Archive of SID

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از روده تاسماهی سیبری(*Acipenser baerii*)

علیرضا شناور ماسوله[۱*]، محمد پورکاظمی[۲]، مهدی سلطانی[۳]، مهتاب یارمحمدی[۱]، محمد علی یزدانی[۱]، مهدی علیزاده[۱]، جلیل جلیل پور[۱]، سهیل بازاری مقدم[۱]، مهدی معصوم زاده[۱]، سید حسین حسینی فر[۴]، پریسا اسماعیلی[۵]، یلدا بنی اسماعیلی[۵]

[*]Shenavar1969@gmail.com

۱- مؤسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- دانشکده منابع طبیعی و کشاورزی گرگان، گرگان، ایران
۵- پارک علم و فناوری گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

چکیده

ماهیان خاویاری به سبب تولید گوشت و خاویار، از ارزشمندترین گونه های دریای خزر هستند. در پرورش ماهیان خاویاری، همانند سایر گونه های پرورشی در کشور، بروز و افزایش انواع بیماریهای عفونی مورد انتظار بوده است و دراین راستا جداسازی، شناسایی و بکارگیری پروبیوتیک‌های اختصاصی، می تواند در بهبود سلامت و شاخص های رشد بسیار موثر باشد. بدین منظور از گونه تاسماهی سیبری به تعداد ۳۸ قطعه نمونه برداری شد و علاوه بر کشت و شمارش باکتری‌های هوازی و بی هوازی اختیاری روده در محیط کشت TSA، باکتری‌های اسید لاکتیک نیز با استفاده از محیط کشت MRS جداسازی و مورد شمارش قرار گرفتند. در تاسماهی سیبری میانگین شمارش باکتری های اسید لاکتیک ۰/۱۱± ۲/۷۲ و شمارش کل باکتریایی ۰/۱۹± ۶/۷۹ بر حسب لگاریتم تعداد کلنی در هر گرم بوده است. با استفاده از تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA، باکتریهای اسید لاکتیک در روده در تاسماهی سیبری شامل *Weissella confusa*، *Lactococcus garvieae* و *Lactococcus lactis* مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. تکمیل مطالعات آزمایشگاهی و میدانی جهت بکارگیری این باکتریها به عنوان پروبیوتیک مورد نیاز می باشد.

کلمات کلیدی : پروبیوتیک، ماهیان خاویاری، آبزیان، روده، غذا

[*] **نویسنده مسئول**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه ای و بین المللی هستند که از نظر اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی برای کشورمان حایز اهمیت می باشند (سرافراز و همکاران، ۱۳۸۴). امروزه پروبیوتیکها نه تنها به عنوان محرک رشد بلکه برای تحریک دستگاه ایمنی و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماریها به کار گرفته می شوند (افشار مازندران و همکاران، ۱۳۸۶; حسینی و همکاران، ۱۳۹۷; علیزاده نوذری و شاپوری، ۱۳۹۶). علی رغم مطالعاتی که در گذشته در زمینه پروبیوتیک ها بر روی انواع گونه های آبزی (Gatesoupe, 1999; Ringø & Gatesoupe, 1998) انجام گرفته است، در سالهای اخیر مطالعات زیادی در آبزی پروری در راستای استفاده از باکتریهای اسید لاکتیک جهت نیل به اهداف گوناگون نظیر کاهش بیماریهای عفونی و غیر عفونی، کاهش مصرف آنتی بیوتیک، بهبود شاخص گنادی و لقاح درمولدین، بهبود تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی، کنترل تکثیر و فعالیت باکتریهای بیماریزا، تحریک سیستم ایمنی، کاهش استرس و حساسیت به بیماری ها، بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی و همچنین کاهش تلفات انجام گرفته است (Soltani *et al*.,2008). در داخل کشور Askarian و همکاران (۲۰۰۸)،باکتریهای اسید لاکتیک را در گونه ی تاسماهی ایرانی و فیل ماهی مورد مطالعه قراردادند، گونه های مورد بررسی در اوزان بالای ۱۰۰ گرم و لاروی از تنوع یکسانی از باکتریهای اسید لاکتیک به ترتیب با شمارش تقریبی 10^{5} –10^{6} CFU g^{-1} روده و CFU 10^{6}Larvae^{-1} شامل *Enterococcus seriolicida*، *L. mesenteroides* درگونه تاسماهی ایرانی و باکتریهای *Lactobacillus curvatus*، *Lactococcus raffinolactis*، *L. lactis* و *Streptococcus* sp. در فیل ماهیان برخوردارند، که در این راستا لزوم بررسی دقیق تری در زمینه باکتریهای اسید لاکتیک بومی ماهیان خاویاری را مشخص می سازد. Ghanbari و همکاران (۲۰۰۹) ، لاکتوباسیلهای *L. sakei*، *L. plantarum*، *L. oris*، *L. casei*، *L. coryneformis*، *L. alimentarius* و *L. brevis* را از روده تاسماهیان و فیل ماهیان صید شده از دریای خزر جداسازی کردند و مورد شناسایی قرار دادند. همچنین اسماعیلی (۱۳۸۸)، باکتریهای اسید لاکتیک را در اوزان بالای ۱۰۰ گرم در گونه تاسماهی ایرانی مورد شناسایی قرار داد. تعیین دقیق باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک گونه های پرورشی خاویاری دارای اهمیت و با توجه به توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور ضروری بنظر می رسد. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای تولیدکننده اسید لاکتیک در تاسماهی سیبری به عنوان باکتریهای بومی و اختصاصی پروبیوتیک در پرورش این گونه بوده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی باکتریهای اسیدلاکتیک:

