جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در روده تاسماهی ایرانی

پریسا اسماعیلی*[۱]، نور امیرمظفری[۲]، علیرضا شناور ماسوله[۳]

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۸۳ - ۱۴۱۵۵

۳ - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴ -۴۱۶۳۵

parisa4602@yahoo.com

چکیده

باکتری‌های اسید لاکتیک جزئی از فلور نرمال روده بسیاری ماهیان می‌باشند. هدف از این تحقیق شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در یک گونه ماهی خاویاری ایرانی است. بیست و پنج ماهی قره برون پرورشی با ظاهری سالم به طور تصادفی انتخاب شدند و از روده آن‌ها به صورت استریل نمونه‌برداری شد. پس از تهیه رقت درمحیط MRS آگار کشت داده شدند، پلیت‌ها در جار بی‌هوازی در انکوباتور $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴-۷۲ ساعت گذاشته شدند. باکتری‌های حاصل به اشکال باسیل و کوکسی همه گرم مثبت، کاتالاز منفی و بدون حرکت بودند. جهت شناسایی گونه باکتری‌ها، آزمایش‌های تخمیر کربوهیدرات‌ها، رشد در دماهای مختلف، رشد در pH های مختلف، رشد در NaCl ۶/۵٪، تولید آمونیاک از آرژنین و تولید گاز از گلوکز انجام گرفت. میانگین تعداد باکتری‌ها در روده (Log CFU/gr) ۲/۴۱ ارزیابی شد. *Entrococcus* spp. جنس غالب شناسایی شده در روده تاسماهی ایرانی بود.

کلمات کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، تاسماهی ایرانی، فلور روده.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه‌ای و بین المللی هستند که از نظر اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی برای کشورمان حایز اهمیت است. تاس ماهی ایرانی (قره برون) از گونه‌های بسیار با ارزش ماهیان خاویاری بوده که گوشت و خاویار آن ارزش غذایی دارد، متأسفانه افزایش عفونت‌ها، کاهش شدید در جمعیت آن‌ها را موجب شده است (۱). از آن‌جا که واکسن‌ها به تنهایی نمی‌توانند به عنوان کنترل کننده عمومی بیماری‌ها در آبزیان استفاده شوند یک روش جدید، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در کنترل پاتوژن‌های بالقوه است (۹). درمان با آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی در کنترل بیماری در صنعت آبزی پروری اهمیت دارد، با این حال استفاده ازآنتی بیوتیک‌ها احتمال مقاوم شدن میکروارگانیسم‌ها به دارو را زیاد کرده و همچنین ممکن است میکروب‌های معمول حاضر در روده ماهی را که بسیار مفیدند از بین ببرند (۹). مطالعات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند جایگزین آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی شوند و در پیشگیری از پاتوژن‌های شناخته شده در بیماری‌های مختلف آبزیان موثر باشند (۱۴). پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده تعریف می‌شوند که وقتی به مقدار کافی توزیع شوند سلامت مفید را برای میزبان به ارمغان می‌آورند (۵). باکتری‌های اسید لاکتیک باکتری‌های گرم مثبت، بدون حرکت، بدون اسپور و کاتالاز منفی، به شکل باسیل یا کوکسی هستند که قندهای مختلف را به لاکتات و استات تبدیل می‌کنند (۲، ۴، ۶و ۸). بعضی از آن‌ها به خاطر خاصیت پروبیوتیکشان نقش مهمی در صنعت حیوانات دارند. باکتری‌های اسید لاکتیک عموماً ایمن می‌باشند و ممکن است علیه باکتری‌های پاتوژن خاصیت آنتاگونیستک داشته باشند (۴و۶). هدف از این تحقیق مطالعه کمی وکیفی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در روده قره برون پرورشی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

از وان‌های ۲۰۰۰ لیتری حاوی تاسماهی ایرانی پرورشی (*Acipenser persicus*) توسط بخش تکثیر و پرورش انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری واقع در نزدیکی شهر سنگر در استان گیلان، ۲۵ ماهی قره برون با ظاهری سالم به طور تصادفی گرفته شد. قبل از گرفتن هر ماهی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب نظیر میزان اکسیژن، دما و pH اندازه‌گیری گردید. بعد از گرفتن هر ماهی با وارد کردن ضربه‌ای بر سر، ماهی را کشته و سپس وزن و طول ماهی به طور دقیق اندازه‌گیری و ثبت شد.

