Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

جداسازی و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس‌های (*Lactobacillus*) روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و توان ضد باکتریایی آنها در برابر یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*)

نیکی نادعلیزاده طبری[۱]، سعید مشکینی[*۲]، امیر توکمه‌چی[۳]

[*]s.meshkiniy@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

چکیده

لاکتوباسیلوس‌ها متداول‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند. هدف این مطالعه، جداسازی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس‌های روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) برای تقویت دستگاه گوارش این ماهی بود. پس از تهیه ۷۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی، محتویات روده آنها در محیط آبگوشت MRS (de MAN, ROGOSA and SHARPE) کشت شده و ۵۶ پرگنه لاکتوباسیلوس با آزمون‌های بیوشیمیایی مشخص شدند. سویه‌های لاکتوباسیلوس با آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شناسایی و فعالیت ضدباکتریایی، حساسیت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت در برابر صفرا و شرایط اسیدی (pH=۳) مورد بررسی قرار گرفت. جمعا شش سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*)، لاکتوباسیلوس روتری (*Lactobacillus reuteri*)، لاکتوباسیلوس انیمالیس (*Lactobacillus animalis*)، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*Lactobacillus fermentum*)، لاکتوباسیلوس لیشمانیا (*Lactobacillus Leishmania*) و لاکتوباسیلوس دلبروکی (*Lactobacillus delbrueckii*) شناسایی شدند. فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس لیشمانیا در برابر یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین بود. همه سویه‌های جداسازی شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین و وانکومایسین مقاوم و به تتراسایکلین حساس بودند. لاکتوباسیلوس انیمالیس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی بترتیب بیشترین مقاومت را در برابر صفرا ($p<۰/۰۵$) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین مقاومت را در برابر شرایط اسیدی از خود نشان دادند. براساس نتایج در مجرای گوارشی قزل‌آلای رنگین‌کمان، لاکتوباسیلوس‌هایی پروبیوتیک وجود دارد که از میان آنها لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس دلبروکی از ویژگی‌های پروبیوتیک بهتری برخوردارند.

لغات کلیدی: لاکتوباسیلوس، قزل‌آلای رنگین‌کمان، خواص پروبیوتیک، *Yersinia ruckeri*

[*]نویسنده مسئول

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که علاوه بر بهبود شرایط میکروبی و غذایی روده، در درمان و پیشگیری از برخی بیماری‌های عفونی نیز موثرند (Ramos *et al.*, 2013). از آنجایی که پروبیوتیک‌ها به طور طبیعی در دستگاه گوارش جانوران وجود دارند، با جداسازی، تشخیص و تقویت آنها در دستگاه گوارش می‌توان عملکرد آنها را بهبود بخشید (حسینی و همکاران، ۱۳۹۵).

سویه‌های زیادی از باکتری‌های اسید لاکتیک که در غذاهای تخمیری، سبزیجات، مخاط روده انسان و بسیاری از حیوانات از جمله آبزیان یافت می‌شوند، سبب بهبود شرایط گوارش و قابلیت جذب غذا در روده می‌شوند (Ramos *et al.*, 2013). لاکتوباسیلوس‌ها از باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در دستگاه گوارش آبزیان هستند (شناور ماسوله و همکاران، ۱۳۹۷) که بیشتر آنها با دارا بودن ویژگی‌های لازم به عنوان پروبیوتیک‌های شناخته شده‌ای در صنعت آبزی‌پروری دنیا کاربرد دارند (Soltani *et al.*, 2019).

از آنجایی که فلور باکتریایی دستگاه گوارش گونه‌های مختلف آبزیان کاملاً مشابه نیست، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مفید دستگاه گوارش هر گونه و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیک آنها موجب می‌شود، پژوهشگران بتوانند با تقویت آن باکتری‌ها در دستگاه گوارش همان ماهیان، شرایط تغذیه‌ای و سلامت آنها را بهبود ببخشند (Alishahi *et al.*, 2018).