جهت شناسایی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در گونه تاسماهی سیبری، از ۳۸ قطعه با میانگین وزنی ۳۱/۳ ±۲/۲۸ گرم و میانگین طول ۶۰/۳±۱۱/۷۲ سانتی متر از مجتمع تکثیر و پرورش شهید بهشتی استان گیلان بطور تصادفی تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شد و مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان پس از انتقال به آزمایشگاه زیست سنجی شدند و پس از ضدعفونی سطح شکمی ماهیان با الکل ۷۰٪، در شرایط استریل اقدام به باز کردن شکم ماهی گردید. پس از جمع آوری روده، اقدام به تشریح آن گردید و پس از تخلیه محتویات آن، توسط سرم فیزیولوژی سه بار مورد شستشو قرار گرفت. پس از توزین آن در داخل ظروف استریل، سرم فیزیولوژی جهت تهیه رقت مورد نظر به آن اضافه شد. پس از تهیه رقت های مورد نظر در مراحل بعدی، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت برروی محیط کشت TSA[1] جهت شمارش باکتری های هوازی و بی هوازی اختیاری به صورت سطحی کشت داده شد و پلیت ها در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت

[1] Trypticase Soy Agar

www.SID.ir

Archive of SID

۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی MRS [۲] آگار استفاده گردید و پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا۷۲ ساعت در شرایط بی هوازی قرارداده شدند. سپس باکتری ها بر اساس رنگ، شکل و اندازه مورد مطالعه قرار گرفتند و پس از شمارش بر اساس CFU [۳] ، کشت خالص جهت مطالعات مولکولی تهیه گردید (Soltani *et al.*, 2013). استخراج DNA: به منظور مطالعه مولکولی باکتریها، در ابتدا DNA ایزوله های خالص با استفاده از کیت(No. 12-3450-01) peq Bacterial DNA GOLD مورد استخراج قرار گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده باکتریها به ترتیب با استفاده ازدستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND 1000 در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ بررسی شد. DNA هایی که از کیفیت مناسب برخوردار بودند برای انجام آزمایش PCR انتخاب شدند. انجام آزمایش PCR : برای انجام آزمایش PCR از یک جفت پرایمر عمومی شناسایی باکتریها (Lane, 1991) برای تکثیر ژن16S rRNA به شرح زیر استفاده گردید:

Forward sequencing primer: 27f
(5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)
Reverse sequencing primer:
1492r(5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT)