روده ماهی را در شرایط کاملاً استریل خارج کرده و روده از وسط در جهت طولی برش داده شد و محتویات آن خارج گردید. داخل روده را با سرم فیزیولوژی شستشو داده و روده را با قیچی استریل تکه تکه کرده و با ترازو وزن آن تعیین گردید. روده را داخل ارلن استریل ریخته و با پیپت استریل، ۹ برابر وزن آن سرم فیزیولوژی اضافه کرده و بعد از تکان دادن سوسپانسیون بدست آمده محلول 10^{-1} است که باید از آن رقت تهیه کرد. تا 10^{-5} رقت تهیه شد و از آن‌ها روی محیط MRS آگار کشت داده شد. پلیت‌ها در داخل انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند و بعد از ۲۴-۷۲ ساعت جار را باز کرده و پلیت‌های حاوی کلونی خارج شدند.کلونی‌های موجود در پلیت‌ها را شمارش کرده و

Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس رقتی که در پلیت کشت داده شده بود CFU/gr روده بدست آمد. بر اساس رنگ، شفافیت، اندازه و ظاهر کلونی‌ها آن‌ها را شمارش کرده و هر نوع را جداگانه در پلیت‌های MRS آگار ساب کالچر داده و درون جار بی‌هوازی در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از رشد، هر کدام به طور جداگانه در MRS براث تلقیح شدند، روی آن‌ها پارافین مایع استریل ریخته شد و در انکوباتور ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از رشد در هر لوله ۰/۲ml گلیسرول ۳۰٪ ریخته شد و محتویات لوله را در ویال‌های اپندورف استریل (۱/۵ml) ریخته و در فریزر ۸۰°C− برای مطالعات بعدی ذخیره شد.

تست کاتالاز و KOH و حرکت و رنگ‌آمیزی به روش گرم صورت گرفت. به منظور مشاهده رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در pH های متفاوت، محیط کشت MRS مایع تهیه شد و قبل از استریل کردن به آن قطره قطره HCl نرمال اضافه شد و هم زمان به وسیله pH متر اندازه‌گیری شد تا pH به ۴/۴ رسید. در مورد pH قلیایی هم از هیدروکسید پتاسیم استفاده شد و pH به ۹/۶ رسید (۶). محیط کشت MRS مایع با ۶/۵٪ NaCl تهیه و کشت شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰°C قرار گرفته و تا ۷ روز، اثر رشدشان با لوله شاهد مقایسه و بررسی شد (۴و۶). رشد در دماهای ۱۰°C و۱۵°و۴۵° تا یک هفته مورد بررسی قرار گرفت (۴و۶).

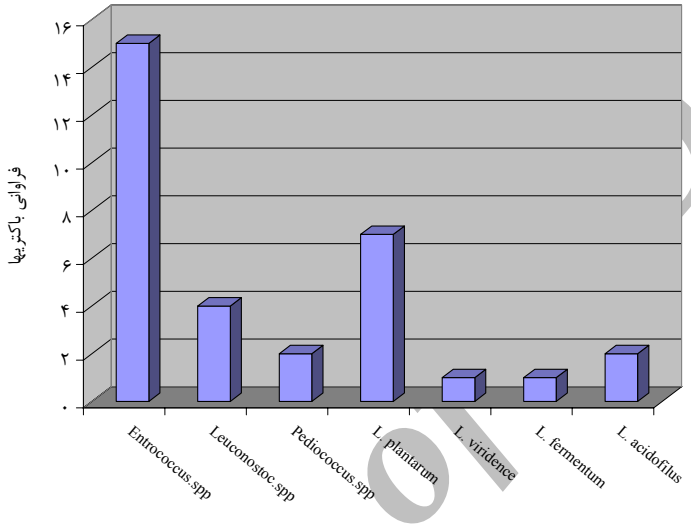
برای ساختن محیط کشت قندی از ترکیبات MRS Broth استفاده شد و به جای گلوکز و عصاره گوشت (Beef extract) هر بار به آن یک درصد از هر یک از قندها شامل: مالتوز، سوکروز، سالیسین، گالاکتوز، مانوز، آرابینوز، مانیتول، گلوکزو لاکتوز (با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شدند و به میزان ۱٪ از قند مورد نظر و ۰/۵ درصد محلول فنل رد) اضافه شد (۴و۱۰). بعد از تلقیح، روی محیط‌ها پارافین مایع استریل ریخته شد و در انکوباتور ۳۰°C قرار گرفتند و نتیجه تا ۷ روز بررسی گردید. آزمایش هیدرولیز آرژنین در MRS Broth بدون عصاره گوشت و گلوکز انجام شد و آرژنین (W/V) ۰/۳٪، سیترات سدیم (W/V) ۰/۲٪، گلوکز ۰/۰۵gr٪ به محیط کشت افزوده شدند. بعد از کشت نتیجه آزمایش تا ۷ روز بعد با معرف نسلر سنجیده شد (۱۰، ۱۱و ۱۵).