با توجه به اینکه مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، نمک‌های صفراوی، شرایط اسیدی دستگاه گوارش و خاصیت ضد میکروبی از ویژگی‌های بارز برای پروبیوتیک بودن میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش هستند (Ramos *et al.*, 2013) و نیز از آنجایی که قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از گونه‌های ماهیان تجاری و اقتصادی در صنعت آبزی‌پروری کشورمان است، در این مطالعه سعی شد تا با جداسازی لاکتوباسیلوس‌های روده این ماهی، به شناسایی دقیق و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیک آنها پرداخته شود و سویه‌های مناسب‌تر از بین آنها برای تقویت در فلور روده‌ای این ماهی با ارزش معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و کشت محتویات روده ماهیان

پس از نمونه برداری تصادفی تعداد ۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به نسبت مساوی از وزن‌های زیر ۱۰ گرم (۲۵ قطعه)، ۱۰۰-۱۰ گرم (۲۵ قطعه) و بالای ۲۵۰ گرم (۲۵ قطعه) از مزارع پرورش ماهی آذربایجان غربی و ضد عفونی آنها با الکل ۷۰ درصد و بتادین، محتویات روده آنها در پلیت‌های استریل جمع‌آوری و با سرم فیزیولوژی رقیق‌سازی شد. براساس روش Karami و همکاران (۲۰۱۷) شناسایی اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات رقیق شده روده در محیط کشت آبگوشت MRS (Sigma Aldrich 69964)، به مدت ۹۶ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شمارش کلنی‌های رشد یافته (CFU)[1] انجام شد. برای شناسایی سویه‌های موجود در کلونی‌ها از روش‌های رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، حرکت، رشد در دو دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، احیای نیترات، بررسی‌های مورفولوژی و تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف استفاده شد (Karami *et al.*, 2017). برای اطمینان از صحت شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد.

آزمون بیوشیمیایی تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط گونه‌های لاکتوباسیلوس

محلول ۲ درصد قندهای گلوکز، آرابینوز، سلوبیوز، مانیتول، مانوز، ملبیوز و رافینوز در محیط کشت MRS براث، به طور جداگانه با فیلتر سَرسُرنگی ۰/۲۲ میکرون، استریل شده و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر آماده‌سازی شدند. به ازای هر پرگنه از لاکتوباسیلوس‌ها یک مجموعه قندی اختصاص داده شد و هر باکتری در ۱۰ لوله آزمایش حاوی محلول قندهای مربوطه کشت داده شد (۴۸ ساعت و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد). تخمیر کربوهیدرات‌ها با

[1] Colony Forming Unit

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

معرف برموتیمول بلو[1] بررسی شد و محیط‌ها به رنگ زرد (محلول‌های اسیدی ضعیف) و یا آبی (محلول‌های بازی ضعیف) مشاهده گردید (Karami *et al*., 2017).

استخراج DNA و تشخیص لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (SINACLON, Iran) و تعیین غلظت (کیفیت) آنها با دستگاه نانودراپ (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, Waltham, USA) (Valcheva *et al*., 2007) انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل محلول مَسترمیکس (Yekta Tajhiz Azma, Iran, Cat No: YT1553) (این محلول حاوی آنزیم تک دی‌ان‌ای پلیمراز (Taq DAN Polymerase)، بافر آنزیم، $MgCl_2$ و چهار نوکلئوتید dNTPs است) به مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر، DNA الگو به میزان پنج میکرولیتر، پرایمر یونیورسال رفت (338 F) با توالی نوکلئوتیدی (5´-ACTCCTATGGGAGGCAGCAG-3´) و پرایمر یونیورسال برگشت (518 R) با توالی نوکلئوتیدی (5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´) مربوط به ژن 16s rDNA باکتریایی، هر کدام یک میکرولیتر و باقیمانده حجم واکنش با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مراحل واکنش شامل یک مرحله واسرشت اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه)، ۳۰ چرخه شامل واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود، تنظیم شد (Valcheva *et al*., 2007). برای بررسی صحت تولید محصول PCR و تعیین طول قطعه تکثیر شده، از الکتروفورز بر ژل آگارز استفاده شد. برای مشاهده باندهای مربوطه از دستگاه Gel Documentation (Fardadazmarad Co, Iran) استفاده گردید.

[1] Bromothymol blue

ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده

برای بررسی توان لاکتوباسیلوس‌ها علیه باکتری بیماریزای یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*, LMG 3279)، پس از کشت این باکتری در محیط کشت مایع TSB (به مدت ۲۴ ساعت در دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد) و تنظیم غلظت آن به مقدار نیم مک‌فارلند (CFU/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$)، سوسپانسیون باکتریایی حاصل بر سطح محیط MRS آگار که قبلا لاکتوباسیلوس‌ها به صورت نقطه‌ای در آن کشت داده شده بودند، قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان قطر هاله عدم رشد باکتری یرسینیا راکری در اطراف پرگنه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک، با دقت میلی‌متر بوسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد. در این آزمون از آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین (Enrofloxacin, Pub Chem CID:71188, USA) به عنوان شاهد استفاده شده و همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت (Gueimonde *et al*., 2013).

