Archive of SID

امکان سنجی استفاده از باکتری به عنوان پروبیوتیک در تغذیه ماهیان

عابدی، س. ز.*[۱،۲]؛ یگانه، س.[۱]؛ مرادیان کوچکسرایی، ف.[۲]؛ اورجی، ح.[۱]

[۱] گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۲] گروه زیست سلولی مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
Email: abedi10629@yahoo.com

پروبیوتیک‌ها درآبزی‌پروری اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند که از جمله آن افزایش تولید، اصلاح کیفیت آب، مبارز بیولوژیک با میکروارگانیسم‌های آبزی می‌باشد. امروزه انواع مختلفی از میکروآلگ‌ها، مخمرها، باکتری‌های گرم‌مثبت، باکتری‌های گرم‌منفی، قارچ‌ها به عنوان پروبیوتیک بررسی شده‌اند. اما در میان منابع پروبیوتیکی باکتری‌ها بعنوان بهترین کاندید مطرح می‌باشد و می‌توان ترکیبات مفیدی چون آنزیم را از آنها استخراج نمود. مقاله حاضر به مطالعه و معرفی روش‌های امکان سنجی استفاده از باکتری به عنوان پروبیوتیک از جمله بررسی تحمل باکتری به استرس اکسیژن، اسید، صفرا و مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت باکتری به هضم توسط سوپرناتانت دستگاه گوارش، عدم بیماریزایی برای ماهی، تست بقاء پروبیوتیک می‌پردازد.

کلمات کلیدی: امکان سنجی، باکتری، پروبیوتیک، تغذیه، آبزیان.

مقدمه:

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با استقرار در محیط روده، مانع فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و پاتوژن می‌شوند. امروزه انواع مختلفی از میکروآلگ‌ها (تتراسلمیس)، مخمرها (دباریومایسس، فافیا و ساکارومایسس)، باکتری‌های گرم-مثبت (باسیلوس، لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس) و باکتری‌های گرم‌منفی (آئروموناس، سودوموناس و ویبریو)، قارچ‌ها (آسپرژیلوس فیکوم و آسپرژیلوس نایجر) به عنوان پروبیوتیک بررسی شده‌اند (۱۱). در حال حاضر محصولات پروبیوتیکی به اشکال پودر، قرص، کپسول، سوسپانسیون و اسپری به فروش می‌رسند(۶).

در زمینه آبزی‌پروری پروبیوتیک‌ها را می‌توان به دو صورت استفاده کرد (۱۱).

- معرفی سویه انتخابی به دستگاه گوارش از طریق غذای زنده و یا از طریق غذای غیر زنده (پلت خشک)
- افزودن باکتری‌های خاص به آب محیط پرورشی

تأثیرات مفید پروبیوتیک‌ها به اختصار شامل فراهم نمودن شرایط مناسب دستگاه گوارش در افزایش جذب و هضم مواد غذایی و بهینه‌سازی میزان غذادهی، بالابردن قابلیت‌های سیستم ایمنی ماهی در مواجهه با بیماری‌های عفونی و حذف مواد سرطان‌زا، کاهش کلسترول، تعدیل pH دستگاه گوارش در جهت رشد و تکثیر گونه‌های مفید همچون باکتری‌ها)لاکتوباسیلوس‌ها) و ابتلای کمتر به بیماری‌ها، کاهش اثرات آلرژی‌زا، سنتز و افزایش دسترسی مواد غذایی، افزایش رشد، بقا و غیره می‌باشد(۱۸).پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با استقرار در محیط روده، مانع فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و پاتوژن می‌شوند (۱۴). باکتری‌های اسیدلاکتیک، مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده، که شامل باکتری‌های متنوعی مثل لاکتوباسیل است. لاکتوباسیل‌ها، باسیل‌های گرم‌مثبت، بدون حرکت، غیراسپورزا، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی هستند، که قندهای مختلف را به لاکتات و استات تبدیل می‌کنند(۷). لاکتوباسیل‌های با مقاومت بالا به اسید و صفرا و دارا بودن خواص ضدمیکروبی قوی، می‌توانند گزینه‌ی مناسبی برای تهیه‌ی مکمل‌های پروبیوتیکی باشند. در این زمینه مطالعات جامعی توسط

www.SID.ir

Archive of SID

تعدادی نویسندگان (۱ و ۳ و ۹ و ۲۰)صورت گرفت. بنابراین با توجه به اهمیت موضوع مطالعه حاضر با هدف معرفی و توضیح روش‌های انتخاب سویه های باکتریایی به عنوان پروبیوتیک صورت پذیرفته است.