نتایج

۲۵ ماهی قره برون پرورشی گرفته شده همگی ظاهری سالم و از نظر وزنی بین ۵۰ تا ۴۵۰ گرم وزن داشتند. و از نظر اندازه، ماهیان ۲۰-۵۵ سانتی‌متر بودند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب پرورشی ماهیان مورد مطالعه، قبل از گرفتن نمونه، اندازه‌گیری شد که میانگین آن‌ها شامل: میانگین دمای آب ۲۶/۲±۰/۳۰°C، میانگین pH ۷/۶۷±۰/۳۶ و میانگین اکسیژن ۶/۵۸±۰/۴۰Mg/L بود. آزمایش حرکت، کاتالاز و KOH در همه باکتری‌ها منفی بود. کلونی‌ها همگی سفید رنگ از اندازه بسیار ریز تا متوسط مشاهده شدند. تعداد کلونی‌های مشاهده شده در پلیت MRS آگار شمرده شد و میانگین تعداد باکتری‌ها در روده (Log CFU/gr) ۲/۴۱ ارزیابی شد. کلونی‌ها فقط در پلیت‌هایی با رقت 10^{-1} ظاهر شدند. در ۲ ماهی از ۲۵ ماهی نمونه‌برداری شده، حتی بعد از ۷۲ ساعت هیچ کلونی در پلیت MRS آگار مشاهده نشد. بعد از شناسایی باکتری‌ها تعداد هر باکتری در هر گرم روده ماهیان بر اساس رقت مشخص شد. انتروکوکوس در

Archive of SID
www.SID.ir

روده بیشتر ماهیان وجود داشته و در حقیقت ٪۴۹/۶ نمونه‌های جدا شده از روده *Entrococcus* spp.، ٪۱۲/۵ *Pediococcus* spp. ٪۶/۲۵، *Leuconostoc* spp. ٪۶/۲۵، *L. acidofilus* ٪۳/۱۲ *L. fermentum* و ٪۳/۱۲ *L. viridence* بودند(شکل ۱).



شکل ۱: فراوانی هر یک از باکتری‌های جدا شده از تاس ماهیان ایرانی مورد آزمایش

بحث

در طی دو دهه گذشته چندین مطالعه در مورد حضور باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهی صورت گرفت. تعداد گزارشات و تحقیقات در زمینه اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک در جلوگیری از بیماری‌های ماهیان در حال رشد است (۲). باکتری‌های روده فعالیت آنتی میکروبیالی دارند که نقش جلوگیری از بیماری‌های عفونی را بازی می‌کنند (۱۳). از آن‌جا که روده بیشترین مسیر آلودگی را در ماهی دارد فلور پایدار روده اهمیت پیدا می‌کند، به خصوص وقتی که عمل واکسیناسیون هنوز کاملاً عملی نشده است (۲). تحقیقات نشان داده است که فلور میکروبی در روده ماهی موازی با تغییرات محیط تغییر می‌کند به عبارت دیگر امکان دستکاری جمعیت میکروبی روده با تغییرات در محتویات غذا امکان‌پذیر است (۲). پروبیوتیک‌ها سلول‌های میکروبی زنده هستند که وقتی به مقدار کافی غلظت داشته باشند به صورت مفید بر روی سلامت و رشد میزبان با تعادل میکروبی روده اثر می‌گذارند (۱۷).اثر ضد میکروبی باکتری‌ها معمولاً به تولید تکی یا الحاقی آنتی بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها، سیدروفورها، لیزوزیم‌ها و پروتئازها و تغییر pH به وسیله تولید اسیدهای ارگانیک بستگی دارد (۱۲و۱۶). باکتری‌های بسیار زیاد گرم مثبت (*Bacillus*، *Carnobacterium*، *Enterococcus*، *Lact-ococcus*، *Lactobacillus*، *Micrococcus* و *Streptococcus*) و گرم منفی (*Aeromonas*، *Alteromonas*، *Photorhodobacterium*، *Pseudomonas* و *Vibrio*) به عنوان پروبیوتیک‌های