حساسیت لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده به آنتی بیوبیوتیک‌ها

پس از کشت باکتری‌ها در محیط کشت MRS آگار (۲۴ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد)، ۲۰۰ میکرولیتر از هر محیط کشت حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک به صورت جداگانه به یک پلیت حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) مذاب منتقل شد. پس از انعقاد آگار، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین[2]، آمپی‌سیلین[3]، استرپتومایسین[4]، تتراسایکلین[5]، انروفلوکساسین[6]، تری متوپریم[7] و نیتروفرانتوئین[8] روی

[2] Oxacillin
[3] Ampicillin
[4] Sterptomycin
[5] Tetracycline
[6] Enrofloxacin
[7] Trimethoprim
[8] Nitrofurantoin

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

آن قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Jabbari *et al*., 2017).

تحمل لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر صفرا

بر اساس روش Pan و همکاران (۲۰۰۹) لاکتوباسیلوس‌ها در محیط آبگوشت MRS آگار (۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی) کشت شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از هر باکتری به لوله‌های آزمایش دربدار حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS و ۰/۳ درصد اکسگال (Oxgall, Merck, Germany) منتقل شد و یک لوله فاقد اکسگال نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. همه لوله‌ها به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی هوازی (اتمسفر حاوی گاز دی‌اکسید کربن ۵ درصد) قرار داده شدند. میزان رشد باکتری‌ها هر نیم ساعت یکبار تا ۱۰ ساعت به بوسیله اسپکتروفتومتر به صورت کدورت‌سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر سنجیده شد. میزان تحمل هر باکتری برابر است با مدت زمان لازم برای افزایش ۰/۳ واحد از نور جذبی لوله حاوی اکسگال در مقایسه با لوله شاهد (Pan *et al*., 2009).

تحمل لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر اسید

بر اساس روش Grześkowiak و همکاران (۲۰۱۱) باکتری‌های جداسازی شده در محیط آبگوشت MRS آگار کشت داده شده (۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی هوازی) و سپس برای هر نمونه باکتریایی، پس از اندازه‌گیری جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر، یک درصد از محیط کشت حاوی باکتری به لوله آزمایشی که حاوی محیط کشت مایع MRS با pH برابر با سه (pH به کمک محلول ۸ نرمال اسید کلریدریک تنظیم گردید) منتقل گردید. سپس تمامی لوله‌ها ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و اتمسفر پنج درصد گاز دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس لوله‌هایی که رشد باکتری در آنها اتفاق افتاده بود (کدورت در آنها ایجاد شده بود) به عنوان مقاوم در برابر اسید در نظر گرفته شدند و تعداد باکتری‌های آنها به صورت کدورت‌سنجی به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر سنجیده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین داده‌ها در مطالعه حاضر از نرم افزار SPSS v20 استفاده شد. مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها و مقاومت باکتری‌ها در برابر صفرا با آزمون One Way ANOVA تست Tukey انجام شد. مقاومت باکتری‌ها در برابر اسید نیز با آزمون One Way ANOVA تست Dunnett انجام گرفت. سطح معنی‌داری در همه مقایسه‌های آماری $p<۰/۰۵$ بود.

نتایج

نتایج جداسازی

در شناسایی اولیه، بیشترین پرگنه لاکتوباسیلوس مربوط به ماهیان ۲۵۰-۱۰۰ گرم و کمترین آنها مربوط به ماهیان بالای ۲۵۰ گرم بود (جدول ۱). نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی نیز که به تشخیص شش گونه لاکتوباسیلوس انجامید در جدول ۲ ارائه شده است.

نتایج مربوط به واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

پس از تکثیر ژن 16s rDNA لاکتوباسیلوس جداسازی شده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نتایج الکتروفورز (شکل ۱)، نشان داد که در همه نمونه‌ها باند یکسان و هم اندازه‌ای به وزن حدود ۲۲۰ جفت باز حاصل شد که تأیید کننده وجود باکتری‌های لاکتوباسیلوس بود.

نتایج بررسی‌های فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده

لاکتوباسیلوحس لیشمانیا با بیشترین قطر هاله عدم رشد (۲۹/۲۵±۰/۱ میلی‌متر) با انروفلوکساسین (۲۵±۰/۵ میلی‌متر) تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) داشته و لاکتوباسیلوس فرمنتوم کمترین قطر هاله عدم رشد (۱۶/۲۵±۰/۶۲ میلی‌متر) را نشان داد (جدول ۳).

