Archive of SID

بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه باکتریایی *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NABRII66 جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

- **فائزه مرتضائی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **مریم رویان***: مدیریت شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
- **آریا باباخانی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **رامین صیقلانی**: مدیریت شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه باکتریایی اسیدلاکتیک *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NABRII66 علیه عوامل باکتریایی بیماریزای شایع در آبزی‌پروری و انسان توسط آزمایش‌های in vitro انجام شد. *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جداسازی شده بود. به‌منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه باکتریایی منتخب علیه عوامل بیماریزای باکتریایی تاثیرگذار بر آزادماهیان و سایر گونه‌های ماهیان شامل *L. garvieae*، *Aeromonas salmonicida* و دو عامل بیماریزای دیگر شامل *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* به‌عنوان دو منبع شایع عفونت انسانی، از دو روش آگار دولایه و میکروتیتر پلیت استفاده شد. نتایج روش آگار دولایه، فعالیت ضدمیکروبی سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 را علیه تمامی عوامل بیماریزا نشان داد و بیش‌ترین اثر معنی‌دار بازدارندگی بر مهار رشد باکتری‌های بیماریزای *A. salmonicida* و *S. aureus* مشاهده گردید ($p<0/05$). هم‌چنین، نتایج تست میکروتیتر پلیت نشان داد که سوپرناتانت فاقد سلول سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 به‌طور معنی‌داری قادر به مهار رشد باکتری *A. salmonicida* بود ($p<0/05$). این مطالعه نشان داد که سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، دارای پتانسیل ضدمیکروبی علیه چهار عامل باکتریایی بیماریزای شایع توسط تولید برخی ترکیبات برون‌سلولی بوده که باید در مطالعات بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آبزی‌پروری، باکتری‌های اسیدلاکتیک، عوامل بیماریزای باکتریایی، فعالیت ضدمیکروبی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.royan@abrii.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه روش‌های متعددی در زمینه مقابله با عوامل بیماری‌زای میکروبی به‌کار گرفته می‌شوند که یکی از پرکاربرد و ایمن‌ترین روش‌ها، استفاده از ترکیبات طبیعی و تولید شده از منابع طبیعی مختلف است (Cleveland و همکاران، ۲۰۰۱). این ترکیبات شامل پپتیدهای زیست‌فعال، سموم طبیعی، اسیدهای آلی و ترکیبات آنزیمی متعدد بوده که در مواردی قادر به عدم رشد عوامل مهاجم محیطی خواهند شد (Gildberg و همکاران، ۱۹۹۷؛ Vázquez و همکاران، ۲۰۰۴). یکی از منابع بالقوه دربرگیرنده این ترکیبات طبیعی، ارگانیسم‌های مفید باکتریایی هستند که تشکیل‌دهنده بخش عمده‌ای از میکروبیوم موجودات مختلف می‌باشند (Merrifield و Rodiles، ۲۰۱۵). دستگاه گوارش ماهیان یکی از حاملین این اکوسیتم‌های مفید باکتریایی است و از این نظر، هدف مورد بررسی در پژوهش‌های مختلف بوده است (Llewellyn و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ghanbari و همکاران، ۲۰۱۵). این جوامع باکتریایی مفید تشکیل‌دهنده فلور میکروبی موجودات آبزی که از دیرباز با نام پروبیوتیک شناخته می‌شوند، دارای کاربرد فراوانی در بهبود عملکردهای رشد، تغذیه و ایمنی ماهیان می‌باشند (Didinen و همکاران، ۲۰۱۸؛ Kumar و همکاران، ۲۰۱۸). *Lactococcus lactis* یکی از سویه‌های باکتریایی مفید تولیدکننده اسیدلاکتیک بوده که به‌دلیل تطبیق‌پذیری با شرایط مختلف محیطی از منابع متنوعی اعم از گیاهان، موجودات خشکی‌زی و حیوانات و لبنیات جداسازی شده است (Itoi و همکاران، ۲۰۰۹). این سویه باکتریایی مفید دارای چهار زیرگونه شامل: *L. lactis spp. lactis*، *L. lactis spp. cremoris*، *L. lactis spp. hordniae* و *L. lactis spp. tructae* بوده که از این میان، زیرگونه‌های *L. lactis spp. cremoris* و *L. lactis spp. lactis* به‌دلیل عملکرد مطلوب در جهت تولید ترکیبات بازدارنده طبیعی مانند باکتریوسین‌ها، آنزیم‌ها، سیدروفور و اسیدهای آلی مورد توجه محققین واقع شده‌اند (Rodriguez و همکاران، ۱۹۹۵؛ Moreno و همکاران، ۲۰۰۰؛ Pérez و همکاران، ۲۰۱۱). در راستای تمامی خصوصیات مفید این ارگانیسم‌های میکروبی، پی بردن به ساختار و شرایط تولید ترکیبات مترشحه توسط آن‌ها، بررسی برهم‌کنش‌های جوامع باکتریایی و اثرات متقابل این ارگانیسم‌های میکروبی بر یکدیگر، افق‌های نوینی را در جهت تولید ترکیبات درمانی طبیعی و ایمن فراهم می‌سازد (Vázquez و همکاران، ۲۰۰۴). در مطالعه پیشین، با بررسی ۱۴۸ سویه باکتریایی، ۵ سویه باکتریایی دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی متنوعی بوده و پس از توالی‌یابی ژنی به عنوان زیر گونه‌هایی از *L. lactis* شناسایی و معرفی شدند (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷). از میان سویه‌های باکتریایی دارای پتانسیل پروبیوتیکی، باکتری *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 دارای مقاومت بالا نسبت به شرایط دستگاه گوارش، مهار رشد باکتری بیماریزای *Streptococcus iniae* و حساسیت نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مهم بود. از این‌رو، مطالعه حاضر به بررسی اثرات ضدمیکروبی سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 بر چهار عامل باکتریایی بیماریزای مختلف و شایع در آبزی‌پروری (*L. garviea*e و *Aeromonas salmonicida*) و مخاطره‌آمیز در سلامت انسان (*Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*) می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

