بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) علیه باکتری *Streptococcus iniae*

فائزه مرتضائی[1]، مریم رویان*[2]، حمید علاف نویریان[1]، آریا باباخانی[1]

[1]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.

[2]منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

*نویسنده مسئول: m.royan@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۸

چکیده

در این مطالعه، پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با هدف مهار باکتری *Streptococcus iniae* توسط آزمایش‌های *in vitro* ارزیابی گردید. بدین منظور، جدایه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک گرم مثبت و کاتالاز منفی از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل مقاومت به اسید و املاح صفراوی، فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری *S. iniae* و ارزیابی‌های ایمنی زیستی شامل فعالیت همولیتیک و حساسیت نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک تجاری عمده غربال شدند. در انتها، به‌منظور شناسایی ژنوتیپی جدایه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک منتخب از آنالیز توالی ژنی 16S rRNA بهره گرفته شد. براساس نتایج، از میان ۱۴۸ جدایه باکتریایی، ۵ سویه باکتریایی اسیدلاکتیک دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مورد نظر بودند. تمامی این سویه‌ها به زیرگونه‌هایی از *Lactococcus lactis* تعلق داشته و دارای ویژگی‌هایی از قبیل مقاومت نسبت به pH=۳-۷/۵ و املاح صفراوی ماهی (۱۰ درصد) و فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری *S. iniae* بودند. همچنین ارزیابی ایمنی زیستی نشان داد که هیچ‌کدام از باکتری‌ها فعالیت بتاهمولیتیک نداشته و تمامی ۵ سویه باکتریایی منتخب، دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بودند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (تتراسایکلین و کلرامفنیکل) تنها در *L. lactis* NABRII61 مشاهده شد. این مطالعه نشان داد که ۵ باکتری اسیدلاکتیک جداسازی شده از فلور میکروبی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توانند به‌عنوان سویه‌های پروبیوتیک در آبزی‌پروری در نظر گرفته شوند. با این حال، تعیین ماهیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیازمند مطالعات بیشتری می‌باشد.

واژگان کلیدی: آزمایش‌های *in vitro*، باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های پروبیوتیک، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

مقدمه

امروزه، توسعه سیستم‌های پرورش ماهیان در دنیا و اهمیت آبزیان به‌عنوان منبعی غنی از مواد مغذی، سبب افزایش تقاضا و گرایش مصرف‌کنندگان به این صنعت مهم شده است. از این رو، سیستم‌های پرورشی گسترده به‌دلیل فراهم نکردن تعادل عرضه و تقاضا توسط روش‌های نوین و پربازده امروزی مانند سیستم‌های پرورشی متراکم و فوق متراکم جایگزین شده‌اند (North *et al*., 2006). در میان تمامی گونه‌های مهم پرورشی در دنیا، قزل‌آلای رنگین‌کمان از جمله گونه‌های سازگار با این شرایط پرورشی است که پرورش آن از دهه ۱۹۵۰ به شکل تصاعدی رشد یافته است (FAO, 2016). کشور ایران یکی از بزرگ ترین تولیدکنندگان این گونه سردآبی در جهان بوده و امروزه در رده چهارمین تولیدکننده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دنیا قرار دارد (Harlioglu and Farhadi, 2017). FAO (۲۰۱۶) مجموع تولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در ایران برابر با ۱۶۳۳۲۵ تن گزارش داده است. علاوه براین تولید این ماهی با استفاده از سیستم‌های پرورشی متراکم ۷۴۵ تن گزارش شده است (FAO, 2015).