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

جدول ۱: تعداد پرگنه‌های لاکتوباسیلوس به تفکیک گروه‌های وزنی ماهیان

Table 1: Number *of Lactobacillus* colonies by weight groups of fish

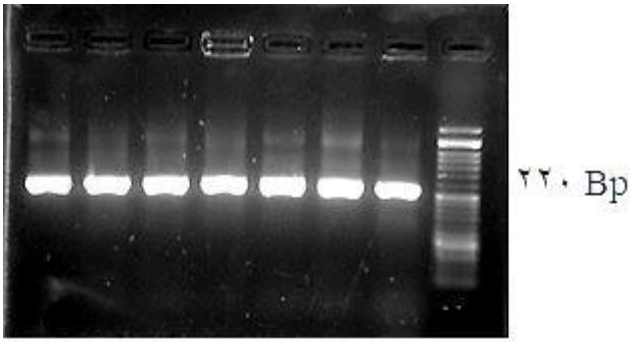
میکروارگانیسم جدا شده	زیر ۱۰ گرم	بین ۱۰ تا ۲۵۰ گرم	بالای ۲۵۰ گرم	مجموع
لاکتوباسیلوس	۱۴ پرگنه	۴۰ پرگنه	۲	۵۶

جدول ۲: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گونه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از روده ماهیان

Table 2: Results of biochemical tests to identify *Lactobacillus* species isolated from fish intestines

آزمون شناسایی	گونه‌های لاکتوباسیلوس					
	L. delbrueckii	*L. leishmania*	*L. fermentum*	*L. reuteri*	*L. animalis*	*L. acidophilus*
مورفولوژی	میله‌ای کوتاه	رشته‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای
رنگ‌آمیزی گرم	گرم +	گرم +	گرم +	گرم +	گرم +	گرم +
حرکت در محیط کشت	-	-	-	-	-	-
کاتالاز	-	-	-	-	-	-
رشد در ۱۵ درجه	-	+	+	-	-	-
رشد در ۴۵ درجه	-	-	+	+	-	-
احیای نیترات	-	-	+	+	-	-
تولید اسید و گاز از گلوکز	-	+	+	+	-	-
آرابینوز	+	+	+	+	+	+
سلوبیوز	+	-	+	-	+	+
مانیتول	-	+	+	-	+	+
مانوز	-	+	+	-	+	+
ملبیوز	+-	+	+	+	-	+
رافینوز	-	+	+	-	-	-

+ : مثبت بودن نتیجه آزمون مربوطه - : منفی بودن نتیجه آزمون مربوطه



شکل ۱: نتایج الکتروفورز ژن 16s rDNA نمونه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده. ستون اول از سمت راست مارکر، ستون دوم شاهد منفی و باندهای روشنِ ضخیم جدایه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشند.

Figure 1: Results of 16s rDNA gene electrophoresis of isolated *Lactobacillus* samples. From the right, the first column shows the marker, the second column the negative control, and the thick light bands of the *Lactobacillus* isolates

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

جدول ۳: خاصیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از نمونه‌های روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان
Table 3: Antimicrobial properties of *Lactobacillus* isolated from intestinal samples of rainbow trout

ردیف	گونه‌های لاکتوباسیلوس	میانگین قطر هاله عدم رشد یرسینیا راکری (میلی‌متر)
۱	*L. acidophilus*	۱۸/۲۵ ± ۰/۶۴ [c]
۲	*L. reuteri*	۲۳/۷۵ ± ۰/۲۵ [b]
۳	*L. animalis*	۱۷/۲۵ ± ۰/۵۶ [c]
۴	*L. fermentum*	۱۶/۲۵ ± ۰/۶۲ [c]
۵	*L. leishmanii*	۲۹/۲۵ ± ۰/۱ [a]
۶	*L. delbrueckii*	۱۹ ± ۰/۸ [c]
۷	آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین (Enrofloxacin)	۲۵ ± ۰/۵ [b]

میانگین‌ها با آزمون Tukey نرم افزار SPSS مقایسه شده و حروف بالانویس لاتین متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵)

نتایج آزمون حساسیت لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده به آنتی بیوبیوتیک‌ها

بیشترین حساسیت لاکتوباسیلوس‌ها نسبت به استرپتومایسین، تتراسایکلین، انروفلوکساسین و تری‌متوپریم بود (جدول ۴).