کشت اولیه سویه باکتریایی *L. lactis subsp. Cremoris* NABRII66: در مطالعه پیشین سویه باکتریایی *L. lactis subsp.cremoris* NABRII66 از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) جداسازی و برخی ویژگی‌های پروبیوتیکی آن مورد ارزیابی قرار گرفت و چکیده‌ای از این نتایج در جدول ۱ موجود است (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷). به‌منظور شناسایی ژنوتیپی این سویه از آنالیز توالی ژنی ۱۶S rRNA بهره گرفته شد و کد دسترسی آن در سایت NCBI تحت عنوان MH620382 ثبت گردید. تمامی آزمایش‌های *in vitro* در آزمایشگاه بیوتکنولوژی جانوری پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، واقع در شمال کشور انجام پذیرفت. به‌منظور کشت اولیه، ۱ درصد از سویه باکتریایی به محیط کشت MRS broth (Merck، آلمان) تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

جدول ۱: ویژگی‌های پروبیوتیکی بررسی شده در سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷)

ویژگی‌های پروبیوتیکی		نتایج گزارش شده در آزمایش‌ها
مقاومت به شرایط اسیدی	pH =۲/۵	−
	pH =۳	+
	pH =۳/۵	+
	pH =۴	+
	pH =۷/۵	+
مقاومت به عصاره صفراوی ماهی ۱۰٪		+
توانایی مهار رشد باکتری بیماریزای *S. iniae*		+
فعالیت همولیتیک		−
بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک تجاری مختلف		مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین

* علامت + نشان‌دهنده رشد و اثرگذاری سویه باکتریایی منتخب در هر آزمایش است.

www.SID.ir

Archive of SID

کشت باکتری‌های بیماری‌زا: عوامل باکتریایی بیماری‌زای مورد بررسی در این آزمایش شامل *L. garvieae* و *A. salmonicida* از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، *E. coli* ATCC-25922 و *S. aureus* ATCC-25923 از آزمایشگاه پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری تهیه شدند. باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* در محیط کشت TSB (QUELAB، کانادا) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه شیکردار و هم‌چنین باکتری *L. garvieae* و *A. salmonicida* در محیط کشت TSB تحت دمای ۲۵ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب) در شرایط بی‌هوازی (۵ درصد دی‌اکسیدکربن) به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