مواد و روش ها:

امکان‌سنجی سویه جدا شده به عنوان پروبیوتیک با استفاده از بررسی رشد میکروارگانیسم در دامنه گسترده‌ای از دما (۱۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد)، صفرا، تحمل شرایط اسیدی صورت می‌گیرد(۸).

۱- کشت باکتری در حضور اکسیژن (هوازی) برای بررسی استرس اکسیژن:

به منظور بررسی مقاومت باکتری نسبت به اکسیژن محیط، در شرایط هوازی باکتری‌ها کشت داده خواهند(۱۲).

۲- تحمل باکتری به محیط اسیدی:

انتخاب باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های متحمل به اسید با استفاده از روش تغییر یافته (۱۹) به منظور شبیه‌سازی به شرایط دستگاه گوارش انجام می‌شود. سویه‌های باکتری جداشده در محیط مایع *MRS* طی ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده می‌شوند. سپس۱ میلی‌لیتر از باکتری کشت‌شده را به۱۰۰ میلی‌لیتر محیط *MRS* جدید که *pH* آن با استفاده از *HCl* و یا سود ۱ نرمال به ۲، ۳ یا ۷ تنظیم شده است تلقیح می‌گردد. رشد باکتری‌ها با تعیین جذب نوری در۶۲۰ نانومتر پس از ۶ و ۲۴ ساعت دوره انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد کنترل می‌گردد.

تفاوت بین جذب نوری (*OD*) در *pH*=۷ و *pH* برابر ۲ یا ۳ شاخصی از نمونه‌های باقیمانده در چهار سطح اختیاری از تحمل شرایط اسیدی است که: اگر سویه‌های جدا شده در*pH*=۲ بعد از ۲۴ ساعت زنده بمانند، عالی؛ اگر سویه‌های جدا شده در *pH*=۲ بعد از ۶ ساعت زنده بمانند نه بعد از ۲۴ ساعت، خیلی خوب؛ اگر سویه‌های جدا شده در*pH*=۳ پس از ۲۴ ساعت زنده بمانند نه در *pH*=۲، خوب و اگر سویه‌های جدا شده در هیچ یک از شرایط آزمایشگاهی زنده نمانند، بد است.

سویه جدا شده چنانچه درصد بقای بیشتر یا مساوی ۵۰ درصد را نشان دهد، زنده می‌ماند. *pH* مساوی ۳ بیانگر مقدار *pH* معده می‌باشد. سویه‌های جدا شده در محیط کشت آگار *MRS* برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده می‌شوند. تفاوت درصد بین نوسانات جدب نوری در*pH*=۷ و نوسانات جذب نوری در *pH* برابر ۲ یا ۳ شاخص زنده‌مانی سویه‌های جدا شده را نشان می‌دهند.

$$\text{زنده مانی یا بقا } (\%) = \frac{\text{جذب نوری در pH = 2 یا 3} - \text{جذب نوری در pH = 7}}{\text{جذب نوری در pH = 7}} . 100$$

کلنی‌های جدا شده، در بافر سیترات ۰/۱ مولار با *pH*=۳ به صورت سوسپانسیون در آمده و میزان کدورت سوسپانسیون سلولی پس از رقت‌سازی و شمارش پلیت با تست استاندارد *4 Mc Farland (12X 108cfu/ml)* مقایسه می‌گردد(۲۱). به این ترتیب تعداد کلنی‌ها (واحد تشکیل کلنی *CFU*) در محیط کشت مشخص می‌گردد.

در زمان ۰ و ۵ ساعت انکوباسیون، هر سویه در *MRS* آگار در دماهای متفاوت به صورت بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت کشت داده و میزان رشد آن بررسی می‌گردد، سپس دامنه فعالیت و تحمل باکتری به دما مشخص می‌شوند. نتایج بیانگر درصد (*log10cfu*) سلول‌های مقاوم می‌باشد.

