

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

نيکى نادعلیزاده طبرى^۱، سعید مشکينى^{۲*}، امير توكمه‌چى^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 پذیرش: آبان ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸

چکیده

لاكتوباسیلوس‌ها متداول‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند. هدف این مطالعه، جداسازی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیک لاكتوباسیلوس‌های روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) برای تقویت دستگاه گوارش این ماهی بود. پس از تهیه ۷۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی، محتويات روده آنها در محیط آبگوشت MRS (de MAN, ROGOSA and SHARPE) کشت شده و ۵۶ پرگنه لاكتوباسیلوس با آزمون‌های بیوشیمیایی مشخص شدند. سویه‌های لاكتوباسیلوس با آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شناسایی و فعالیت ضدباکتریایی، حساسیت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت در برابر صfra و شرایط اسیدی (pH=۳) مورد بررسی قرار گرفت. جمعاً شش سویه لاكتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus reuteri*), لاكتوباسیلوس روترا (*Lactobacillus acidophilus*), لاكتوباسیلوس انیمالیس (*Lactobacillus fermentum*), لاكتوباسیلوس لیشمانیا (*Lactobacillus animalis*), لاكتوباسیلوس دلبروکی (*Lactobacillus delbrueckii*) و لاكتوباسیلوس لیشمانیا (*Lactobacillus Leishmania*) به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از باکتریایی لاكتوباسیلوس لیشمانیا در برابر یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) داشتند. فعالیت ضد آنتی‌بیوتیک انروفلوكسازین بود. همه سویه‌های جداسازی شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌های اکساسیلین و وانکومایسین مقاوم و به تراسایکلین حساس بودند. لاكتوباسیلوس انیمالیس، لاكتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاكتوباسیلوس دلبروکی بترتیب بیشترین مقاومت را در برابر صfra ($p < 0.05$) و لاكتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین مقاومت را در برابر شرایط اسیدی از خود نشان دادند. براساس نتایج در مجرای گوارشی قزل‌آلای رنگین‌کمان، لاكتوباسیلوس‌هایی پروبیوتیک وجود دارد که از میان آنها لاكتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاكتوباسیلوس روترا و لاكتوباسیلوس دلبروکی از ویژگی‌های پروبیوتیک بهتری برخوردارند.

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

*نویسنده مسئول

۴ مقدمه

روده‌ای این ماهی با ارزش معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و کشت محتويات روده ماهیان
 پس از نمونه برداری تصادفی تعداد ۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به نسبت مساوی از وزن‌های زیر ۱۰ گرم (۲۵ قطعه)، ۱۰۰-۱۰۰ 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، محتويات روده آنها در پلیت‌های استریل جمع‌آوری و با سرم فیزیولوژی رقیق‌سازی شد. براساس روش Karami (۲۰۱۷) شناسایی اولیه باکتری‌های اسید لاكتیک با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از محتويات 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)^۱ 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 بیوشیمیابی تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط گونه‌های لاکتوباسیلوس

محلول ۲ درصد قندهای گلوکز، آرابینوز، سلوبیوز، مانیتول، مانوز، ملبیوز و رافینیوز در محیط کشت MRS براث، به طور جداگانه با فیلتر سرسرنگی 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

پروبیوتیک‌ها میکرووارگانیسم‌های 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 لاكتیک 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 لاكتیک 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 باکتریابی 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 بیخشنند (Alishahi et al., 2018).

با توجه به اینکه مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، نمک‌های صفراءوی، شرایط اسیدی دستگاه گوارش و خاصیت ضد میکروبی از ویژگی‌های بارز برای پروبیوتیک بودن (Ramos et al., 2013) و نیز از آنجایی که قزل‌آلای رنگین کمان 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

^۱ Colony Forming Unit

ویژگی ضد میکروبی لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده

برای بررسی توان لاكتوباسیلوس‌ها علیه باکتری بیماریزای یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*, LMG 3279) پس از کشت این باکتری در محیط کشت مایع TSB (به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) CFU/mL و تنظیم غلظت آن به مقدار نیم مکفارلندر ($10^8 \times 1/5$)، سوسپانسیون باکتریایی حاصل بر سطح محیط MRS آگار که قبل از کشت شده بودند، قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نقطه‌ای در آن کشت داده شده بودند، قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باکتری یرسینیا راکری در اطراف پرگنه‌های باکتری‌های اسید لакتیک، با دقت میلی‌متر بوسیله خطکش اندازه‌گیری شد. در این آزمون از آنتی‌بیوتیک (Enrofloxacin, Pub Chem CID:71188, USA) به عنوان شاهد استفاده شده و همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت (et al., 2013).

