grypus* intestine.

Key words: Lactic acid bacteria, Lactobacillus, Intestine of *Barbus grypus*, Probiotic

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahwaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahwaz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahwaz, Iran
5- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Mohammadiyan, T., E-mail: Takavar_m2002@yahoo.com