۳- تحمل باکتری به صفرا:

برای سنجش تحمل جدایه‌های لاکتوباسیلی به دست آمده نسبت به صفرا از روش(۱۷، ۱۶) استفاده می‌شود. به طور خلاصه صفرا از ماهی قزل آلای رنگین کمان تهیه گردیده و سوسپانسیون باکتری به مدت ۱ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف صفرا

www.SID.ir

Archive of SID

(صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ درصد) در سه تکرار قرار داده شده و تعداد باکتری پس از زمان فوق، با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد صفرا) مقایسه می‌گردد

۴- مقاومت به آنتی بیوتیک:

باکتری‌های مقاوم به شرایط اسید و صفرا در معرض آنتی بیوتیک هایی چون پنی سیلین G (۱۰۰ واحد)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، دگزاسایکلین (۲۵ میکروگرم)، کوتریماکسازول (۲۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) قرار می‌گیرند. انتخاب سویه‌ها بر اساس تحملشان به اسید و صفرا صورت می‌گیرد. قطر ناحیه در معرض قرار گرفته، اندازه گرفته می‌شود و نتایج برحسب مقاوم، نیمه‌حساس و حساس بیان می‌شود (۱۵،۲۳،۲۰).

۵- بررسی مقاومت باکتری به هضم توسط سوپرناتانت دستگاه گوارش:

پس از بررسی فعالیت و پایداری باکتری به دماهای متفاوت، پایداری به سوپرناتانت تهیه شده از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش سنجیده می‌شود تا بتواند در دستگاه گوارش نقش خود را ایفا کند(۵).

۶- عدم بیماریزایی برای ماهی:

اثرات مضر احتمالی باکتری‌های جدا شده، بر اساس روش *Austin* و *Brunt* (۲) اندازه‌گیری می‌شود. برای این کار پس از کشت و شستشوی باکتری‌های پروبیوتیک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی ۳×۱۰^{۸} *CFU/m* به صورت عضلانی و داخل صفاقی در گروه‌های مجزا (در هر گروه تعداد ۱۰ قطعه) به ماهی مورد نظر تزریق می‌گردد. به ماهیان گروه کنترل فقط سرم فیزیولوژی تزریق می‌شود. از ماهیان تلف شده احتمالی، بیحال و زنده پس از گذشت هفت روز بررسی‌های باکتری‌شناسی به عمل می‌آید.

شکل ۱. روش‌های تزریق عضلانی و داخل صفاقی.

۷- تست بقاء پروبیوتیک:

کشت میکروب‌های جدا شده از محتویات روده پس از تیمار مطابق با روش زیر در محیط کشت اختصاصی آنزیم صورت گیرد. روده‌ی ماهی در شرایط استریل، در کنار شعله، خارج و در جهت طولی برش داده می‌شود. محتویات روده دور ریخته شد و داخل روده با سرم فیزیولوژی شستشو می‌گردد(۱۳) مقدار ۱ گرم از بافت هموژن شده‌ی روده به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه می‌شود تا سوسپانسیون ۱:۱۰ آن به دست آید. به همین ترتیب رقت‌های بر مبنای ده از نمونه‌ی اولیه تهیه می‌گردد (۴

www.SID.ir

Archive of SID

و۱۳). بعد از مشخص شدن بهترین رقت، نمونه در محیط *MRS* آگار، کشت سفره‌ای داده می‌شود. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شده و سپس از کلنی‌های مشکوک ساب کالچر تهیه شده و مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) انجام خواهدگرفت.

۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون را روی محیط کشت اختصاصی آنزیم که شامل: ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز،۱ گرم بر لیتر سولفات‌آمونیوم، ۱۰ گرم بر لیتر اوره، ۳ گرم بر لیتر سیتریک اسید، ۲ گرم بر لیتر سیترات سدیم، ۱ گرم بر لیتر درصد سولفات‌منیزیم ۷ آبه، ۰/۰۱ گرم بر لیتر سولفات آهن، ۲۰ گرم بر لیتر آگار با *pH* ۷ به صورت خطی کشت داده می‌شود. سپس در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود (۱۰).

تعداد کلنی‌ها از طریق شمارش تعداد کلنی‌های تشکیل شده بر روی هر پلیت در محیط کشت با رقیق‌سازی معکوس مشخص می‌گردد. داده‌ها به صورت *log* نمایش داده می‌شود. کلنی‌های ظاهر شده روی محیط کشت اختصاصی آنزیم به منظور دستیابی به تک‌کلنی به صورت خطی جداگانه کشت داده می‌شوند و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد، تا انجام مطالعات بعدی نگهداری می‌شوند.