علی‌رغم مزایای متعدد سیستم‌های پرورشی متراکم، برخی موارد مانند عدم مدیریت صحیح مزارع پرورشی، افزایش تراکم بدون در نظر گرفتن پتانسیل

سیستم، عدم شناخت شرایط فیزیولوژیک گونه آبزی و ویژگی‌های بیوشیمیایی آب سبب بروز استرس‌های محیطی و در پی آن افزایش ظهور سویه‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب خواهد شد (Brunt and Austin, 2005). باکتری *Streptococcus iniae* از جمله عواملی است که سلامت آبزیان مخصوصاً گونه‌های سردآبی را در تاسیسات پرورشی مختلف به مخاطره می‌اندازد. این عامل باکتریایی گرم مثبت، کوکسی‌شکل و دخیل در عفونت‌های استرپتوکوکی شایع از قبیل استرپتوکوکوزیس، در صورت شیوع سبب بروز مرگ و میر بالای ۵۰ درصد در جمعیت ماهیان خواهد شد (Soltani *et al*., 2005). عواملی از قبیل تغییرات دما، میزان تراکم و اکسیژن در شیوع عفونت استرپتوکوکی موثر هستند (Shoemaker *et al*., 2000). اولین گزارش جداسازی این عامل از قزل‌آلای رنگین‌کمان مربوط به سال ۱۹۵۸ در ژاپن می‌باشد (Hoshina *et al*., 1958). Ghiasi و همکاران (۲۰۰۰) اولین گزارش این عفونت را در استان مازندران واقع در شمال ایران ارائه دادند. علاوه بر این، باکتری *S. iniae* به‌شکل بالقوه، به‌عنوان عامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و آبزیان تلقی شده است (Weinstein *et al*., 1997).

علائم این بیماری در ماهیان، شامل بی‌حالی، شنای نامتعارف، اگزوفتالمی و در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، بدون تاثیر بر ارگان‌های دیگر به‌طور مستقیم مغز را درگیر می‌کند (Soltani *et al*., 2005; Ortega *et al*., 2018). تمامی موارد مذکور سبب شده که تمهیدات مختلفی در جهت پیشگیری و درمان این بیماری مبذول گردد. درمان‌های شیمیایی شامل آنتی‌بیوتیک‌های تجاری و واکسن‌ها شاید اولین و سریع‌ترین مسیر در جهت جلوگیری از ضررهای احتمالی به نظر برسد، اما به مرور زمان، سبب بروز سویه‌های مقاوم به بیماری، افزایش باقیمانده‌های دارویی در بافت، تخریب فلور میکروبی مفید، حساسیت و بروز مسمومیت خواهند شد (Toranzo *et al*., 2005). بنابراین به کارگیری شیوه‌های جدید درمانی با کارایی بالا به‌عنوان جایگزین روش‌های شیمیایی در جلوگیری از مقاومت دارویی و بهبود سلامت آبزیان تاثیر به‌سزایی خواهند داشت.

از جمله این راهکارها، استفاده از فلور میکروبی مفید میزبان در کاهش بروز بیماری‌های باکتریایی است (Defoirdt *et al*., 2011). این ارگانیسم‌های زنده که امروزه با نام پروبیوتیک شناخته می‌شوند، به‌دلیل تولید ترکیبات زیست‌فعال مانند پپتیدهای ضد میکروبی، فعال‌سازی مولکول‌های ایمنی ذاتی از قبیل ایمونوگلوبولین‌ها و مسیرهای بیوسنتز آن‌ها، مورد استقبال و مطالعه محققین واقع شده‌اند (Merrifield *et al*., 2010; Gómez-Sala *et al*., 2015).