بررسی مهار رشد عوامل بیماریزا توسط روش آگار دو لایه: این بررسی براساس روش Schillinger و Lücke(۱۹۸۹)انجام پذیرفت. به‌طور خلاصه، ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت شده سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 به مرکز پلیت حاوی MRS agar (Merck، آلمان) تلقیح و به‌مدت ۱۸ ساعت (کشت یک شبه) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس، از باکتری‌های بیماریزای کشت شده سوسپانسیونی با غلظت نیم مک‌فارلند تهیه و به محیط کشت آگار نرم ((Merck، آلمان) TSB+ Agar) دارای دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تلقیح شدند. محیط کشت آگار نرم حاوی باکتری‌های بیماریزا به پلیت‌های حاوی سویه باکتریایی منتخب انتقال و هر پلیت در شرایط اختصاصی رشد باکتریایی بیماری‌زا گرمخانه‌گذاری شدند. تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار و ارزیابی نهایی توسط اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی‌متر انجام گرفت.

تهیه سوپرناتانت فاقد سلول سویه باکتریایی: پس از کشت یک شبه باکتری، تیوب‌های حاوی سوسپانسیون تحت شرایط ۵۰۰۰ دور در دقیقه و طی مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، فاز شناور یا سوپرناتانت فاقد سلول باکتریایی جداسازی‌شده و به تیوب استریل انتقال یافت. پس از اندازه‌گیری pH، به دو بخش تقسیم شد که نیمی از آن، در راستای جلوگیری از اثرات بازدارندگی اسیدهای آلی تولیدشده توسط سویه باکتریایی منتخب، توسط NaOH یک نرمال خنثی‌سازی (pH =۶/۵) و در نهایت، از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرومتر گذرانده و استریل شد (Amin و همکاران، ۲۰۱۷).

بررسی مهار رشد عوامل بیماری‌زا توسط روش میکروتیتر پلیت: این آزمایش براساس روش Ringø (۲۰۰۸) انجام شد. بر این اساس، ۵۰میکرولیتر از سوپرناتانت فاقد سلول استریل سویه باکتریایی منتخب را به‌همراه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های بیماریزا به محیط کشت اختصاصی هر باکتری (TSB) به‌داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی در سه تکرار تلقیح گردید. تمامی موارد مذکور برای سوپرناتانت فاقد سلول خنثی شده نیز اعمال شد. خوانش پلیت در OD_{630} در لحظات صفر و ۲۴ ساعت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (BioTek ELX808، آمریکا) انجام و نتایج براساس عملکرد بازدارندگی ارزیابی شد. براساس فرمول ارائه‌شده‌زیر(فرمول ۱)، مقادیر عملکرد بازدارندگی کم‌تر از یک به معنی مهار رشد عامل بیماریزا، مقادیر عملکرد بازدارندگی بیش‌تر از یک به معنی رشد عامل بیماریزا و عملکرد بازدارندگی برابر با یک، به معنی عدم مهار عامل بیماریزا توسط سوپرناتانت باکتریایی می‌باشد(Mukherjee و همکاران، ۲۰۱۷).

فرمول ۱: عملکرد بازدارندگی=OD ثبت‌شده سوپرناتانت باکتریایی یا سوپرناتانت خنثی شده باکتریایی (طی لحظات صفر تا ۲۴ساعت)/ OD ثبت شده سوسپانسیون باکتریایی عوامل بیماریزا (طی لحظات صفر تا ۲۴ساعت)

آنالیز آماری: مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از تست دانکن و روش آماری One way ANOVA، در سطح معنی‌داری ۵ درصد از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

