

اثر آنتاگونیستیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از روده

تاس ماهی ایرانی بر *Aeromonas hydrophila*

*پریسا اسماعیلی^۱، نورامیر مظفری^۲ و علیرضا شناورماسوله^۳

^۱دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران،

^۳انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت

چکیده

امروزه با توجه به اثرات سودمند باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده از آن‌ها در پرورش آبزیان به‌طور 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 اسید لاکتیک، تولیدات متابولیکی متعددی دارند که ممکن است بر روی میکروب‌های پاتوژن در روده ماهی مؤثر باشند. اثر هفت باکتری اسید لاکتیک شامل *Enterococcus spp.*، *Pediococcus*، *Leuconostoc spp.*، *Lactobacillus plantarum*، *L. acidophilus* L. و *L. fermentum* که قبلاً از روده ۲۵ تاس ماهی ایرانی در ماه‌های تیر و مرداد جداسازی و شناسایی شده بودند، به روش Well-diffusion در محیط TSA داخل چاهک‌ها ریخته شد، بعد از ۲۴ ساعت *Aeromonas hydrophila* بر روی چاهک‌ها کشت داده شد و بعد از انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، اثر ممانعت از رشد آن‌ها بررسی شد. از میان باکتری‌های مورد بررسی بیش‌ترین اثر آنتاگونیستیکی از *Enterococcus spp.* مشاهده شد و باکتری‌های *L. acidophilus* و *L. fermentum* هیچ اثر آنتاگونیستیکی علیه *Aeromonas hydrophila* نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیسم، باکتری‌های اسید لاکتیک، تاس ماهی ایرانی، *Aeromonas hydrophila*

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی هستند که از نظر اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی برای کشورمان حایز اهمیت است. تاس ماهی ایرانی (قره‌برون) از گونه‌های بسیار باارزش ماهیان خاویاری بوده که گوشت و خاویار آن ارزش غذایی دارد (سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴). بروز بیماری‌ها در آبزیان به‌عنوان مانعی بر افزایش تولید و توسعه اقتصادی در بسیاری کشورها می‌باشد. تاکنون دیدگاه معمول در مورد استفاده از ضد عفونی‌کننده‌ها و داروهای ضد میکروبی، موفقیت محدودی در جلوگیری یا درمان بیماری‌های آبزیان

داشته است (Verschuere و همکاران، ۲۰۰۰). از آنجا که واکنش‌ها به تنهایی نمی‌توانند به‌عنوان کنترل‌کننده عمومی بیماری‌ها در آبزیان استفاده شوند، یک روش جدید، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در کنترل پاتوژن‌های بالقوه است (Mesalhy و همکاران، ۲۰۰۸). باکتری‌های اسید لاکتیک عموماً ایمن می‌باشند و ممکن است علیه باکتری‌های پاتوژن خاصیت آنتاگونیستیکی داشته باشند (Azizpour و همکاران، ۲۰۰۹؛ Cai، ۱۹۹۹). آئروموناس‌های متحرک به‌خصوص *A. hydrophila* که ماهیان آب شیرین و دیگر ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Mesalhy، ۲۰۰۸)، باعث عفونت‌های بسیاری در ماهیان شده و معمولاً با جراحات کوچک سطحی، ریزش فلس‌ها،

*مسئول مکاتبه: Parisa4602@yahoo.com

پلیت‌ها برگردانده شوند، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

جهت به‌دست آوردن گونه آئروموناس هیدروفیلای مورد نیاز، از پوست، روده و کلیه ماهیان دارای علائم بالینی نمونه‌برداری شد و با یک سواب استریل در محیط TSA کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تا ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. بعد از این مدت کلونی‌ها بررسی شدند. رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز و تست‌های بیوشیمیایی و تفریقی انجام شد و بر طبق اصول Bergeys (Brenner و همکاران، ۲۰۰۵)، گونه پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا شناسایی گردید.

آئروموناس هیدروفیلا در محیط TSB کشت داده شد و بعد از رشد، کدورت سوسپانسیون میکروبی برابر با لوله ۰/۵ مک‌فارلند با سرم فیزیولوژی به 10^6 CFU/ml رسانیده و با سواب استریل بر روی محیط‌های کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های اسیدلاکتیک کشت داده شد. سپس محیط‌ها برگردانده و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها، خارج و هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها به میلی‌متر ثبت شد (Mesalhy و همکاران، ۲۰۰۸). آزمایش برای هر گونه باکتریایی با سه تکرار انجام شد.

نتایج

هاله عدم رشد اطراف چاهک براساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در جدول ۱ قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک بر روی باکتری پاتوژن آئروموناس به روش well-diffusion مشخص گردیده است. چهار لاکتوباسیل و سه کوکسی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت که *Enterococcus spp.* بیش‌ترین هاله عدم رشد را علیه باکتری پاتوژن نشان داد. باکتری‌های *spp.* و *L. viridescens L. plantarum Leuconostoc* به‌ترتیب بعد از انتروکوکوس بزرگ‌ترین هاله عدم رشد را نشان دادند. در حالی‌که