حساسیت لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوبیوتیک‌ها

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 لакتیک 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^۲، آمپیسیلین^۳، استرپتومایسین^۴، تتراسایکلین^۵، انروفلوکساسین^۶، تری متوبریم^۷ و نیتروفرانتوئین^۸ روی

معرف برموتیمول بلو^۱ 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 لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج (SINACLON, Iran) DNA آنها با دستگاه نانودرایپ (Nanodrop 2000c, Thermo Valcheva et al., Scientific, Waltham, USA) ۲۰۰۷ انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل محلول (Yekta Tajhiz Azma, Iran, Cat No: YT1553) (این محلول حاوی آنزیم تک دی‌ان‌ای پلیمراز (Taq DAN Polymerase)، بافر آنزیم، MgCl₂ و چهار نوکلئوتید dNTPs است) به مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر، الگو به میزان پنج میکرولیتر، پرایمر یونیورسال رفت (338 F) با توالی نوکلئوتیدی ۵'-ACTCCTATGGGAGGCAGCAG-۳' و پرایمر یونیورسال برگشت (518 R) با توالی نوکلئوتیدی ۵'-ATTACCGCGCTGCTGG-۳' 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

² Oxacillin

³ Ampicillin

⁴ Sterptomycin

⁵ Tetracycline

⁶ Enrofloxacin

⁷ Trimethoprim

⁸ Nitrofurantoin

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 کدورت‌سنجدی به کمک اسپکتروفوتومتر 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 صفراء با آزمون One Way ANOVA تست Tukey شد. مقاومت باکتری‌ها در برابر اسید نیز با آزمون One Way Dunnett ANOVA تست انجام گرفت. سطح معنی‌داری در همه مقایسه‌های آماری $p < 0.05$ بود.

نتایج

نتایج جداسازی

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

نتایج مربوط به واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

پس از تکثیر زن 16s rDNA لاكتوباسیلوس 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 لاكتوباسیلوس بود.

نتایج بررسی‌های فعالیت ضدمیکروبی لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده

لاكتوباسیلوس لیشمانیا با بیشترین قطر هاله عدم رشد ($29/25 \pm 0.1$ میلی‌متر) با انروفلوكسازین (25 ± 0.5 میلی‌متر) تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) داشته و لاكتوباسیلوس فرمنتوم کمترین قطر هاله عدم رشد ($16/25 \pm 0.6$ میلی‌متر) را نشان داد (جدول ۳).

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 لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر صفراء

بر اساس روش Pan و همکاران (۲۰۰۹) لاكتوباسیلوس‌ها در محیط آبگوشت MRS آگار ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوایی) کشت شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از هر باکتری به لوله‌های آزمایش درب‌دار حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS و $0/3$ 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 بی‌هوایی (اتمسفر حاوی گاز دی‌اسید کربن ۵ درصد) قرار داده شدند. میزان رشد باکتری‌ها هر نیم ساعت یکبار تا ۱۰ ساعت به بوسیله آسپکتروفوتومتر به صورت کدورت‌سنجدی در طول موج ۶۲۰ نانومتر سنجیده شد. میزان تحمل هر باکتری برابر است با مدت زمان لازم برای افزایش $0/3$ واحد از نور جذبی لوله حاوی اکسگال در مقایسه با لوله شاهد (Pan et al., 2009).

تحمل لاكتوباسیلوس‌های 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 بی‌هوایی) و سپس برای هر نمونه باکتریایی، پس از اندازه‌گیری جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر 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 بی‌هوایی و اتمسفر پنج درصد گاز دی‌اسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گرمانه‌گذاری شدند. سپس