برای انجام آزمایش PCR به شرح زیر عمل گردید : ترکیب واکنش ۵۰ میکرولیتریPCR شامل ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر پرایمر F ، ۲ میکرولیتر پرایمر R ، ۵ میکرولیتر بافر PCR ، ۲ میکرولیتر MgCl2، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۰/۴ میکرولیتر Taq و ۳۵/۶ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده گردید. برای تکثیر DNA از دستگاه PCR مدل EP شرکت Eppendorf آلمان استفاده شد. چرخه های حرارتی PCR شامل مرحله واسرشته سازی اولیه [۳] در۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس مراحل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک نیز از محیط کشت واسرشته سازی، پهلوگیری پرایمرها و بسط به ترتیب ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در انتها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بوده است. جهت بررسی محصول PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با ایتیدیوم بروماید انجام گردید و ژل در دستگاه مستند ساز ژل [۴] ساخت شرکت Vilber lourmant همراه با برنامه نرم افزاری Biocape بررسی شد. در نهایت ۱۵ میکرولیتر از محلول حاوی استخراج DNA به همراه پرایمرهای مورد استفاده برای توالی یابی دو طرفه به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت توالی ها با استفاده از برنامه Blast NCBI به منظور مقایسه و تعیین درصد مشابهت با نمونه های موجود در بانک ژن NCBI مورد استفاده قرار گرفتند. جهت مطالعه آماری علاوه بر استفاده از آمار عمومی و توصیفی از آزمون غیرپارامتریک Chi-squareجهت مقایسه فراوانی باکتریها استفاده گردید.

نتایج

نتایج شمارش باکتریهای جدا شده از روده: نتایج شمارش باکتریهای روده تاسماهی سیبری در محیط کشت MRS آگار در جدول ۱ آورده شده است و از ۳۸ ماهی کشت داده شده فقط از روده ۱۱ ماهی باکتریهای پروبیوتیکی مورد جداسازی قرارگرفت. همچنین آزمونهای اولیه بر روی باکتریهای جداسازی شده از روده ماهیان در محیط کشت MRS آگار نشان داد که این باکتریها دارای خصوصیات گرم مثبت، کاتالاز منفی، فاقد قدرت همولیتیک بوده اند و همچنین کمینه و بیشینه آنها به ترتیب ۲ تا ۳/۷۰ ($Log\ CFU\ g^{-1}$) بوده است.

[1] de Man, Rogosa and Sharpe Agar
[2] Colony Forming Unit
[3] initial denaturation
[4] Gel documentation

www.SID.ir

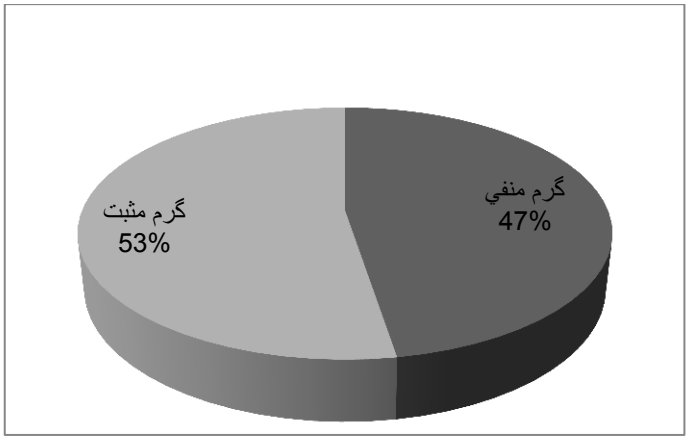
Archive of SID

جدول۱: نتایج شمارش باکتری های روده ($Log\ CFU\ g^{-1}$) تاسماهی سیبری در محیط کشت MRS Agar

Table 1:The results of intestinal bacteria count ($Log\ CFU\ g^{-1}$) of Siberian sturgeon in MRS Agar culture medium

شماره ماهی	نمونه ها	باکتریهای اسید لاکتیک (Log CFU g-1)
۱	M۱-۱	۲/۸۴
	M۲-۱	۲/۳
۳	M۱-۳	۳/۳۴
	M ۳-۳	۳/۰۴
	M ۴-۳	۲/۸۴
۵	M۳-۵	۲/۳۰
	M۵-۵	۲/۸۴
۹	M۱-۹	۲/۶
	M۳-۹	۲/۴۷
۱۰	M۱-۱۰	۲
	M۳-۱۰	۲/۶
۱۱	M۱-۱۱	۲/۶۹
۱۲	M۳-۱۲	۳/۲۷
۱۳	M۱-۱۳	۲/۳
۲۶	M۲-۲۶	۳/۷
۲۷	M۱-۲۷	۲
۳۲	M۱-۳۲	۳/۱۷

براساس شکل ۱، از تعداد ۳۸ باکتری جدا سازی شده در محیط کشت TSA، باکتری های گرم مثبت فراوانی بیشتری را (تعداد ۲۰ و ۵۳ درصد) نسبت به باکتری های گرم منفی(تعداد ۱۸ و ۴۷ درصد) داشته اند.



