

اثر آنتاگونیستیک باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از روده

تاس‌ماهی ایرانی بر *Aeromonas hydrophila*

*پریسا اسماعیلی¹، نورامیر مظفری² و علیرضا شناور ماسوله³

¹دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان،²گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران،

³انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت

چکیده

امروزه با توجه به اثرات سودمند باکتری‌های اسیدلاکتیک استفاده از آن‌ها در پرورش آبزیان به طور چشمگیری در حال افزایش است. آنتاگونیسم با بیماری‌ها، خاصیت کلنی شدن در روده و افزایش مقاومت میزبان در مقابل بیماری‌ها، از اثرات این باکتری‌ها است. باکتری‌های اسیدلاکتیک، تولیدات متابولیکی متعددی دارند که ممکن است بر روی میکروب‌های پاتوژن در روده ماهی مؤثر باشند. اثر هفت باکتری اسیدلاکتیک شامل *Entrococcus spp.*, *L. viridescens*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus fermentum* که قبلاً از روده 25 تاس‌ماهی ایرانی در مدت 24 ساعت، بعد از 24 ساعت، اثر ممانعت از رشد *Aeromonas hydrophila* در محیط Well-diffusion داخل چاهک‌ها ریخته شد، بعد از 24 ساعت، اثر ممانعت از رشد بر روی چاهک‌ها کشت داده شد و بعد از انکوباسیون در 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت، اثر آنتاگونیستیکی از *Entrococcus spp.* مشاهده شد و آن‌ها بررسی شد. از میان باکتری‌های مورد بررسی بیشترین اثر آنتاگونیستیکی از *L. fermentum* مشاهده شد و باکتری‌های *L. acidophilus* هیچ اثر آنتاگونیستیکی علیه آئروموناس نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیسم، باکتری‌های اسیدلاکتیک، تاس‌ماهی ایرانی، *Aeromonas hydrophila*

داشته است (Verschueren و همکاران، 2000). از آنجا که واکسن‌ها به تنها یک نمی‌توانند به عنوان کنترل‌کننده عمومی بیماری‌ها در آبزیان استفاده شوند، یک روش جدید، استفاده از باکتری‌های پروپیوتیک در کنترل پاتوژن‌های بالقوه است (Mesalhy و همکاران، 2008). باکتری‌های اسیدلاکتیک عموماً این می‌باشند و ممکن است علیه باکتری‌های پاتوژن خاصیت آنتاگونیستیکی داشته باشند (Azizpour و Mesalhy، 1999، 2009؛ Cai، 2009). آئروموناس‌های متحرک به خصوص *A. hydrophila* که ماهیان آب شیرین و دیگر ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Mesalhy، 2008)، باعث عفونت‌های بسیاری در ماهیان شده و معمولاً با جراحات کوچک سطحی،

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی هستند که از نظر اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی برای کشورمان حائز اهمیت است. تاس‌ماهی ایرانی (قره‌برون) از گونه‌های بسیار بازرس ماهیان خاویاری بوده که گوشت و خاویار آن ارزش غذایی دارد (سرافراز و اکبریان، 1384). بروز بیماری‌ها در آبزیان به عنوان مانعی بر افزایش تولید و توسعه اقتصادی در بسیاری کشورها می‌باشد. تاکنون دیدگاه معمول در مورد استفاده از ضدغونه‌کننده‌ها و داروهای ضدمیکروبی، موفقیت محدودی در جلوگیری یا درمان بیماری‌های آبزیان

*مسئول مکاتبه: Parisa4602@yahoo.com

⁸(10) در چاهک‌ها ریخته شد (از هر باکتری در سه چاهک تکرار شد) و بدون این که پلیت‌ها برگردانده شوند، به مدت 24 ساعت در انکوباتور 30 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

جهت به دست آوردن گونه آئروموناس هیدروفیلای مورد نیاز، از پوست، روده و کلیه ماهیان دارای عالم بالینی نمونه برداری شد و با یک سواب استریل در محیط TSA کشت داده شد و در دمای 28 درجه سانتی‌گراد تا 24 ساعت در انکوباتور قرار گرفت. بعد از این مدت کلونی‌ها بررسی شدند. رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز و تست‌های بیوشیمیایی و تغیریقی انجام شد و بر طبق اصول Bergeys (Brenner و همکاران، 2005)، گونه پاتوزن آئروموناس هیدروفیلا شناسایی گردید.

آئروموناس هیدروفیلا در محیط TSB کشت داده شد و بعد از رشد، کدورت سوسپانسیون میکروبی برابر با لوله 0/5 مکفارلن با سرم فیزیولوژی به 10^6 رسانیده و با سواب استریل بر روی محیط‌های کشت 24 ساعته باکتری‌های اسیدلاکتیک کشت داده شد. سپس محیط‌ها برگردانده و 24 ساعت در انکوباتور 30 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از 24 ساعت پلیت‌ها، خارج و هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها به میلی‌متر ثبت شد (Mesalhy و همکاران، 2008). آزمایش برای هر گونه باکتریایی با سه تکرار انجام شد.