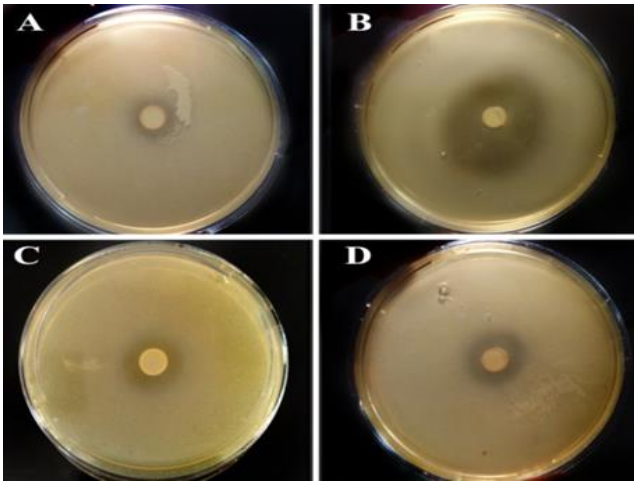
نتایج

فعالیت ضدمیکروبی سویه باکتریایی منتخب براساس تست آگار دولایه: نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 علیه چهار باکتری بیماریزا براساس روش آگار دولایه در شکل ۱ و ۲ گردآوری شده است. بر این‌اساس، سویه باکتریایی منتخب به‌طور معنی‌داری از رشد تمامی عوامل بیماریزای مورد مطالعه جلوگیری کرده و براساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، بیش‌ترین اثر بازدارندگی به‌ترتیب بر رشد عامل باکتریایی بیماریزای *A. salmonicida* و *S. aureus*($p<۰/۰۵$) و کم‌ترین اثر را در ممانعت از رشد *L. garvieae* و *E. coli* نشان داد.

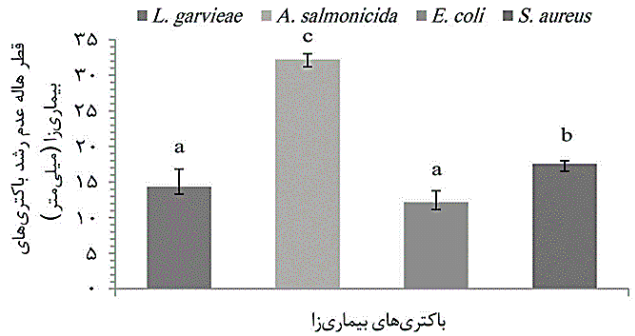
فعالیت ضدمیکروبی سویه باکتریایی منتخب براساس روش میکروتیترپلیت: براساس نتایج تست میکروتیتر پلیت، سوپرناتانت سویه باکتری *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 توانست از رشد تمامی باکتری‌ها به‌جز *L. garvieae* و *E. coli* به‌طور معنی‌داری جلوگیری کند ($p< ۰/۰۵$). نتایج این تست در جدول ۲ گردآوری شده است. pH سوپرناتانت باکتری پیش از خنثی شدن، برابر با ۴/۶۹ بود که نشان‌دهنده کاهش میزان pH نسبت به حالت نرمال و اولیه محیط کشت MRS broth (۶/۵)بود. از طرفی، عملکرد بازدارندگی سوپرناتانت خنثی در مهار رشد عوامل بیماریزا بیانگر کاهش معنی‌دار رشد عامل بیماریزای *A. salmonicida* در مواجهه با آن بود ($p< ۰/۰۵$) و اثر معنی‌داری در کاهش رشد سایر عوامل بیماری‌زا نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: هاله عدم رشد عوامل باکتریایی بیماری‌زا، ایجاد شده توسط سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 در تست آگار دولایه. بر اساس تصویر بالا عوامل بیماریزای مورد آزمایش در هر پلیت عبارتند از: A: *L. garvieae* ،B: *A. salmonicida* ،C: *E. coli* ،D: *S. aureus*



شکل ۲: نتایج مهار رشد چهار عامل بیماریزا توسط سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 در تست آگار دولایه. حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین هاله عدم رشد باکتریایی بر حسب میلی‌متر می‌باشد. داده ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان شدند.