جدول ۱: تعداد پرگنه‌های لاكتوباسیلوس به تفکیک گروه‌های وزنی ماهیان

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

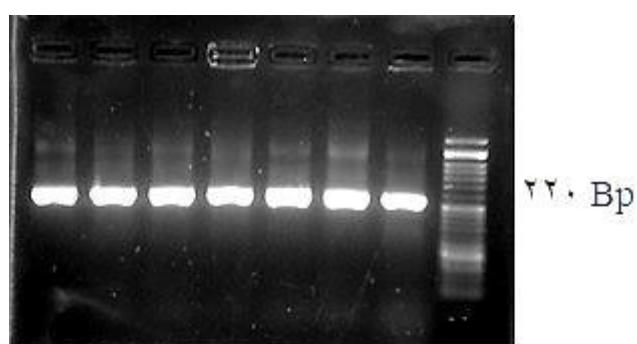
مجموع	بالای ۲۵۰ گرم	بین ۱۰ تا ۲۵۰ گرم	زیر ۱۰ گرم	میکروارگانیسم جدا شده	لاكتوباسیلوس
۵۶	۲	۴۰ پرگنه	۱۴ پرگنه		

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

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

گونه‌های لاكتوباسیلوس						آزمون شناسایی
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. animalis</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. leishmania</i>	<i>L. delbrueckii</i>	
میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	رشته‌ای	میله‌ای کوتاه	مورفولوژی
+ گرم	+ گرم	+ گرم	+ گرم	+ گرم	+ گرم	رنگ آمیزی گرم
-	-	-	-	-	-	حرکت در محیط
-	-	-	-	-	-	کشت
-	-	-	-	-	-	کاتالاز
-	-	-	+	+	-	رشد در ۱۵ درجه
-	-	+	+	-	-	رشد در ۴۵ درجه
-	-	+	+	-	-	احیای نیترات
-	-	+	+	+	-	تولید اسید و گاز از
-	-	+	+	+	-	گلوكز
+	+	+	+	+	+	آرابینوز
+	+	-	+	-	+	سلوبیوز
+	+	-	+	+	-	مانیتول
+	+	-	+	+	-	مانوز
+	-	+	+	+	+-	ملبیوز
-	-	-	+	+	-	رافینوز

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



شکل ۱: نتایج الکتروفورز ژن 16s rDNA ۱۶ نمونه‌های لاكتوباسیلوس جداسازی شده. ستون اول از سمت راست مارکر، ستون دوم شاهد منفی و باندهای روشن ضخیم جدایه‌های لاكتوباسیلوس 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

جدول ۳: خاصیت ضدبیکروبی لاكتوباسیلوس‌های جدا شده از نمونه‌های روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Table 3: Antimicrobial properties of *Lactobacillus* isolated from intestinal samples of rainbow trout

ردیف	گونه‌های لاكتوباسیلوس	میانگین قطر هاله عدم رشد برسینیا راکری (میلی‌متر)
۱	<i>L. acidophilus</i>	۱۸/۲۵ ± ۰/۶۴ ^c
۲	<i>L. reuteri</i>	۲۳/۷۵ ± ۰/۲۵ ^b
۳	<i>L. animalis</i>	۱۷/۲۵ ± ۰/۵۶ ^c
۴	<i>L. fermentum</i>	۱۶/۲۵ ± ۰/۶۲ ^c
۵	<i>L. leishmanii</i>	۲۹/۲۵ ± ۰/۱ ^a
۶	<i>L. delbrueckii</i>	۱۹ ± ۰/۸ ^c
۷	آنتی‌بیوتیک انروفلوكسازین (Enrofloxacin)	۲۵ ± ۰/۵ ^b

میانگین‌ها با آزمون Tukey نرم افزار SPSS مقایسه شده و حروف بالاترین متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($p < 0.05$)

نتایج آزمون حساسیت لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوبیوتیک‌ها تری‌متوپریم بود (جدول ۴).

نتایج آزمون حساسیت لاكتوباسیلوس‌های بیشترین حساسیت لاكتوباسیلوس‌ها نسبت به

جدول ۴: حساسیت لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها

Table 4: Susceptibility of isolated *Lactobacillus* to antibiotics

لاكتوباسیلوس جداسازی شده						آنٹی‌بیوتیک‌ها
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. leishmania</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. animalis</i>	<i>L. acidophilus</i>	
مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	اکساسیلین
مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	وانکومایسین
مقاوم	حساس	متوسط	متوسط	حساس	متوسط	آمپی‌سیلین
حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	متوسط	استرپтомایسین
حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	ترتراسایکلین
متوسط	حساس	حساس	حساس	حساس	متوسط	انروفلوكسازین
حساس	حساس	متوسط	حساس	حساس	حساس	تری‌متوپریم
متوسط	حساس	حساس	حساس	حساس	متوسط	نیتروفورانتوئین

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

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

بیشترین میزان تحمل در برابر اسید کلریدریک مربوط به باکتری لاكتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود (جدول ۵).