Archive of SID

www.SID.ir

آبزیان ارزیابی شدند (۷). دو گونه باکتری اسید لاکتیک *Entrococcus seriolicide* و *Leuconostoc mesenteroides* از روده قره برون جدا شدند (۲). دو جنس *Entrococcus* spp. و *Leuconostoc* spp. هم در این تحقیق از روده قره‌برون پرورشی جداسازی و شناسایی شدند.

Pediococcus acidilactici، *Lactococcus garvieae* و *Enterococcus faecium* بیشترین گونه‌های جدا شده از کپور بودند (۶). *Pediococcus* spp. از روده قره‌برون در این مطالعه جداسازی شد.

L. plantarum از شاه‌ماهی، کریل شمالی و گربه ماهی جداسازی شده است و باکتری برجسته جداسازی شده از میگو بوده است (۱۰). *L. plantarum* لاکتو باسیل برجسته جداسازی شده از قره‌برون پرورشی در این تحقیق نیز بوده است. *L. plantarum* و *Enterococcus* spp. از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جداسازی شدند (۳). از روده ماهی کپور *L. fermentum* گرفته شد (۴) این باکتری از قره‌برون در این تحقیق هم جداسازی شد.

Enterococcus در ماهیان brown trout, common carp, turbot و فراوان در قره‌برون در این تحقیق موجود بود. و همچنین لاکتوباسیل‌ها قسمتی از فلور میکروبی روده ماهیان Arctic chart، Atlantic cod، Atlantic salmon، Bluga، brown trout، common carp، silver carp و قره‌برون مورد مطالعه در این تحقیق را تشکیل می‌دهند (۲).

سپاسگزاری

با تشکر از همکاری علمی و اجرایی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند.

منابع

۱. سر افراز،ژ. و اکبریان،م.، ۱۳۸۴. مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر. انتشارات نقش مهر، صفحه ۶۴.

2. Askarian, F.; Matinfar, A.; Kousha, A.; Bahmani, M.; Khorshidi, K.; Shenavar, A. and Ringo, E., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in the gasrero intestinal tracts of reared Beluga (Huso Huso) and Persian sturgeon (Asipenser persicus). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 3(5):302-311.
3. Azizpour, K., 2009. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west Azarbaijan, Iran. Journal of Biological Science. 4(3):324-326.
4. Azizpour, K.; Tkmechi, A. and Agh, N., 2009. Charectrization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp of west azarbaijan, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances. 8(6):1162-1164.
5. Balcázar, J.; Vendrell, D.; Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J. and Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. 278:188-191.
6. 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.
7. Irianto, A. and Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture (Review). Journal of Fish Diseases, 25:633-642.

Archive of SID

www.SID.ir

8. Karger, S. and Basel, A.G., 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
9. Mesalhy aly, S.; Azza, M.; Rahman, A.; John, G. and Mohamed, M., 2008. Characterization of some bacteria isolated from *oreochromis niloticus* and their potentional use as probiotics. Aquaculture. 277: 1-8.
10. 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.
11. Patil, M.; Pal, A.; Pal, V. and Kumari yaddula, R., 2006-2007. Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacreria from rat intestine. Journal of Culture Collections. 5:58-63.
12. 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.
13. Sugita, H.; Okano, R.; Suzuki, Y.; Iwai, D.; Mizukami, M.; Akiyama, N. and Matsuu, S., 2000. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. Japanese Society of Fisheries Science. 68(5):1004-1011.
14. Van hai, N.; Fotedar, R. and Buller, N., 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methode for use in the culture of western king prawns. Aquaculture. 272:231-239.
15. Verreth, J.; Schrama, J.; Hartemink, R. and Bucio, A., 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.
16. Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64:655-671.
17. Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S., 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.

Archive of SID

www.SID.ir