نتیجه گیری کلی:

از این مقاله چنین استنتاج می‌گردد که چنانچه سویه ای از باکتری توانایی تولید فاکتور مورد نظر از جمله آنزیم را داشته باشد، مرحله بعد باید به شناسایی سوش پرداخت. سپس برای اینکه بعنوان پروبیوتیک مطرح گردد باید مقاومت باکتری را به شرایط اسیدی دستگاه گوارش، نمک های صفراوی، مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت باکتری به هضم توسط سوپرناتانت دستگاه گوارش، عدم بیماریزایی برای ماهی را سنجید. سپس پس از استفاده از پروبیوتیک در تغذیه ابزیان باید بعد از مدت زمان تعیین شده تست بقاء پروبیوتیک را انجام داد. بنابراین با توجه به اهمیت موضوع پایان نامه دکتری در این خصوص در حال انجام می‌باشد که به زودی نتایج مستخرج از آن منتشر خواهد شد.

منابع:

1. *Balcazar, J., Vendrell, D., 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, 278,188-191.*
2. *Brunt, J., and Austin, B., (2005). Use of a probiotic to control laclococcosis and streptococcosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 28, 693-701.*
3. *Buntin, N., Chanthachum, S., and Hongpattarakere,T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 30 (Suppl.1),141-148.*
4. *Das, K.M., and S.D.,Tripathi. (1991). Studies on the digestive enzymes of grass carp, Ctenopharyngdon idella (Val.). Aquaculture, 92, 21-32.*
5. *Elkhalil, E.A.I., MANNER, K., BORRISS, R., SIMON, O. (2007). In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. British Poultry Science, 48 (1), 64-70.*
6. *Gatesoupe, F. J. (1991). Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, Scophthalmus maximus L. In: de Pauw, N (Ed). Aquaculture -a Biotechnology in Progress. European Aquaculture Society, Bredene, pp. 721-730.*

www.SID.ir

Archive of SID

7. Gatesoupe, F.J. (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.
8. Gomez-Gil, B., Roque A. (1998). Selection of probiotic bacteria for use in aquaculture. In Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
9. 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: Quantitativeanalysis. Aquaculture, 318, 33–36.
10. Howson, S. J., Davis, R. J. (1983). Production of phytate-hydrolysing enzyme by fungi. Enzyme Microbiol. Technol, 5,377-382
11. Irianto, A., and Austine, B. (2002). Probiotics in aquaculture. Fish Disease, 25, 633-642.
12. Kandler, O., Weiss, N. (1984). Genus Lactobacillus, in: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematics Bacteriology, Williams and Wilkins,Baltimore M.D., USA. pp, 1209–1234.
13. Khan, A., and Ghosh, K. (2012). Characterization and identification of gut-associated phytase-producing bacteria in some fresh water fish cultured in pond. Acta Ichthyol. Pisc, 42, 37-45.
14. Klaenhammer, T.R. (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition 130: 415s- 416s.
15. NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standard). (2002). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twelfth Informational Supplement. M100-S12.
16. Nikoskelainen, S.; Salminen, S., Bylund, G., and Ouwehand, A.C. (2001). Characterization of the properties of human-and dairy-derived probioticsfor prevention of infectious diseasea in fish. Applied and Environment Microbiology, 67(6), 2430-2435.
17. Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by potential probiotic bacteria (Lactobacillus rhamnosus). Fish and Shellfish Immunology, 15, 443-452.
18. Parvez S1, MalikKA, A.h., Kang, S., Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol, 100(6),1171-85.
19. Pelinescu, D.R., Sasarman, E., Chifiriuc, M.C., Stoica, I., Nohita, A.M., Avram, I., Serbancea, F., Dimov, T.V. (2009). Isolation and identification of some Lactobacillus and Enterococcus strains by a polyphasic taxonomical approach. Romanian Biotechnological Letters, 14, 4225-4233.
20. Prescott, M.L., Harley, P.J., Klein, A.D. (1999). Antimicrobial chemotherapy. In Microbiology Fourth Edition. ISBN.USA , 678-695.
21. Verdenelli, M.C., Ghelfi, F., Stefania, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., Cresci, A. (2009). Probiotic properties of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei isolated from human faeces. European Journal of Nutrition.
22. Vijavabaskar, P., and Somasundaram, S.T. (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.
23. Vlkova,´ E., Rada, V., Popela´r˘ova,´ P., Trojanova´, I., Killer, J. (2006). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract ofcalves. Livestock Science, 105, 253– 259.

Feasibility of using bacteria as probiotics in fish feeding

Abedi, S. Z.[1,]; Yeganeh, S.[1]; Moradian kochaksaraii, F.[2]; Oraji, H.[1]*

www.SID.ir