جدول۲: نتایج مهار رشد عوامل بیماریزا توسط سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 براساس تست میکروتیتر پلیت

عوامل بیماریزا	عملکرد بازدارندگی سوپرناتانت باکتریایی علیه عوامل بیماریزا	عملکرد بازدارندگی سوپرناتانت باکتریایی خنثی شده علیه عوامل بیماریزا
L. garvieae	۱/۱۲۳ ± ۰/۰۰۲^{cD*}	۱/۳۷۲ ± ۰/۰۳۷^{cF}
A. salmonicida	۰/۰۴۲ ± ۰/۰۰۱^{aA}	۰/۷۸۰ ± ۰/۰۲۳^{aC}
E. coli	۱/۱۹۵ ± ۰/۰۰۴^{dE}	۱/۳۶۶ ± ۰/۰۳۲^{cF}
S. aureus	۰/۶۷۵ ± ۰/۰۳۶^{bB}	۱/۱۱۴ ± ۰/۰۴۹^{bD}

حروف کوچک لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بازدارندگی رشد هر عامل بیماریزا در دو تیمار سوپرناتانت باکتریایی به‌شکل مجزا بوده و حروف بزرگ لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار عملکرد بازدارندگی رشد سوپرناتانت اولیه و خنثی شده در مقایسه با یکدیگر می‌باشد ($p<۰/۰۵$). داده‌ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان شدند.

بحث

فلور میکروبی موجودات توان بالقوه‌ای در ارتقای فعالیت‌های متابولیسمی و حیاتی دارد. امروزه در بسیاری از مطالعات، وجود ویژگی‌های منحصر به‌فرد در جوامع میکروبی و اثرات متقابل آن‌ها بر ارتقای رشد و ایمنی موجودات آبزی و خشکی‌زی به‌اثبات رسیده است (Rengpipat و همکاران، ۲۰۰۸؛ Merrifield و همکاران، ۲۰۱۱). پروبیوتیک‌ها یا جوامع میکروبی مفید موجود در دستگاه گوارش می‌توانند بر مهار رشد عوامل مهاجم محیطی اثر بگذارند و به‌عبارت دیگر، در صورت تایید عملکردشان به‌عنوان جایگزینی برای درمان‌های شیمیایی تلقی گردند (Gonçalves و Gallardo-Escárate، ۲۰۱۷؛ Rossland و همکاران، ۲۰۰۵). ویژگی بازدارندگی رشد یا آنتاگونیسم باکتریایی توسط مکانیسم‌های مختلف ازجمله حذف رقابتی در اثر مصرف مواد مغذی، تولید متابولیت‌های ثانویه و تجمع‌پذیری سلول‌های باکتریایی انجام می‌پذیرد (Frick و همکاران، ۲۰۰۷؛ Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸؛ Pérez-Sánchez و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از جمعیت‌های بومی میکروبی اثرات به‌مراتب بیش‌تری بر مهار رشد عوامل مهاجم یا بیماریزای موجودات داشته و این امر به‌دلیل جایگاه‌های چسبندگی اختصاصی در غشا و در پی آن استفاده حداکثر از منابع مغذی موجود در دستگاه گوارش است (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱).در مطالعه اخیر مشاهده شد که کلنی‌های باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 قادر به مهار رشد عوامل شایع بیماریزا در روش آگار دولایه بودند. Balcázar و همکاران (۲۰۰۸) پس از بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان علیه عوامل باکتریایی بیماریزا دریافتند که تمامی سویه‌های اسیدلاکتیک شامل سویه‌هایی از *L. lactis subsp. cremoris* قادر به مهار رشد باکتری‌هایی از قبیل *A. salmonicida*، *L. garvieae* بودند که نتایج مطالعه اخیر را تایید می‌کند. هم‌چنین، هیچ‌کدام از سویه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک علیه باکتری‌های *Flavobacterium psychrophilum* و *Renibacterium salmoninarum* فعالیت ضدمیکروبی نشان ندادند. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان‌دهنده فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های مختلف *L. lactis subsp. cremoris* جداسازی شده از منابع مختلف علیه عوامل بیماریزای باکتریایی است. Akçelik و همکاران (۲۰۰۶)، با استفاده از روش آگار دولایه و چاهک، فعالیت ضدمیکروبی دو سویه *L. lactis subsp. lactis* را به‌منظور استخراج و تعیین ویژگی‌های باکتریوسین‌های نایسین و لاکتیسین بررسی کردند. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌ها قادر به مهار رشد انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا از قبیل *Listeria innocua*، *Enterococcus feacalis* و *Pediococcus pentosaceus* بودند و