نتایج آزمون تحمل لاكتوباسیلوس‌های جداسازی شده در برابر صfra

بیشترین و کمترین میزان تحمل صfra بترتیب مربوط به لاكتوباسیلوس انیمالیس و لاكتوباسیلوس روترا بود (جدول ۵).

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

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

T _۲ -T _۱ (۳۶۰۰s)	T _۲ (۳۶۰۰s)	T _۱ (۳۶۰۰s)	میکروارگانیسم	ردیف
۰/۴۴ ± ۰/۰۸ ^c	۲/۸۹ ± ۰/۳۴ ^b	۲/۴۵ ± ۰/۷۹ ^b	<i>L. acidophilus</i>	۱
۳/۱۶ ± ۰/۱۱ ^a	۷/۴۹ ± ۰/۸۲ ^a	۴/۳۳ ± ۰/۲۱ ^a	<i>L. reuteri</i>	۲
۰/۴۲ ± ۰/۰۴ ^c	۱/۷۸ ± ۰/۱۹ ^c	۱/۳۶ ± ۰/۷۴ ^c	<i>L. animalis</i>	۳
۰/۹ ± ۰/۱۳ ^b	۲/۰۵ ± ۰/۲۲ ^c	۱/۱۵ ± ۰/۲۸ ^c	<i>L. fermentum</i>	۴
حساس	حساس	حساس	<i>L. leishmania</i>	۵
۰/۶۲ ± ۰/۰۷ ^c	۳/۵۱ ± ۰/۴۹ ^b	۲/۸۹ ± ۰/۷۷ ^b	<i>L. delbrueckii</i>	۶

میانگین‌ها با آزمون Tukey نرم افزار SPSS مقایسه شده و حروف بالاترین لاتین متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<0.05). T_۱: زمان افزایش ۰/۳ نور جذبی باکتری در محیط کشت MRS. T_۲: زمان افزایش ۰/۰ نور جذبی باکتری در محیط MRS حاوی ۰/۳٪ اکسگال.

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

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

ردیف	میکروارگانیسم	تعداد باکتری در زمان صفر (کلونی/آمیلی لیتر)	تعداد باکتری پس از ۲۴ ساعت (کلونی/آمیلی لیتر)
۱	<i>L. acidophilus</i>	۸/۴۲ ± ۰/۱۱ ^b	۷/۱۱ ± ۰/۱۱ ^a
۲	<i>L. reuteri</i>	۸/۰۱ ± ۰/۸۹ ^b	۶/۸۸ ± ۰/۹ ^a
۳	<i>L. animalis</i>	۷/۵۷ ± ۰/۷۲ ^a	۷/۰۲ ± ۰/۵۴ ^a
۴	<i>L. fermentum</i>	۷/۰۹ ± ۰/۴۳ ^a	۷/۲۳ ± ۰/۸۹ ^a
۵	<i>L. leishmania</i>	حساس	حساس
۶	<i>L. delbrueckii</i>	۷/۵۴ ± ۰/۸۴ ^a	۷/۲۹ ± ۰/۶۸ ^a

میانگین‌ها با آزمون Dunnett نرم افزار SPSS مقایسه شده و حروف بالاترین لاتین متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

بحث

همانگونه که در مطالعات اخیر به ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان یک پروپیوتیک مهم اشاره شده است (Alishahi *et al.*, 2018) (Balcazar *et al.*, 2008)، در مطالعه حاضر هم این ویژگی در لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز مشاهده شد بطوریکه بررسی قطره‌الله عدم رشد یوسینیا 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 (2008) پس از جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، توان ضدبacterیایی آنها را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان از جمله *Vibrio anguillarum* بیماری‌زای ماهیان از جمله

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 زن 16s rDNA بررسی و مورد شناسایی قرار گرفتند و از دقت این روش در شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس استفاده شد (شکل ۱).

راکری از خود نشان داد و در این زمینه با خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک انروفلوكسازین رقابت می‌کند (جدول ۳). مطالعه حاضر این نکته را نیز تایید می‌کند که برخی باکتری‌های پروپیوتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف هم از توان ضدباکتریایی بالاتری برخوردارند بطوریکه لاکتوباسیلوس لیشمانیا به طور معنی‌داری نسبت به آنتی‌بیوتیک انروفلوكسازین، بمراتب بهتر از این آنتی‌بیوتیک در مهار یرسینیا راکری نقش دارد (جدول ۳).