جدول ۴: حساسیت لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها
Table 4: Susceptibility of isolated *Lactobacillus* to antibiotics

آنتی‌بیوتیک‌ها	لاکتوباسیلوس جداسازی شده					
	L. acidophilus	*L. animalis*	*L. reuteri*	*L. fermentum*	*L. leishmania*	*L. delbrueckii*
اکساسیلین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
وانکومایسین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
آمپی‌سیلین	متوسط	حساس	متوسط	متوسط	حساس	مقاوم
استرپتومایسین	متوسط	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
تتراسایکلین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
انروفلوکساسین	متوسط	حساس	حساس	حساس	حساس	متوسط
تریمتوپریم	حساس	حساس	حساس	متوسط	حساس	حساس
نیتروفورانتوئین	متوسط	متوسط	متوسط	حساس	حساس	متوسط

مقاوم: عدم ایجاد هاله عدم رشد. متوسط: حداکثر قطر هاله عدم رشد ۵ میلی‌متر. حساس: قطر هاله عدم رشد بالای ۵ میلی‌متر

نتایج آزمون تحمل لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر صفرا

بیشترین و کمترین میزان تحمل صفرا بترتیب مربوط به لاکتوباسیلوس انیمالیس و لاکتوباسیلوس روتری بود (جدول ۵).

نتایج مربوط به تحمل لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر اسید کلریدریک (HCl)

بیشترین میزان تحمل در برابر اسید کلریدریک مربوط به باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود (جدول ۶).

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

جدول ۵: مقاومت لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر صفرا (محلول ۰/۳ درصد اکسگال)

Table 5: Resistance of isolated *Lactobacillus* to bile (0.3% Oxgall solution)

ردیف	میکروارگانیسم	T_1 (۳۶۰۰s)	T_2 (۳۶۰۰s)	T_2–T_1 (۳۶۰۰s)
۱	*L. acidophilus*	۲/۴۵ ± ۰/۷۹ [b]	۲/۸۹ ± ۰/۳۴ [b]	۰/۴۴ ± ۰/۰۸ [c]
۲	*L. reuteri*	۴/۳۳ ± ۰/۲۱ [a]	۷/۴۹ ± ۰/۸۲ [a]	۳/۱۶ ± ۰/۱۱ [a]
۳	*L. animalis*	۱/۳۶ ± ۰/۷۴ [c]	۱/۷۸ ± ۰/۱۹ [c]	۰/۴۲ ± ۰/۰۴ [c]
۴	*L. fermentum*	۱/۱۵ ± ۰/۲۸ [c]	۲/۰۵ ± ۰/۲۲ [c]	۰/۹ ± ۰/۱۳ [b]
۵	*L. leishmania*	حساس	حساس	حساس
۶	*L. delbrueckii*	۲/۸۹ ± ۰/۷۷ [b]	۳/۵۱ ± ۰/۴۹ [b]	۰/۶۲ ± ۰/۰۷ [c]

میانگین‌ها با آزمون Tukey نرم افزار SPSS مقایسه شده و حروف بالانویس لاتین متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

T_1: زمان افزایش ۰/۳ نور جذبی باکتری در محیط کشت MRS. T_2: زمان افزایش ۰/۳ نور جذبی باکتری در محیط MRS حاوی ۰/۳٪ اکسگال

جدول ۶: حساسیت لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر اسید کلریدریک

Table 6: Susceptibility of *Lactobacillus* isolated from the intestine of rainbow trout to hydrochloric acid

ردیف	میکروارگانیسم	تعداد باکتری در زمان صفر (کلونی/میلی‌لیتر)	تعداد باکتری پس از ۲۴ ساعت (کلونی/میلی‌لیتر)
۱	*L. acidophillus*	۷/۱۱ ± ۰/۱۱[a]	۸/۴۲ ± ۰/۱۱[b]
۲	*L. reuteri*	۶/۸۸ ± ۰/۹[a]	۸/۰۱ ± ۰/۸۹[b]
۳	*L. animalis*	۷/۰۲ ± ۰/۵۴[a]	۷/۵۷ ± ۰/۷۲[a]
۴	*L. fermentum*	۷/۲۳ ± ۰/۸۹[a]	۷/۰۹ ± ۰/۴۳[a]
۵	*L. leishmanii*	حساس	حساس
۶	*L. delbruckii*	۷/۲۹ ± ۰/۶۸[a]	۷/۵۴ ± ۰/۸۴[a]

میانگین‌ها با آزمون Dunnett نرم افزار SPSS مقایسه شده و حروف بالانویس لاتین متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