www.SID.ir

Archive of SID

هیچ‌گونه اثری بر مهار رشد عامل *Bacillus cereus* نداشتند. Bromberg و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی ۸۰۰ جدایه باکتریایی جداسازی شده از محصولات گوشتی، مشاهده کردند که ۱۲۸ سویه باکتریایی اسیدلاکتیک قادر به مهار عوامل بیماریزای *S. aureus* CTC 033 و *L. innocua* Lin 11، *B. cereus* CTC 001 بودند که از این میان تنها یک سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* CTC 204 قادر به تولید باکتریوسین (نایسین) و مهار رشد عوامل بیماریزای مختلف بود. علاوه‌براین، این سویه قادر به مهار رشد *E. coli*، *Pseudomonas sp.* CTC 032 و *Salmonella typhimurium* ATCC 1402 نبود. نتایج مطالعات مذکور و مطالعه حاضر بیان‌گر اثر اختصاصی و وابسته به سویه در مواجهه با عوامل باکتریایی دیگر است و تفاوت در میزان مهار رشد هر عامل باکتریایی بیماریزا با دیگری را می‌توان به عواملی هم‌چون مواد مغذی در محیط و شرایطی از قبیل دمای رشد، pH و ارتباطات فیلوژنی مرتبط دانست (Tejero-Sariñenaو همکاران ۲۰۱۲؛ Cosentino و همکاران، ۲۰۱۲). در این مطالعه، به‌منظور درک بیش‌تر از نوع مکانیسم عمل سویه باکتریایی منتخب در مواجهه با عوامل بیماریزای موردنظر، اثرات ضدمیکروبی سوپرناتانت تهیه شده باکتریایی و مقایسه آن با حالت خنثی (pH= ۶/۵) در روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که کاهش pH در اثر تخمیر قندی و در نهایت تولید اسیدهای‌آلی، نقش عمده‌ای در مهار رشد عامل بیماریزای *S. aureus* داشت. این درحالی است که اثر معنی‌داری بر بازدارندگی رشد *L. garvieae* و *E. coli* نداشت. هم‌چنین، سوپرناتانت باکتریایی و سوپرناتانت خنثی شده سویه باکتریایی *L. lactis subsp.* NABRII66 *cremoris* به‌طور معنی‌داری سبب مهار رشد عامل باکتریایی *A. salmonicida* شد.این مسئله، احتمالاً به‌وجود مکانیسم‌های دیگری نظیر تولید پپتیدهای ضدمیکروبی زیست فعال علاوه بر تولید اسید آلی و اثر بالقوه آن در مهار رشد این عامل شایع بیماریزا اشاره دارد. ترکیباتی از قبیل پپتیدهای ضدمیکروبی زیست فعال، امروزه مورد توجه بسیاری از محققین این امر قرار گرفته‌اند و بخشی از ترکیبات برون‌سلولی تولید شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک را تشکیل می‌دهند (Abee و همکاران، ۱۹۹۵؛ Choi و همکاران، ۲۰۰۰). اثبات حضور این ترکیبات پپتیدی و سایر متابولیت‌های ثانویه در سویه باکتریایی منتخب در این مطالعه، نیازمند مطالعات بیش‌تری می‌باشد. عفونت ناشی‌از جنس *A. salmonicida* به‌عنوان عامل تیپیک بیماری فورونکولوز، سبب بروز بیماری قرحه در کپورماهیان می‌شود و با افزایش استرس در ماهیان در ارتباط است (Austin و Austin، ۲۰۱۶). در این مطالعه، سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 توانست به عنوان یک بازدارنده طبیعی، از رشد *A. salmonicida* جلوگیری کند. مطالعات دیگری مانند Zhou و همکاران (۲۰۱۰)، Balcázar و همکاران (۲۰۰۶) نتایجی مشابه با مطالعه حاضر را ارائه دادند. با این‌حال، تایید اثرات ضدمیکروبی این‌سویه در شرایط *in vivo* در مواجهه با عوامل بیماری‌زا نیازمند مطالعات بیش‌تری است. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه باکتریایی اسیدلاکتیک NABRII66 *Lactococcus lactis subsp. cremoris* دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه عوامل بیماریزای مورد هدف در این مطالعه بود. چگونگی فعالیت ضدمیکروبی، تایید وجود ترکیبات برون‌سلولی باکتریایی و شناسایی آن‌ها نیازمند مطالعات تکمیلی در آینده می‌باشند.