از جمله شناخته شده‌ترین انواع پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک هستند. این ارگانیسم‌های مفید با بکارگیری مکانیسم‌های متعدد قادر به مهار و افزایش سطوح ایمنی میزبان هستند و می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای درمان‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند (Merrifield *et al*., 2011; Balcázar *et al*., 2007; Romero *et al*., 2014). با وجود مطالعات گسترده انجام شده در این زمینه، به ندرت اثر متقابل فلور میکروبی مفید روده و عامل بیماری‌زای باکتریایی *S. iniae* مورد ارزیابی واقع شده است. از این‌رو، جداسازی باکتری‌هایی که قادر به زنده مانی و سازگاری در شرایط فیزیولوژیک دستگاه گوارش ماهی و مهار عوامل بیماری‌زای خطرناک بوده را می توان به‌عنوان یک روش بیولوژیک در کنترل و ارتقای سلامتی آبزیان تلقی کرد. بر این اساس، اولین گام در غربال باکتری‌های دارای پتانسیل پروبیوتیکی، بهره گیری از آزمایش‌های *in vitro* است. در مطالعه حاضر، جدایه‌های اسیدلاکتیک موجود در فلور میکروبی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق ویژگی‌های پروبیوتیکی شامل توانایی تحمل شرایط اسیدی، املاح صفراوی، مهار عامل بیماری‌زا و ایمنی زیستی بر اساس آزمایش‌های *in vitro* مورد ارزیابی و غربال قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری از ماهیان: ۲۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۷۵/۲۲±۳۲۶/۴۹ گرم و میانگین طولی ۵/۲۲±۲۸/۱۹ سانتی‌متر، پس از سپری کردن دوره گرسنگی به‌مدت ۴۸ ساعت از ۵ مزرعه پرورش ماهی خصوصی دارای سلامت کامل (۵ عدد از هر کدام) واقع در استان گیلان به‌صورت تصادفی صید و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی جانوری پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور انتقال داده شدند. به‌منظور نمونه‌برداری اولیه، ناحیه شکمی ماهیان ضدعفونی و بافت‌های چربی اطراف امعا و احشاء زدوده شد. سپس، سطوح داخلی لایه اپی‌تلیال شامل بخش‌های میانی تا انتهایی روده توسط تیغ اسکالپل استریل خراش و به ظروف ۵ میلی‌لیتری استریل منتقل شدند. سپس از نمونه‌های بافت هموژن شده، توسط بافر نمکی فسفاته خنثی (PBS, pH=۷/۵) به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی انجام شد. از رقت‌های تهیه شده روی پلیت‌های حاوی MRS agar (مرک، آلمان) در ۳ تکرار ریخته و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵-۳ روز در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از سپری شدن دوره گرم‌خانه‌گذاری، کلنی‌ها براساس تفاوت در شکل ظاهری انتخاب و در گلیسرول ۱۵ درصد، اسکیم میلک و محیط کشت MRS broth (مرک، آلمان) تا انجام مراحل بعدی ذخیره شدند (Lyons *et al*., 2015).

ویژگی‌های فنوتیپی: تمامی باکتری‌های اسیدلاکتیک خالص شده، از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی شامل مورفولوژی سلول، تحرک، رنگ آمیزی گرم و تولید آنزیم کاتالاز ارزیابی شدند. سپس، جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

مقاومت به اسیدیته و املاح صفراوی: توانایی جدایه های اسیدلاکتیک در مقابله با شرایط اسیدی دستگاه گوارش بر اساس روش Prasad و همکاران (۱۹۹۸) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، باکتری‌ها پس از کشت در محیط کشت MRS broth و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، در معرض pHهای مختلف شامل ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴ و ۷/۵ (کنترل) طی مدت زمان ۱/۵ ساعته قرار گرفته و پس از گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌های حاوی سوسپانسیون باکتریایی طی ۴۸-۲۴ ساعت، بر حسب CFU/ml شمارش شدند. به‌منظور بررسی تعداد کلنی های تشکیل شده در معرض عصاره صفرای ماهی از روش Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. بدین منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی کشت شده را به PBS حاوی (v/v) ۱۰ درصد صفرای استریل و PBS فاقد عصاره صفرا (کنترل) تلقیح شد. پس از تهیه رقت‌های سریالی، انتقال به پلیت و سپری شدن دوره گرم‌خانه‌گذاری، تعداد کلنی شکل یافته با تیمار کنترل مقایسه گردید.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی: میزان فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های اسیدلاکتیک علیه باکتری *S. iniae* توسط روش آگار دولایه اندازه‌گیری شد (Toure *et al*., 2003). به‌طور خلاصه، PTCC 1887 *S. iniae* به شکل لیوفیلیز، از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران خریداری و در TSB (QUELAB، کانادا) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. از سوسپانسیون‌های باکتریایی اسید لاکتیکی کشت شده به مرکز پلیت MRS agar تلقیح و پس از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸-۱۶ ساعت، از باکتری بیماری‌زا سوسپانسیونی با کدورت نیم مک فارلند تهیه و به محیط کشت آگار نرم ((۰/۷ درصد) TSB+Agar) با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. محیط کشت حاوی باکتری بیماری‌زای *S.iniae* را روی پلیت نقطه‌گذاری شده ریخته و پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به صورت هوازی به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از مدت زمان مربوطه قطر هاله عدم رشد تعیین و ارزیابی گردید.