بحث

تشخیص و شناسایی لاکتوباسیلوس‌های مختلف از دستگاه گوارش ماهیان به ویژه آزاد ماهیان و با ویژگی‌های مشخص شده در مطالعه حاضر (جدول ۲) در نتایج پژوهش‌های مشابه توسط پژوهشگران دیگر نیز گزارش شده است (Allameh *et al*., 2017). هرچند استفاده از روش‌های بیوشیمیایی همچنان به طور وسیعی در شناسایی باکتری‌ها کاربرد دارد، اما استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در تشخیص سویه‌های باکتریایی، امکان شناسایی دقیق‌تر آنها را فراهم می‌آورد (Valcheva *et al*., 2007). در مطالعه حاضر هم جدایه‌های مورد شناسایی به روش‌های بیوشیمیایی، از طریق PCR و تکثیر ژن 16s rDNA نیز بررسی و مورد شناسایی قرار گرفتند و از دقت این روش در شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس استفاده شد (شکل ۱).

همانگونه که در مطالعات اخیر به ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان یک پروبیوتیک مهم اشاره شده است (Alishahi *et al*., 2018)، در مطالعه حاضر هم این ویژگی در لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز مشاهده شد بطوریکه بررسی قطر هاله عدم رشد یرسینیا راکری در کنار لاکتوباسیلوس نشانگر ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد (جدول ۳). چنین ویژگی در لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از سایر حیوانات نیز گزارش شده است. Balcazar و همکاران (۲۰۰۸) پس از جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، توان ضدباکتریایی آنها را در برابر باکتری‌های بیماریزای ماهیان از جمله *Vibrio anguillarum*،

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

Aeromonas hydrophila، *Aeromonas salmonicida* و *Yersinia ruckeri* در شرایط آزمایشگاهی گزارش کردند (Balcazar *et al*., 2008). نتایج این پژوهشگران تأیید کننده نتایج مطالعه حاضر مبنی بر فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (جدول ۳) است. لاکتوباسیلوس‌ها با تولید باکتریوسین‌ها (عوامل ضدمیکروبی) و مکانیسم‌های مختلف مانند تولید ترکیبات مهارکننده باکتری‌ها، تعدیل pH روده، تقویت دستگاه ایمنی، انسداد جایگاه‌های اتصال باکتری‌ها، رقابت برای جذب مواد غذایی، تولید اسیدهای آلی مانند اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید فنیل لاکتیک، اسید فرمیک یا اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، دی استیل، پراکسید هیدروژن، اسیدهای آمینه، کاهش پتانسیل احیا، سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها، نقش محافظتی خود را در برابر پاتوژن‌های روده‌ای ایفاء می‌کنند (لطیفی و همکاران، ۱۳۹۸). در اکثر موارد باکتریوسین‌های جدا شده از لاکتوباسیلوس‌ها، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین (۱۰-۲ کیلودالتون) هستند که در برابر حرارت، شرایط اسیدی و سرما نیز مقاوم می‌باشند. باکتریوسین‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی مانند توقف بیوسنتز DNA در باکتری‌ها، اثر مهاری خود را بر باکتری‌های پاتوژن اعمال می‌کنند (Mohammadi *et al*., 2018). در مطالعه حاضر، لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز با ویژگی ضد میکروبی خود باکتری یرسینیا راکری را مهار کردند (جدول ۳). وجود لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با کاهش تعداد باکتری‌های کلی‌فرم و بی‌هوازی‌ها موجب کاهش فعالیت آنزیم پپتیدی و خطرناک بتاگلوکورونیداز (Beta-glucuronidase = GUS) تولیدی بوسیله کلی‌فرم‌ها می‌شود (Soltani *et al*., 2019). در بررسی Chung و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شد که باکتریوسین‌های حاصل از لاکتوباسیلوس روتری در pHهای ۱۲-۲ و حرارت بالا مقاوم بوده و علیه باکتری‌های بیماری‌زا مانند اشریشیا کلی اثر بازدارندگی قوی دارد (Chung *et al*., 2001). در مطالعه حاضر هم لاکتوباسیلوس روتری فعالیت مناسبی در برابر یرسینیا راکری از خود نشان داد و در این زمینه با خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین رقابت می‌کند (جدول ۳). مطالعه حاضر این نکته را نیز تایید می‌کند که برخی باکتری‌های پروبیوتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف هم از توان ضدباکتریایی بالاتری برخوردارند بطوریکه لاکتوباسیلوس لیشمانیا به طور معنی‌داری نسبت به آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین، بمراتب بهتر از این آنتی‌بیوتیک در مهار یرسینیا راکری نقش دارد (جدول ۳). نتایج آزمون تعیین حساسیت میکروبی نشان دهنده حساسیت لاکتوباسیل‌ها در برابر چندین آنتی‌بیوتیک بویژه تتراسیکلین، استرپتومایسین و تری متوپریم بود. در مطالعه حاضر، مقاومت کامل نسبت به آنتی‌بیوتیک وانکومایسین که یکی از شاخص‌های مهم لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد (Gueimonde *et al*., 2013)، مشاهده شد که تأییدی بر تشخیص درست باکتری‌های جداسازی شده می‌باشد (جدول ۴) و توان پروبیوتیک این باکتری‌ها را در این زمینه تأیید می‌کند.