تشکر و قدردانی

کلیه فعالیت‌های علمی این تحقیق تحت حمایت مالی و پژوهشی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، واقع در شمال کشور و تحت عنوان پروژه مصوب با شناسه ۱۲۰۵۰۵۹۴۵۵۹۴۰۰۱ انجام گردید. از این‌رو، از تمامی کارشناسان و متخصصین در بخش بیوتکنولوژی جانوری به پاس مساعدت و راهنمایی‌های ارزنده سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. **مرتضائی، ف.؛ رویان، م.؛ علاف نویریان، ح. و باباخانی، آ.، ۱۳۹۷.** بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) علیه باکتری *Streptococcus iniae*. مجله علوم آبزی‌پروری، دوره ۶، شماره ۳، صفحات ۴۳ تا ۵۴.

۲. **Abee, T.; Krockel, L. and Hill, C., 1995.** Bacteriocins: Mode of action and potentials in 266 food preservation and control of food poisoning. International Journal of Food Microbiology. Vol. 28, pp: 169-185.

۳. **Akçelik, O.; Tükel, Ç.; Özcengiz, G. and Akçelik, M., 2006.** Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolates. Molecular Nutrition and Food Research. Vol. 50, No. 3, pp: 306-313.

۴. **Amin, M.; Adams, M.; Bolch, C.J. and Burke, C.M., 2017.** In vitro screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. Aquaculture International. Vol. 25, No. 1, pp: 485-498.

۵. **Austin, B. and Austin, D.A., 2016.** Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, 6th edn. Springer, Dordrecht. 552 p.

۶. **Balcázar, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D.; Dolores Evora, M. and Luis Múzquiz, J., 2006.** Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microbial Ecology in Health and Disease. Vol. 18, No. 1, pp: 61-63.

۷. **Balcázar, J. L.; Vendrell, D.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. and Múzquiz, J. L., 2007.** In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish

www.SID.ir

Archive of SID

intestinal histology and growth performance. Cell and Tissue Research. Vol. 344, pp: 135-146.

۲۲. **Merrifield, D.L. and Rodiles, A., 2015.** The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In Mucosal health in aquaculture. Academic, Oxford, UK. pp: 273-295.

۲۳. **Moreno, I.; Lerayer, A.L.; Baldini, V.L. and Leitão, M.F.D.F., 2000.** Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 31, No. 3, pp: 183-191.

۲۴. **Mukherjee, A.; Dutta, D.; Banerjee, S.; Ringø, E.; Breines, E.M.; Hareide, E.; Chandra, G. and Ghosh, K., 2017.** Culturable autochthonous gut bacteria in rohu, *Labeo rohita*. In vitro growth inhibition against pathogenic *Aeromonas* spp., stability in gut, bio-safety and identification by 16S rRNA gene sequencing. Symbiosis, Vol. 73, No. 3, pp: 165-177.

۲۵. **Nikoskelainen, S.; Salminen, S.; Bylund, G. and Ouwehand, A.C., 2001.** Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, No. 6, pp: 2430-2435.

۲۶. **Pérez, T.; Balcázar, J.L.; Peix, A.; Valverde, A.; Velázquez, E.; de Blas, I. and Ruiz-Zarzuela, I., 2011.** *Lactococcus lactis* spp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 61, pp: 1894-1898.

۲۷. **Pérez-Sánchez, T.; Ruiz-Zarzuela, I.; de Blas, I. and Balcázar, J.L., 2014.** Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture. Vol. 6, pp: 133-146.

۲۸. **Rengpipat, S.; Rueangruklikhit, T. and Piyatiratitivorakul, S., 2008.** Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. Aquaculture Research. Vol. 39, pp: 134-143.

۲۹. **Ringø, E., 2008.** The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. Aquaculture Resea. Vol. 39, pp: 171-180.

۳۰. **Rodriguez, J.M.; Cintas, L.M.; Casaus, P.; Horn, N.; Dodd, H.M.; Hernandez, P.E. and Gasson, M.J., 1995.** Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology. Vol. 78, pp: 109-115.