خون‌ریزی موضعی، و سپتی سمی در ارتباط می‌باشد (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸). Balcazar سال‌های ۲۰۰۶، ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ 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 به‌عنوان 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 انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در ماه‌های تیر و مرداد انجام شد. ۲۵ تاس ماهی ایرانی با ظاهری سالم به‌طور تصادفی انتخاب شدند. ماهیان بین ۵۰ تا ۴۵۰ گرم وزن و ۲۰ تا ۵۵ سانتی‌متر طول داشتند. باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از ماهیان شامل *spp. Pediococcus spp. Enterococcus spp.*، *L. acidophilus L. plantarum Leuconostoc fermentum* و *L. viridescens* بود که به روش بیوشیمیایی شناسایی شدند (Cai و همکاران، ۱۹۹۹؛ Brenner و همکاران، ۲۰۰۵؛ قیطانچی و همکاران، ۱۳۸۷؛ Nair و Surendran، ۲۰۰۵-۲۰۰۴؛ Harrigan، ۱۹۹۸). سپس در محیط کشت MRS مایع کشت و در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند تا کشت تازه به‌دست آید. پلیت‌های حاوی محیط کشت TSA آماده شده و به‌وسیله ته یک پیپت پاستور استریل، یک چاهک به قطر ۶ میلی‌متر در آن ایجاد شد سپس با پیپت استریل یک قطره آگار ۲ درصد ته چاهک ریخته شد. وقتی آگار بسته شد، ۳۰ میکرولیتر از باکتری‌های اسیدلاکتیک (10^8 CFU/ml) در چاهک‌ها ریخته شد (از هر باکتری در سه چاهک تکرار شد) و بدون این‌که

L. acidophilus و *L. fermentum* علیه آئروموناس هیچ فعالیت آنتاگونیستی نشان ندادند.

جدول ۱- متوسط قطر هاله عدم رشد توسط باکتری‌های جدا شده پس از ۲۴ ساعت

گونه باکتری‌ها	قطر هاله عدم رشد
<i>L. plantarum</i>	۱۴ میلی‌متر
<i>L. fermentum</i>	۰ میلی‌متر
<i>L. acidophilus</i>	۰ میلی‌متر
<i>L. viridescens</i>	۱۴ میلی‌متر
<i>Enterococcus spp.</i>	۱۶ میلی‌متر
<i>Leuconostoc spp.</i>	۱۵ میلی‌متر
<i>Pediococcus spp.</i>	۱۳ میلی‌متر

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، ۲۰۰۸). باکتری‌های روده فعالیت ضد میکروبی دارند که نقش جلوگیری از بیماری‌های عفونی را بازی می‌کنند (Sugita و همکاران، ۱۹۹۸). 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، به‌عبارت دیگر امکان دست‌کاری جمعیت میکروبی روده با تغییرات در محتویات غذا امکان‌پذیر است (Askarian و همکاران، ۲۰۰۸).

آزمایش ممانعت از رشد به‌وسیله ترکیبات مختلف، به شرایط آزمایشگاهی (in-vitro, in-vivo) بستگی دارد (Gatesoupe, ۱۹۹۹). در آزمون‌های in-vitro، بیش‌تر سویه‌های پاتوژن *Aeromonas* یا *Vibrio* مورد هدف بودند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). دیگر محققان سعی کردند از دیگر پاتوژن‌ها نظیر *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* و *Enterococcus piscicida*

seriolicida استفاده کنند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). در این مطالعه از *A. hydrophila* به‌عنوان پاتوژن استفاده شد. اولین گزارش در مورد وجود باکتری‌ها در ماهیان آب شیرین با اثر ممانعتی علیه *A. hydrophila* به Ochoa و Olmos منسوب است (Ochoa و Omos, ۲۰۰۶). *Lc. lactis* و *L. plantarum* و *L. fermentum* جدا شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر *A. hydrophila* مؤثر بوده و خاصیت چسبندگی آن را به روده میزبان در شرایط in-vitro کاهش دادند (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸). *L. plantarum* مورد آزمایش در 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* و *Lactobacillus sakei* از رشد چندین سویه آئروموناس جلوگیری کردند (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۶). سه سویه باکتری اسید لاکتیک *Lactococcus Lactis* *Lactobacillus curvatus* subsp. *lactis* و *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* از رشد همه سویه‌های پاتوژن مورد آزمایش در ماهی در شرایط in-vitro جلوگیری نمودند (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۷). در بررسی حاضر هم *Enterococcus spp.*

زیست‌تی‌علیه عفونتی
در ماهی *A. hydrophila* توصیه می‌شود.

Leuconostoc spp. Pediococcus اثر ممانعتی 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 ایمنی از طریق اندازه‌گیری فاکتورهای سرولوژی و ایمونوگلوبولین جهت کنترل

تشکر و قدردانی

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

منابع

- سرافراز، ژ. و اکبریان، م.، ۱۳۸۴. مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر. انتشارات نقش مهر، صفحه ۶۴.
- قیطانچی، ا.، نوروزی، ج.، و روشندل، ن.، ۱۳۸۷. بررسی فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز جدا شده از لاکتوباسیل‌های 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 ۸۰ تا ۸۴.
- 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 azarbaijan, 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., Kriey, 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.
- Mesálhy, 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.
- Verschuere, L., Rombaut, G. and Sorgeloos, P., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4), 655-671.

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

P. Esmaily¹, 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: *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. viridence*, 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 *Enterococcus* spp. were shown to display the highest inhibitory effect against this pathogen bacteria but *L. fermentum*, *L. acidophilus* showed no antagonistic effect against *Aeromonas*.

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

* Corresponding Author; Email: Parisa4602@yahoo.com