مقاومت لاکتوباسیلوس‌های مختلف جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر نمک صفراوی ۰/۳ درصد اکسگال یکسان نیست (جدول ۵) و این موضوع در مطالعه Chateau و همکاران (۱۹۹۴) نیز گزارش شده است و ایشان با مطالعه بر تأثیر نمک‌های صفراوی بر رشد ۳۸ جدایه لاکتوباسیلوس، 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 گزارش کردند (Chateau *et al*., 1994). در مطالعه حاضر نیز در مورد بعضی از سویه‌های آزمایش شده مانند جدایه‌های لاکتوباسیلوس لیشمانیا تأخیر در رشد در حضور ۰/۳ درصد اکسگال، نسبت به سایر سویه‌ها مشهود بود (جدول ۵). احتمالاً نوسان در میزان مقاومت در بین سویه‌های مختلف باکتریایی، ناشی از تفاوت در توانایی لاکتوباسیلوس‌ها در کاهش اثرات دترجنتی نمک‌های صفراوی است اما با این‌حال تاکنون در مورد غلظت دقیق صفرا جهت ارزیابی تحمل باکتری‌های پروبیوتیک توافق کلی وجود ندارد (Maragkoudakis *et al*., 2010). بعضی از سویه‌های لاکتوباسیلوس حتی قادر

به زنده ماندن در pH برابر با یک و به مدت یک ساعت هم هستند (Maragkoudakis *et al.*, 2010). اما در مطالعه حاضر سویه لاکتوباسیلوس لیشمانیای جداسازی شده تحمل شرایط اسیدی (pH برابر با سه) را نداشت و فاقد توانایی رشد در این محیط بود. اما برخی سویه‌ها مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین مقاومت را در محیط اسیدی در میان سویه‌های جداسازی شده نشان داد (جدول ۶).

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، هرچند هر کدام از سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای برخی ویژگی‌های مناسب برای استفاده به عنوان پروبیوتیک هستند، اما در بین سویه‌های جداسازی شده، باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس دلبروکی با شرایط و ویژگی‌های بهتر نسبت به سایر سویه‌ها، قابلیت بیشتری برای استفاده و تقویت آنها در دستگاه گوارش قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان پروبیوتیک دارند.

منابع

حسینی، ع.، چهارلنگ، ف.، ستوده، ا.، علیشاهی، م.، و مدرسی، م.، ۱۳۹۵. اثر لاکتوباسیلوس‌های (*Lactobacillus*) جدا شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*) بر عملکرد رشد، بازماندگی، و فلور میکروبی روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۳): ۱۷۹-۱۶۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110268

شناور ماسوله، ع.، پورکاظمی، م.، سلطانی، م.، یارمحمدی، م.، یزدانی، م.ع.، علیزاده، م.، جلیل پور، ج.، بازاری مقدم، س.، معصوم زاده، م.، حسینی فر، س.ح.، اسماعیلی، پ. و بنی اسماعیلی، ی.، ۱۳۹۷. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از روده تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۵): ۲۸-۱۹. DOI: 10.22092/ISFJ. 2018.117875

لطیفی، ب.، ابوالقاسمی، س.ج.، شویک لو، ا.ر.، احمدی، م.، اعتمادیان، ی. و قائمی، و.، ۱۳۹۸. مقایسه تغییرات فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی فیله‌های فیل ماهی (*Huso huso*) دودی طعم‌دهی شده با آب نمک و سس به مدت ۳۰ روز در یخچال. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۴): ۱۱-۱. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119397