شکل ۱: فراوانی باکتری های روده(گرم مثبت و گرم منفی) روده تاسماهی سیبری در محیط کشت TSA

Figure 1: Frequency of intestinal bacteria (gram positive and gram negative) in TSA culture medium

www.SID.ir

Archive of SID

بر اساس شکل ۲، میانگین شمارش باکتری های اسید لاکتیک (Log CFU g^{-1}) ۰/۱۱± ۲/۷۲ و میانگین شمارش کلی باکتریایی در محیط کشت TSA برابر با ۰/۱۹± ۶/۷۹ بوده و بین میانگین آنها اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (p<۰/۰۵).

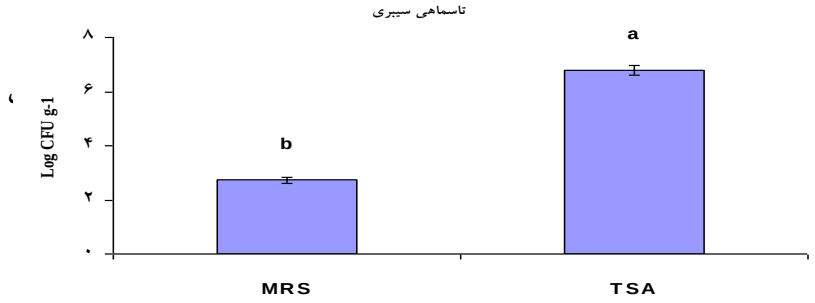
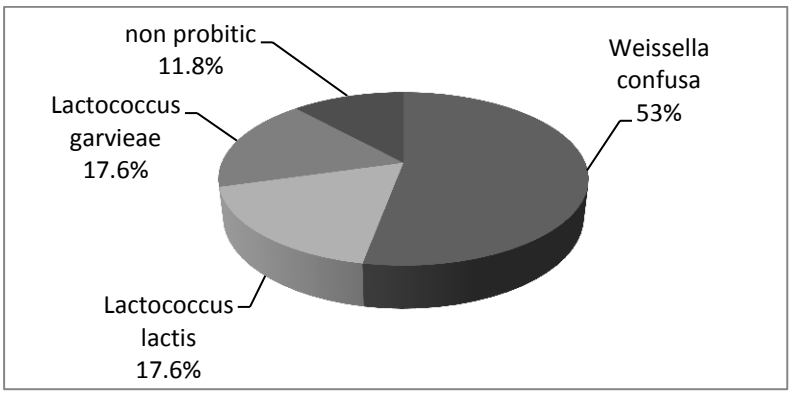


Figure 2: Comparison of the average of lactic acid bacterial count and total bacterial count (Log CFU g-1) in the Siberian sturgeon intestine

نتایج شناسایی مولکولی: نتایج حاصل از آزمایش PCR با استفاده از پرایمر عمومی باکتریها نشان داد که محصول PCR یک قطعه باند DNA به طول تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز بود که در همه نمونه های مورد بررسی مشاهده شد. با استفاده از تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA ، باکتریهای اسید لاکتیک در روده تاسماهیان سیبری باکتریهای اسید لاکتیک *Weissella confusa* ، *Lactococcus lactis* و *L. garvieae* مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت. بر اساس شکل ۳، در بررسی فراوانی باکتری های شناسایی شده از تاسماهی سیبری بر روی محیط کشت MRS، از ۱۷ باکتری شناسایی شده، به ترتیب باکتری های *W. confusa* (تعداد ۹ و فراوانی ۵۳٪)، *L. garvieae* (تعداد ۳ و فراوانی ۱۷/۶٪)، *L. lactis* (تعداد ۳ و فراوانی ۱۷/۶٪) و باکتری های غیر پروبیوتیکی (non probitic) (تعداد ۲ و فراوانی ۱۱/۸٪) مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفت.