۳۱. **Rossland, E.; Langsrud, T.; Granum, P.E. and Sorhaug, T., 2005.** Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. International Journal of Food Microbiology. Vol. 98, pp: 193-200.

۳۲. **Schillinger, U., 1990.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. In Biotechnology and Food Safety. Edited by DD Bills and SD Kung. Butterworth-Heinemann, Boston, USA. pp: 55-74.

۳۳. **Tejero-Sariñena, S.; Barlow, J.; Costabile, A.; Gibson, G.R. and Rowland, I., 2012.** In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. Vol. 18, No. 5, pp: 530-538.

۳۴. **Vázquez, J.A.; González, M.P. and Murado, M.A., 2004.** Pediocin production by *Pediococcus acidilactici* in solid state culture on a waste medium: Process simulation and experimental results. Biotechnology & Bioengineering. Vol. 85, No. 6, pp: 676-682.

۳۵. **Zhou, X.; Wang, Y.; Yao, J. and Li, W., 2010.** Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia. International Journal of Engineering, Science and Technology. Vol. 2, No. 7, pp: 73-80.

pathogens. Veterinary Microbiology. Vol. 122, No. 3, pp: 373-380.

۸. **Balcázar, 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. Vol. 278, No. 4, pp: 188-191.

۹. **Bromberg, R.; Moreno, I.; Delboni, R.R.; Cintra, H.C. and Oliveira, P.V., 2005.** Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 21, No. 3, pp: 351-358.

۱۰. **Choi, H.J.; Cheigh, C.I.; Kim, S.B. and Pyun, Y.R., 2000.** Production of a nisin-like 282 bacteriocin by *Lactococcus lactis subsp. lactis* A isolated from kimchi. Journal of Applied Microbiology. Vol. 88, pp: 563-571.

۱۱. **Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001.** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. Vol. 71, No. 1, pp: 1-20.

۱۲. **Cosentino, S.; Fadda, M.E.; Deplano, M.; Melis, R.; Pomata, R. and Pisano, M.B., 2012.** Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. J of Biomedicine and Biotechnology. Vol. 10, pp: 1155-1163

۱۳. **Didinen, B.I.; Onuk, E.E.; Metin, S. and Cayli, O., 2018.** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. Aquaculture Nutrition. Vol. 24, No. 1, pp: 400-407.

۱۴. **Frick, J.S.; Schenk, K.; Quitadamo, M.; Kahl, F.; Köberle, M.; Bohn, E.; Aepfelbacher, M. and Autenrieth, I.B., 2007.** *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. Inflammatory Bowel Diseases. Vol. 13, No. 1, pp: 83-90.

۱۵. **Ghanbari, M.; Kneifel, W. and Domig, K.J., 2015.** A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. Aquaculture. Vol. 448, pp: 464-475.

۱۶. **Gildberg, A.; Mikkelsen, H.; Sandaker. E. and Ringø, E., 1997.** Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia. Vol. 352, pp: 279-285.

۱۷. **Gonçalves, A.T. and Gallardo-Escárate, C., 2017.** Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout. Journal of Applied Microbiology. Vol. 122, No. 5, pp: 1333-1347.

۱۸. **Itoi, S.; Yuasa, K.; Washio, S.; Abe, T.; Ikuno, E. and Sugita, H., 2009.** Phenotypic variation in *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. Journal of Applied Microbiology. Vol. 107, No. 3, pp: 867-874.

۱۹. **Kumar, P.; Jain, K.K.; Sardar, P.; Jayant, M. and Tok, N.C., 2018.** Effect of dietary synbiotic on growth performance, body composition, digestive enzyme activity and gut microbiota in *Cirrhinus mrigala* finger lings. Aquaculture Nutrition. Vol, 24. No. 3, pp: 921-929.

۲۰. **Llewellyn, M.S.; Boutin, S.; Hoseinifar, S.H. and Derome, N., 2014.** Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. Frontiers in Microbiology. Vol. 5, 207 p.

۲۱. **Merrifield, D.L.; Harper, G.; Mustafa, S.; Carnevali, O.; Picchietti, S. and Davies, S.J., 2011**. Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia intestinal microbial balance,

www.SID.ir