نتایج

هاله عدم رشد اطراف چاهک براساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در جدول 1 قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک بر روی well-diffusion باکتری پاتوزن آئروموناس به روش مشخص گردیده است. چهار لاكتوباسیل و سه کوکسی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین هاله عدم رشد را علیه *Entrococcus spp.* داشتند. *Pediococcus spp.* و *L. viridescens* *L. plantarum* *Leuconostoc* به ترتیب بعد از انتروكوکوس

ریزش فلس‌ها، خون‌ریزی موضعی، و سپتی سمی در ارتی-اط می‌باشد (Balcazar و همکاران، 2008) در سال‌های 2006 و 2007 و 2008 بر روی اثرات باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از روده ماهیان علیه آئروموناس هیدروفیلا تحقیقات بسیاری انجام داده است. هدف از این تحقیق بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک بر علیه *A. hydrophila* در شرایط in-vitro است که می‌توان پس از بررسی در شرایط in-vivo به عنوان پروبیوتیک به غذای ماهی افزود و مقاومت آن را در برابر بیماری‌زایی آئروموناس بالا برد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های انسستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در ماههای تیر و مرداد انجام شد. 25 تا ماهی ایرانی با ظاهری سالم به طور تصادفی انتخاب شدند. ماهیان بین 50 تا 450 گرم وزن و 20 تا 55 سانتی‌متر طول داشتند. باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از ماهیان *Pediococcus spp.* *Entrococcus spp.* *L. acidophilus* *L. plantarum* *Leuconostoc spp.* شامل *L. viridescens* و *L. fermentum* بود که به روش بیوشیمیایی شناسایی شدند (Cai و همکاران، 1999؛ Brenner و همکاران، 2005؛ قیطانچی و همکاران، 2004-2005؛ Nair و Surendran، 2007؛ Harrigan 1998). سپس در محیط کشت MRS مایع کشت و در انکوباتور با دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت رشد داده شدند تا کشت تازه به دست آید. پلیت‌های حاوی محیط کشت آماده شده و به وسیله ته یک پیپت پاستور استریل، یک چاهک به قطر 6 میلی‌متر در آن ایجاد شد سپس با پیپت استریل یک قطره آگار 2 درصد ته چاهک ریخته شد. وقتی آگار بسته شد، 30 میکرولیتر از باکتری‌های اسیدلاکتیک (CFU/ml)

هیچ فعالیت آنتاگونیستی نشان ندادند.

بزرگ‌ترین هاله عدم رشد را نشان دادند. در حالی که *L. acidophilus* و *L. fermentum* علیه آثروموناس

جدول 1- متوسط قطر هاله عدم رشد توسط باکتری‌های جدا شده پس از 24 ساعت

گونه باکتری‌ها	قطر هاله عدم رشد
<i>L. plantarum</i>	14 میلی‌متر
<i>L. fermentum</i>	0 میلی‌متر
<i>L. acidophilus</i>	0 میلی‌متر
<i>L. viridescens</i>	14 میلی‌متر
<i>Enterococcus</i> spp.	16 میلی‌متر
<i>Leuconostoc</i> spp.	15 میلی‌متر
<i>Pediococcus</i> spp.	13 میلی‌متر

Enterococcus و *Pasteurella piscicida* استفاده کنند (Kumar و همکاران، 2006). در این مطالعه از *A. hydrophila* به عنوان پاتوژن استفاده شد. اولین گزارش در مورد وجود باکتری‌ها در ماهیان آب شیرین با اثر ممانعتی علیه *A. hydrophila* به *Olmos* و *Ochoa* منسوب است (*L. lactis* و *Lc. lactis*). (Omos, 2006) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر *A. hydrophila* مؤثر بوده و خاصیت چسبندگی آن را به روده میزبان در *in-vitro* شرایط کاشهش دادند (Balcázar و Sugita, 1998). *L. plantarum* مورد آزمایش در همکاران، 2008). این تحقیق بر علیه *A. hydrophila* مؤثر بود، ولی *L. fermentum* جدا شده از روده ماهی، هیچ اثر آنتاگونیستیکی نشان نداد.

باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از ماهی آزاد، شامل *Leuconostoc mesenteroides* و *Lactobacillus curvatus* *Lactococcus lactis* از رشد چندین سویه *Lactobacillus sakei* آثروموناس جلوگیری کردند (Balcázar و همکاران، 2006). سه سویه باکتری اسید لакتیک *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *Lactococcus lactis* *Lactobacillus curvatus*

بحث و نتیجه‌گیری

در طی دو دهه گذشته تحقیقات متعددی در مورد حضور باکتری‌های اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش ماهی صورت گرفت. تعداد گزارشات و تحقیقات در زمینه اهمیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در پیشگیری از بیماری‌های ماهیان در حال افزایش است (Askarian و همکاران، 2008). باکتری‌های روده فعالیت ضدمیکروبی دارند که نقش جلوگیری از بیماری‌های عفونی را بازی می‌کنند (Sugita و همکاران، 1998). از آنجا که روده بیشترین مسیر آلودگی را در ماهی دارد، فلور پایدار روده اهمیت پیدا می‌کند، بهخصوص وقتی که انجام واکسیناسیون هنوز کاملاً عملی نشده است. 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 (Askarian و همکاران، 2008).