آزمون‌های ایمنی زیستی

فعالیت همولیتیک: کلنی‌های باکتریایی اسید لاکتیکی جداسازی شده را روی پلیت‌های Base Blood agar (QUELAB، کانادا) حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند به‌صورت خطی کشت شده و به‌مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. وجود هاله‌های کاملاً شفاف اطراف کلنی‌های باکتریایی نشانه فعالیت بتاهمولیتیک است که باید از جمعیت باکتری‌های منتخب حذف گردند (Chang *et al*., 2000).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: به‌منظور انجام این آزمایش، از روش دیسک استاندارد استفاده شد (Bauer *et al*., 1966). بدین منظور، دیسک‌های آنتی بیوتیک (پادتن‌طب، ایران) شامل آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، استرپتوماسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲۰ میکروگرم) و کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) به پلیت‌های حاوی محیط Müller-Hinton agar (QUELAB، کانادا) آغشته به سوسپانسیون‌های باکتریایی، منتقل شدند. تمامی پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری و در نهایت از نظر وجود هاله عدم رشد باکتریایی با احتساب قطر دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی مقادیر اندازه گیری شده با استاندارد CLSI (۲۰۱۶) مقایسه و ارزیابی شدند.

آنالیز مولکولی 16s rRNA: DNA باکتریایی براساس پروتکل مربوطه در کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (سیناکلون) استخراج شد. واکنش زنجیره پلیمرازی با استفاده از دستگاه Thermal cycler T100 (BioRad, Canada) انجام شد. بدین منظور حجم هر واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول PCR Master Mix 2x (سیناکلون، ایران) به‌همراه ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمرهای یونیورسال شامل (5'AGAGTTTGATCMTGG 27F (CTCAG-3' و (5'-TACGGYTACCTT 149R (GTTACGACTT-3' و ۲ میکرولیتر DNA استخراجی به همراه کنترل منفی در دستگاه قرار داده و مراحل تکثیر باند طی شد. (McDonald *et al*., 1995). پس از تعیین خلوص محصول PCR، نمونه‌ها به‌منظور توالی‌یابی به شرکت ماکروژن واقع در کره جنوبی فرستاده و نتایج آنالیز در سایت NCBI، بلاست و مقایسه گردید.

آنالیز آماری: برای بررسی سطوح معنی‌داری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) به‌همراه تست Duncan در سطح $P<0/05$ استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و برای بررسی همگنی از آزمون Leven استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (۱۶) انجام شد.