شکل۳: فراوانی باکتری های جداسازی شده از روده تاس ماهی سیبری

Figure 3: Frequency of bacteria isolated from the intestine of Siberian sturgeon

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج حاصل از بررسی شمارش باکتریهای اسید لاکتیک در روده تاسماهی سیبری با میانگین وزنی حدود ۳۱ گرم نشان داد که میانگین تراکم این باکتریها معادل $Log\ CFU\ g^{-1}$ ۰/۱۱±۲/۷۲ بوده است. تثبیت، تکثیر و عملکرد باکتریهای اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهیان بطور عمده تحت تاثیر فاکتورهای مختلف محیطی نظیر کیفیت آب، سختی، اکسیژن محلول، دما، pH، فشار اسمزی، تماس های مکانیکی، میکروفلور محیطی و همچنین گونه های مورد بررسی می باشد (Das *et al*., 2008). از سوی دیگر مشخص شده است که باکتریهای اسید لاکتیک از لحاظ تغذیه ای مشکل پسند[5] هستند و برای رشد به کربوهیدرات ها، ویتامین ها، مشتقات اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای آمینه و پپتیدها نیاز دارند (Ringø & Gatesoupe, 1998). در بررسی Soltani و همکاران (۲۰۱۳)، شمارش باکتریهای اسید لاکتیک در روده تاسماهی ایرانی با میانگین وزنی حدود ۳ گرم معادل $Log\ CFU\ g^{-1}$ ۴/۳۸ و شامل باکتریهای لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتوکوکوس گارویه، پدیوکوکوس پنتوساسئوس و ویسلا سیبریا بود که ازلحاظ باکتریهای لاکتوکوکوس و ویسلا با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه Askarian و همکاران (۲۰۰۹)، مشخص گردید که تراکم باکتریهای اسید لاکتیک روده ماهیان خاویاری (تاسماهی ایرانی و فیل ماهی) در اوزان بالای ۱۰۰ گرم در محدوده (Log $CFU\ g^{-1}$) ۳-۵ بوده است که با مطالعه حاضر از لحاظ تراکم این باکتریها در روده مغایرت داشته است ولی درخصوص حضور باکتریهایی از جنس *Lactococcus* مطابقت دارد. میزان شمارش باکتریهای اسید لاکتیک در روده تعدادی از ماهیان آب شیرین با محدوده وزنی۱۰۰۰-۳۰۰ گرم نیز از ۵ تا ۷ (Log CFU g^{-1}) متغیر بوده است (Hagi *et al*.,2004) که بر خلاف تحقیق حاضر دارای فراوانی بیشتری از باکتریهای اسید لاکتیک در روده بوده اند. مطابق نتایج حاصل از این بررسی باکتریهای اسید لاکتیک در تاسماهی سیبری شامل *W. confusa*، *L. garvieae* و *L. lactis* مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. Ghanbari و همکاران (۲۰۰۹)، با استفاده از روشهای بیوشیمیایی صرفا به بررسی لاکتوباسیلوسهای روده تاسماهی ایرانی و فیل ماهیان صید شده از دریای خزر پرداختند و لاکتوباسیلهای *L. sakei*، *L. plantarum*، *L. oris*، *L. casei*، *L. coryneformis*، *L. alimentarius* و *L. brevis* را با تراکم لگاریتمی ۵ تا ۶ در هر گرم روده مورد شناسایی قرار دادند (Ghanbari *et al*.,2009) ولی در مطالعه حاضر *Lactobacillus* مورد جداسازی قرار نگرفت. همچنین Askarian و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی تنوع باکتریهای اسید لاکتیک در گونه های تاسماهی ایرانی و فیل ماهی در اوزان بالای ۱۰۰ گرم سایر باکتریهای اسید لاکتیک نظیر *Leuconostoc mesenteroides*، *Lactobacillus curvatus* و *Streptococcus* spp. را شناسایی کردند که در تحقیق حاضر مورد جداسازی قرار نگرفت. فلور میکروبی روده ماهیان تحت تاثیر تغییرات محیطی می باشد و انتظار می رود که تنوع آنها در انواع آبزیان متفاوت باشد. شرایط داخلی دستگاه گوارش، فاکتورهای محیطی، دمای آب، تفاوتهای فیزیولوژیکی انواع ماهیان و تفاوتهای تغذیه ای را می توان از عوامل احتمالی موثر در تنوع و تراکم باکتریهای اسید لاکتیک در روده ماهیان برشمرد (Hagi *et al*.,2004). در این بررسی باکتری *W. confusa* برای اولین بار از روده تاسماهی سیبری مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفت. در بررسی Soltani و همکاران (۲۰۱۳)، نیز باکتری *W. cibaria* از تاسماهی ایرانی جداسازی گردید. نتایج تحقیق Lee و همکاران (۲۰۱۲)، نشان داد که *W.confusa* دارای خواص پروبیوتیکی بهتری نسبت به *W. cibaria* است. بکارگیری باکتریهای *W. confusa* و