Alishahi, M., Tulaby Dezfuly, Z., Mesbah, M. and Mohammadian, T., 2018. Effects of Two Probiotics, *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Bulgaricus* on Growth Performance and Intestinal Lactic Acid Bacteria of *Cyprinus Carpio*. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 12(3): 207-217. DOI:10.22059/IJVM.2018.235444.1004816

Balcazar, J.L., Vendrell, D., De 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(1-4): 188-191. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014

Chateau, N., Deschamps, A.M. and Sassi, A.H., 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 18(1): 42-44. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00796.x

Chung, M.K., Martin, D.O., Sprecher, D., Wazni, O., Kanderian, A., Carnes, C.A., Bauer, J.A., Tchou, P.J., Niebauer, M.J., Natale, A. and Van Wagoner, D.R., 2001. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation*, 104(24): 2886-2891. DOI: 10.1161/hc4901.101760

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

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. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.04.037

Gueimonde, M., Sánchez, B., Reyes-Gavilán, C.G. and Margolles, A., 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Front. Microbiol, 4: Article No: 202. DOI:10.3389/fmicb.2013.00202

Karami, S., Roayaei, M., Hamzavi, H., Bahmani, M., Hassanzad-Azar, H., Leila, M. and Rafieian-Kopaei, M., 2017. Isolation and identification of probiotic Lactobacillus from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 7(3): 137–141. DOI: 10.4103/jphi.JPHI_8_17. PMID: 29184826.

Maragkoudakis, P.A., Chingwaru, W., Gradisnik, L., Tsakalidou, E. and Cencic, A., 2010. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 91-97. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.024

Mohammadi, F., Eshaghia, M., Razavia, S., Darban Sarokhalila, D., Talebia, M. and Pourshafie, M.R., 2018. Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microbial Pathogenesis*, 118: 242–246. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.03.020

Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H. and Zhao, Z., 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. *Food Control*, 20(6): 598-602. DOI:10.1016/j.foodcont.2008.08.019

Ramos, M.A., Weber, B., Gonçalves, J.F., Santos, G.A., Rema, P. and Ozorio, R.O.A., 2013. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). Comparative biochemistry and physiology. *Part A. Molecular and integrative physiology*, 166: 302–307. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.025

Soltani, M., Kane, A., Taheri-Mirghaed, A., Pakzad, K. and Hosseini-Shekarabi, P., 2019. Effect of the probiotic, *Lactobacillus plantarum* on growth performance and haematological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunized with bivalent streptococcosis / lactococcosis vaccine. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(2): 283-295. DOI: 10.22092/ijfs.2018.117757

Valcheva, R., Kabadjova, P., Rachman, C., Ivanova, I., Onno, B., Prevost, H. and Dousset, X., 2007. A rapid PCR procedure for the specific identification of *Lactobacillus sanfranciscensis*, based on the 16S-23S intergenic spacer regions. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 290–302. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03039.x

Downloaded from isfj.ir at 23:48 +0330 on Tuesday March 2nd 2021

Isolation and a survey on probiotic properties of *Lactobacillus* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine and their antibacterial properties against *Yersinia ruckeri*

Nadalizadeh Tabari N.[1]; Meshkini S.[2*]; Tukmechi A.[3]

[*]s.meshkiniy@urmia.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
3 -Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Lactobacillus is the most common probiotic bacteria. The aim of this study was to isolate and evaluate the probiotic properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal *Lactobacillus* and to improve the digestive tract of this fish. After preparation of 75 rainbow trout, their intestinal contents were cultured in MRS broth medium and 56 *Lactobacillus* colonies were identified by biochemical tests. *Lactobacillus* strains were identified by biochemical tests and polymerase chain reaction (PCR), and their antibacterial activity, susceptibility to antibiotics, bile resistance and acidic conditions (pH=3) was evaluated. A total of six *Lactobacillus* strains *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus leishmania* and *Lactobacillus delbrueckii* were identified. *The antibacterial activity of Lactobacillus leishmania against Yersinia ruckeri was significantly ($p<0.05$) higher than the antibiotic Enrofloxacin.* ($p<0.05$). All isolates were resistant to oxacillin and vancomycin antibiotics and were sensitive to tetracycline. *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* showed the highest resistance to bile ($p<0.05$), respectively, and *Lactobacillus acidophilus* showed the highest resistance to acidic conditions. According to the results there are probiotic *Lactobacillus* in the rainbow trout digestive tract, and among them *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus delbrueckii* have better probiotic properties.

Keywords: *Lactobacillus*, Rainbow trout, Probiotic properties, *Yersinia rockery*

[*]Corresponding author