آزمایش ممانعت از رشد به وسیله ترکیبات مختلف، به شرایط آزمایشگاهی (*in-vitro*, *in-vivo*) در آزمون‌های بستگی دارد (Gatesoupe, 1999). در آزمون‌های *in-vitro* بیشتر سویه‌های پاتوژن *Aeromonas* یا *Vibrio* مورد هدف بودند (Kumar و همکاران، 2006). دیگر محققان سعی کردند از دیگر پاتوژن‌ها *Yersinia ruckeri* *Edwardsiella tarda* نظیر

از طریق اندازه‌گیری فاکتورهای سرولوژی و ایمونوگلوبولین جهت کترل زیستی علیه عفونت در ماهی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری علمی و اجرایی انسستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

subsp. *cremoris* از رشد همه سوبه‌های پاتوژن مورد آزمایش در ماهی در شیرایط in-vitro Balcázar و همکاران، *Entrococcus* spp. (2007) در بررسی حاضر هم *Leuconostoc* spp. *Pediococcus* spp. ممانتی علیه باکتری پاتوژن نشان دادند. تحقیقات بعدی به صورت آزمایشات in-vivo با روش Challenge بین ماهی و باکتری‌های اسیدلاکتیک مورد نظر از طریق تغذیه ماهیان و سپس مطالعه سطح اینمی اثر

منابع

- سرافراز، ز.، و اکبریان، م.، 1384. مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر. انتشارات نقش مهر، صفحه 64.
- قیطانچی، ا.، نوروزی، ج.، و روشنلد، ن.، 1387. بررسی فعالیت آنزیم بتاگلاکتوزیداز جدا شده از لاکتوواسیل‌های موجود در شیر و پنیر و مشاهده باند پروتئینی آن با روش SDS-PAGE. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، صفحات 80 تا 84.
- Askarian, F., Matinfar, A., Kousha, A., Bahmani, M., Khorshidi, K., Shenavar, A. and Ringo, E., 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.
- Azizpour, K., Tkmechi, A. and Agh, N., 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp of west azarbajian, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances 8 (6), 1162-1164.
- Balcázar, J., Vendrell, D., Blas, I., Zarzuela, I., Muzquiz, J. and Evora, M., 2006. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microbial Ecology in Health and Disease 18 (1), 61-63.
- 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.
- Balcázar, J., Vendrell, D., Blas, I., Zarzuela, I., Muzquiz, J. and Girones, O., 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Veterinary Microbiology 122 (3-4), 373-380.
- Brenner, D., Krieg, N. and Staley, J., 2005. Bergey manual of systematic bacteriology. Book, Second edition pp. 570-572.
- 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.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147-165.
- Harrigan, W., 1998. Laboratory methods in food microbiology. Book, Third Edition 389, 431-432.
- Kumar, T.B., Samal, S., Samantaray, B., Sethi, S., Pattnaik, P. and Kumar, M.B., 2006. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 253, 17-244.
- Mesalhy, A.S., Azza, M., Rahman, A., John, G. and Mohamed, M., 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture 277, 1-8.
- 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.
- Ochoa, S.J.L. and Omos, S.J., 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. Food Microbiology 23, 519-525.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. and Deguchi, Y., 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture 165, 269-280.

Verschueren, L., Rombaut, G. and Sorgeloos, P., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4), 655-671.
Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 4, No. 4, March 2011

Antagonistic Effect of Lactic Acid Bacteria from Persian Sturgeon Gut Against *Aeromonas hydrophila*

P. Esmaeily¹, N. Amirmozafari² and A.R. Shenavar Masoole³

¹Islamic Azad University, Lahijan Branch, ²Dept. of Microbiology, Iran University of Medical Science,
³Dr. Dadman International Sturgeon Research Institute, Rasht

Abstract

Nowadays, in lights of the many beneficial effects of Lactic acid bacteria (LAB), their usage in fish breeding is on rise. Antagonism with pathogenic bacteria, their ability to colonize the intestinal tract, and increasing the innate resistance towards diseases are amongst the beneficial effects of their usage. These bacteria elaborate a great deal of metabolites that may have adverse effects upon many pathogenic microbes in fish intestinal tract. The effects of seven LAB involve: *Entrococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidofilus*, *L. viridience*, that were previously isolated and identified from 25 fish gut in summer, studied by using well-diffusion method. Bacteria were poured in wells on TSA medium, *Aeromonas hydrophila* were cultured on medium after 24 hours then after incubation in 30 °C with 24 hours, inhibition of growth effect were studied. The *Entrococcus* spp. were shown to display the highest inhibitory effect against this pathogen bacteria but *L. fermentum*, *L. acidofilus* showed no antagonistic effect against *Aeromonas*.

Keywords: Antagonism; Lactic acid bacteria; *Acipenser persicus*; *Aeromonas hydrophila*

* Corresponding Author; Email: Parisa4602@yahoo.com