[5] fastidious

www.SID.ir

Archive of SID

W. cibaria که از خرچنگ *Portunus pelagicus* مورد جداسازی قرار گرفت، خواص پروبیوتیکی در آن نداشته است (Talpur *et al*., 2012). با توجه به پتانسیل خواص پروبیوتیکی این باکتری می توان این باکتری را جهت انجام مطالعات تکمیلی در نظر داشت. تاکنون باکتریهای از جنس *Lactococcus* به میزان زیادی از روده ماهیان از جمله ماهیان خاویاری مورد جداسازی قرار گرفته اند (Balcazar *et al*.,2007a; Hagi *et al*., 2004; Askarian *et al*.,2009; Hovda *et al*., 2007; Soltani *et al*.,2013; Merrifield *et al*.,2010). در مطالعه حاضر باکتریهای لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوکوکوس گارویه از روده تاسماهیان مورد مطالعه جداسازی گردیدند. در بررسی Soltani و همکاران (۲۰۱۳) نیز باکتریهای لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوکوکوس گارویه از تاسماهی ایرانی نیز جداسازی شدند. *L. lactis* spp. *cremoris* و *L. raffinolactis* از روده گونه های تاسماهی ایرانی و فیل ماهی در اوزان بالای ۱۰۰ گرم توسط Askarian و همکاران (۲۰۰۹) جداسازی گردید. Hovda و همکاران (۲۰۰۷)، *Lactococcus* را از روده ماهی سالمون مورد جداسازی قرار داده اند. همچنین Hagi و همکاران (۲۰۰۴)، در فصول مختلف باکتری *Lactococcus* را در روده کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) ، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کپور زرد (*Carassius carassius*) و گربه ماهی (*Ictalurus punctatus*) مورد شناسایی قرار داده اند. Balcazar و همکاران (۲۰۰۷a)، نیز باکتری *L. lactis* subsp. *lactis* را توسط روشهای مولکولی از آزاد ماهیان جداسازی کرده اند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. جداسازی این باکتری در انواع ماهیان نشان می دهد که احتمالا قابلیت آداپته شدن این باکتری در شرایط فیزیولوژیک دستگاه گوارش گونه های مختلف بسیار زیاد است. *L. lactis* در شرایط In vivo در ماهیان دارای اثرات ایمنولوژیک نظیر افزایش فعالیت انفجار تنفسی، ایمنوگلوبولین، لیزوزیم، فعالیت کمپلمان و فاگوسیتیک بوده است (Balcazar *et al*., 2006 a,b; 2007a,b; 2009). بطوریکه در نتایج آمده است، *L. garvieae* نیز در این مطالعه مورد جداسازی قرار گرفت. *L. garvieae* که قبلا تحت عنوان *Enterococcus seriolicida* نام گذاری شده بود از عوامل استرپتوکوکوزیس در انواع ماهیان آب شور نظیر دم زرد (*Seriola quinqueradiata*) در ژاپن و همچنین انواعی از ماهیان آب شیرین نظیر ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*)، در برخی از کشورها نظیر ایتالیا، اسپانیا، فرانسه، انگلیس و استرالیا محسوب می شود (Toranzo *et al*., 2005). همچنین در ایران این باکتری در مزارع قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) از ماهیان بیمار مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفته است (Soltani *et al*.,2008; Sharifiyazdi *et al*., 2010). باکتریهای *L. lactis* subsp. *lactis* و *L.lactis* subsp. *cremoris* از *L. garvieae* مهمترین گونه های جنس *Lactococcus* هستند که دارای اهمیت کلینیکی در انسان و حیوانات می باشند (Vendrell *et al*., 2006). *L. lactis* subsp. *cremoris* نیز از فیل ماهیان (Askarian *et al*., 2009) و ماهیان آزاد (Balcazar *et al*., 2007a) مورد جداسازی قرار گرفت. با توجه به سوابق بیماریزایی برخی از باکتریهای اسید لاکتیک در ماهیان (Ringø & Gatesoupe, 1998) ضروری است تا انتخاب و بکارگیری باکتریهای اسید لاکتیک جهت مطالعات تکمیلی در ماهیان با دقت بیشتری معمول گردد. بکارگیری هر یک از باکتریهای اسید لاکتیک جداسازی شده به عنوان پروبیوتیک در آینده به مطالعات تکمیلی In vitro و In vivo نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به جهت تصویب و اعطای گرنت با کد طرح ۹۲۰۱۰۵۳۴ و همچنین از مساعدت و همکاریهای