نتایج آزمون تعیین حساسیت میکروبی نشان دهنده حساسیت لاکتوباسیلوها در برابر چندین آنتی‌بیوتیک بویژه تتراسیکلین، استرپتومایسین و تری متوبیریم بود. در مطالعه حاضر، مقاومت کامل نسبت به آنتی‌بیوتیک وانکومایسین که یکی از شاخص‌های مهم لاکتوباسیلوها می‌باشد (Gueimonde *et al.*, 2013) مشاهده شد که تأییدی بر تشخیص درست باکتری‌های جداسازی شده می‌باشد (جدول ۴) و توان پروپیوتیک این باکتری‌ها را در این زمینه تأیید می‌کند.

مقاومت لاکتوباسیلوها می‌تواند جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر نمک صفراءوی $0/3$ درصد اسکال یکسان نیست (جدول ۵) و این موضوع در مطالعه Chateau و همکاران (۱۹۹۴) نیز گزارش شده است و ایشان با مطالعه بر تأثیر نمک‌های صفراءوی بر رشد 28 جدایه لاکتوباسیلوس، تأخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به یک جذب نوری $0/3$ در طول موج 600 نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک‌های صفراءوی 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 $0/3$ درصد اسکال، 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 دترجننتی نمک‌های صفراءوی است اما با این حال تاکنون در مورد غلظت دقیق صfra جهت ارزیابی تحمل باکتری‌های پروپیوتیک توافق کلی وجود ندارد (Maragkoudakis *et al.*, 2010).

بعضی از سویه‌های لاکتوباسیلوس حتی قادر

Aeromonas *hydrophila* 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، دی‌استیل، 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 ($2-10$ کیلو Dalton) هستند که در برابر حرارت، شرایط اسیدی و سرما نیز مقاوم می‌باشند. باکتریوسین‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی مانند توقف بیوسنتر 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 کلی فرم و بی‌هوایی‌ها موجب کاهش فعالیت آنزیم پیتیدی Beta-glucuronidase (GUS) تولیدی بوسیله کلی فرم‌ها می‌شود (Soltani *et al.*, 2019) در بررسی Chung و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شد که باکتریوسین‌های حاصل از لاکتوباسیلوس روتری در pH $2-12$ و حرارت بالا مقاوم بوده و علیه باکتری‌های بیماری‌زا مانند اشريشیا کلی اثر بازدارندگی قوی دارد (Chung *et al.*, 2001). در مطالعه حاضر هم لاکتوباسیلوس روتری فعالیت مناسبی در برابر یرسینیا

فیله‌های فیل ماهی (*Huso huso*) دودی طعمدهی شده با آب نمک و سس به مدت ۳۰ روز در یخچال. DOI: ۱۰.۲۲۰۹۲/ISFJ.۲۰۱۹.۱۱۹۳۹۷

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

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 قادر 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 رنگین کمان دارای برخی ویژگی‌های مناسب برای استفاده به عنوان پروبیوتیک هستند، اما در بین سویه‌های جداسازی شده، باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس روتی و لاکتوباسیلوس دلبروکی با شرایط ویژگی‌های بهتر نسبت به سایر سویه‌ها، قابلیت بیشتری برای استفاده و تقویت آنها در دستگاه گوارش قزلآلای رنگین کمان به عنوان پروبیوتیک دارند.

منابع

- حسینی، ع.، چهارلنگ، ف.، ستوده، ا.، علیشاھی، م.، و مدرسی، م.، ۱۳۹۵. اثر لاکتوباسیلوس‌های (*Lactobacillus*) جدا شده از روده ماهی شیربت بر عملکرد رشد، بازماندگی، و فلور (*Cyprinus carpio*). *محله علمی شیلات ایران*, ۲۵(۳): ۱۷۹-۱۸۷ DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110268.۱۶۷
- شناور ماسوله، ع.، پورکاظمی، م.، سلطانی، م.، پارمحمدی، 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 تاسماھی سیبری (*Acipenser baerii*). *محله علمی شیلات ایران*, ۲۷(۵): ۱۹-۲۸ 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

- 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., Gradišnik, 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

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 ruckeri*

*Corresponding author