www.SID.ir

Archive of SID

مدیریت و همکاران موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر و موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشورصمیمانه قدردانی و تشکر بعمل می آید.

منابع

اسماعیلی، پ.، ۱۳۸۸. جداسازی و شناسایی باکتریهای اسید لاکتیک موجود در روده تاسماهی ایرانی و بررسی اثر آنتاگونیستی بر علیه آئروموناس هیدروفیلا. پایان نامه، شیلات دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، ۹۲ صفحه.

افشار مازندران، ن. و رجب، ا.، ۱۳۸۶. پروبیوتیکها و کاربرد آن ها در تغذیه دام و طیور. ترجمه. انتشارات نوربخش. ۳۵۹ ص.

حسینی، س. ص.، محمدیان،ت.، عباسپور، ر.، علیشاهی، م. و امینی.، ۱۳۹۷. اثر ریزپوشانی با آلژینات/کیتوزان بر بقاء باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران. ۱۷۲-۱۶۱ : (۲۷)۲.

سرافراز، ژ. و اکبریان، م.ع.،۱۳۸۴. مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر. انتشارات نقش مهر. ۱۱۰ ص.

علیزاده نوذری، م. و شاپوری، م.، ۱۳۹۶. بررسی تأثیر پروبیوتیک آلفامیون بر شاخص‌های رشد، پارامترهای بیو شیمیایی خون و ترکیب لاشه فیل ماهی پرورشی(*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران. ۱۵۹-۱۵۱ : (۲۶)۴.

Askarian, F., Kousha, A. and RingØ, E., 2009. Isolation of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Journal of Applied Ichthyology., 25 (2): 91–94. DOI: org/10.1111/j.1439-0426.2009.01290.x.

Askarian, F., Matinfar, A., Kousha, A., Bahmani, M., Khorshidi, K., Shenavar, A. and RingØ, E., 2008. Diversity of Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of Reared Beluga (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*): A Comparative Study. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 3(5): 302-311. DOI: 10.3923/jfas.2008.302.311.

Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Vandrell, D., Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2007a. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 30:111–118. DOI: 10.1016/j.cimid.2006.12.001.

Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Vandrell, D., Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunology Medicine Microbiology., 51, 185–193. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00294.x.

Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J.L., 2006b. Review.The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, 114: 173–186. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.

Balcazar, J.L., Vandrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2006a. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by

www.SID.ir

Archive of SID

radiolabelling assay. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 29(5-6):335- 43. DOI: 10.1016/j.cimid.2006.09.004.

Balcazar, J.L., Vandrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. and Muzquiz, J.L., 2009. Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta)*. Journal of Microbiology Biotechnology, 17: 153-157. DOI: 10.1159/000226588.

Das, S., Ward, L.R. and Burke, C., 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. a minireview. Applied Microbiology Biotechnology, 81: 419–429. DOI: 10.1007/ s00253-008-1731-8.

Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture: Review. Aquaculture, 180: 147–165. DOI: 10.5402/2012/916845.

Ghanbari, M., Rezaei, M., Jami, M. and Nazari, R.M., 2009. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species from intestinal contents of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 10(2): 152-157. DOI: 10.22099/ijvr.2009.1668.

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. and Hoshino, T., 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture, 234: 335–346. DOI: 10.1016/j.aquaculture. 2004.01.018.

leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a

Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R. and Rosnes. J.T., 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 272: 581–588. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.045.

Lane, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Eds.). John Wiley and Sons, New York, pp115–175.

Lee, K.W., Park, J.Y., Jeong, H.R., Heo, H.J., Han, N.S. and Kim. J.H., 2012. Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces. Anaerobe, 18: 96-102. DOI: 10.1016/ j.anaerobe. 2011.12.015

Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S.J. Davies, R.T.M. Baker, J. Bøgwald, M. Castex and Ringø E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids- a Review. Aquaculture, 302: 1–18. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.007.

Ringø, E. and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160: 177-203. DOI:10.1016/S0044-8486(97)00299-8.

Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M. and Mostafavi Zadeh, S.M., 2010. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran. Iranian Journal

www.SID.ir

Archive of SID

the gut of blue swimming crab, *p. pelagicus*, an in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotics. Journal of Fisheries and Aquatic Scientific, 7(1): 1-28. DOI: 10.3923/jfas.2012.1.28.

Toranzo, A.E., Magariños, B. and Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, 246: 37– 61. DOI: 10.1016/j. aquaculture. 2005.01.002.

Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I., Gironés, O. and Múzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 29(4): 177-198. DOI: 10.1016/j.cimid.2006.06. 003.

of Veterinary Research, Shiraz University, Vol (11), No (4)33, 342-350. DOI: 10.22099/ijvr.2010.105.

Soltani, M., Nikbakht, Gh., Mousavi, H.A.E. and Ahmadzadeh, N., 2008. Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 28(5): 207-212.

Soltani, M., Pourkazemi, M., Ahmadi, M.R., Taherimirghead, A., Merrifield, D.L. and Masouleh, A.S., 2013. Genetic diversity of lactic acid bacteria in the intestine of Persian sturgeon fingerlings. Journal of Applied Ichthyology, 29(3):494-498. DOI: 10.1111/jai.12107.

Talpur, A.D., Memon, A.J., Khan, M.I., Ikhwanuddin, M., Danish Daniel, M.M. and Abol-Munafi, A.B., 2012. Isolation and screening of lactic acid bacteria from

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and molecular diagnosis of lactic acid bacteria in intestine of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii)*

Shenavar Masouleh A.[1]*, Pourkazemi M.[2]; Soltani M.[3]; Yarmohammadi M.[1]; Yazdani M.[1]; Alizadeh M.[1]; Jalilpour J.[1]; Bazari Moghaddam S.[1]; Masoumzadeh M.[1]; Hoseynifar S.H.[4]; Esmaeilii P.[5]; Baniesmaeilii Y.[5]

*shenavar1969@gmail.com

1- International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
5- Guilan Science and Technology Park, Rasht, Iran

Abstract

Caspian Sea sturgeons, are the most valuable species due to the production of meat and caviar. Sturgeon cultures as like other fish rearing, the outbreak of all kinds of infectious diseases in the farms can be expected and in this regard, isolation, identification and consumption of the local probiotics can be very important in the health promotion and growth indices. For this purpose, sampling has been done from 38 fish, in addition to culturing and counting aerobic and facultative anaerobic bacteria (AFAB) on Triptic Soy Agar, and lactic acid bacteria (LAB) were also isolated and counted on MRS Agar. In Siberian sturgeon, the average number of LAB were 2.72±0.11 (Log CFU g^{-1}) and the average of AFAB were 6.79±0.19 (Log CFU g^{-1}). Through 16SrRNA gene sequencing, LAB including *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis,* and *L. garvieae* were molecular identified in the Siberian sturgeon intestines. Complete laboratory and field studies for use of these bacteria as probiotics is required.

Keywords: probiotic, sturgeon, aquatic animals, intestine, food

* Corresponding author

www.SID.ir