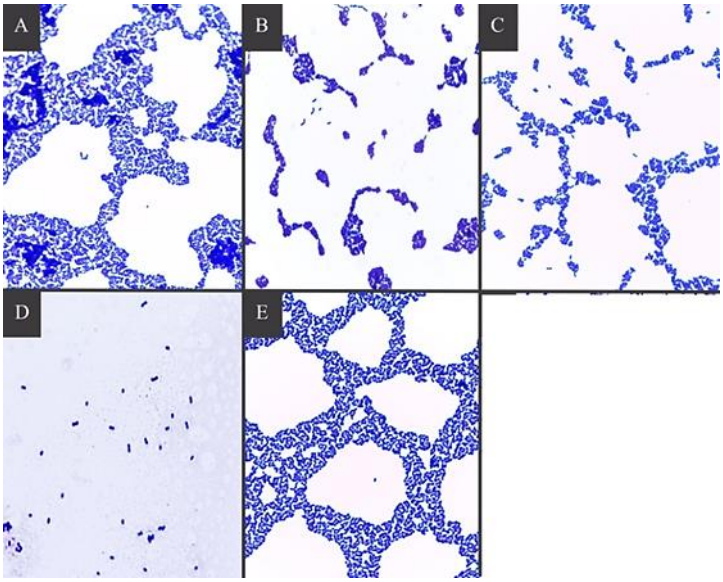
نتایج

ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده: در این تحقیق، از میان ۱۴۸ باکتری جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۵ سویه باکتریایی بر اساس ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی غربال شدند. بررسی آنالیز توالی ژنی 16S rRNA و درصد مشابهت آن‌ها با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی (NCBI) در جدول ۱ آمده است. تمامی جدایه‌ها، از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی و ساختار دیواره سلولی گرم مثبت و نسبت به تولید آنزیم کاتالاز، منفی بودند. مشاهدات میکروسکوپی در رابطه با مورفولوژی کلنی، نشان‌دهنده ساختار کروی، آرایش زنجیره‌ای کوتاه و مزدوج در بین باکتری‌ها بود (شکل ۱).

مقاومت به اسیدیته دستگاه گوارش : نتایج مقاومت

جدول ۱- مشخصات رده‌بندی ۵ سویه باکتریایی منتخب جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از توالی ژنی16S rRNA.

نام سویه	بررسی توالی ژنی	کد دسترسی در بانک ژنی	درصد شباهت جدایه‌ها در بانک ژنی (درصد)
NABRII49	*Lactococcus lactis subsp. cremoris*	MH595953	۹۹
NABRII66	*Lactococcus lactis subsp. cremoris*	MH620382	۹۹
NABRII64	*Lactococcus lactis subsp. cremoris*	MH620380	۱۰۰
NABRII61	*Lactococcus lactis*	MH620377	۹۹
NABRII67	*Lactococcus lactis*	MH620383	۹۹



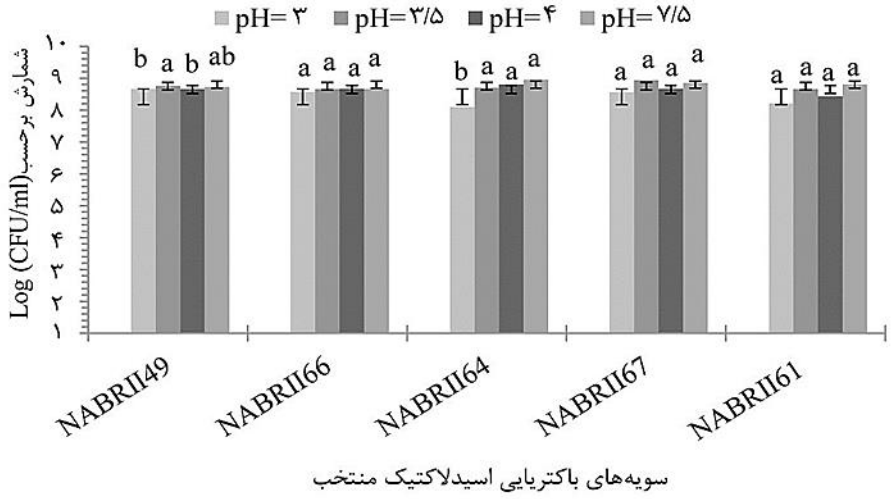
شکل ۱ - نتایج مورفولوژی سلولی و رنگ‌آمیزی گرم ۵ سویه باکتریایی منتخب جداسازس شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بزرگنمایی ۱۰۰X (A: NABRII49, B: NABRII64 C: NABRII66, D: NABRII61, E: NABRII67).

به اسیدیته مربوط به ۵ سویه باکتریایی منتخب در شکل ۲ آمده است. براساس میانگین شمارش کلنی‌های باکتریایی زنده (Log CFU/ml)، پنج سویه باکتریایی منتخب نسبت به pH=۳-۷/۵ طی ۱/۵ ساعت مقاوم بودند. هیچ‌کدام از سویه‌ها قادر به تشکیل کلنی در pH=۲/۵ نبودند. تعداد کلنی تشکیل شده در pH=۳ در ارتباط با سویه NABRII64 به‌طور معنی داری پایین‌تر از تیمار کنترل (pH=۷/۵) بود ($P<۰/۰۵$). اختلاف معنی‌داری بین تعداد کلنی‌های تشکیل شده سایر سویه‌های باکتریایی منتخب در معرض مقادیر مختلف pH، در مقایسه با تیمار کنترل مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

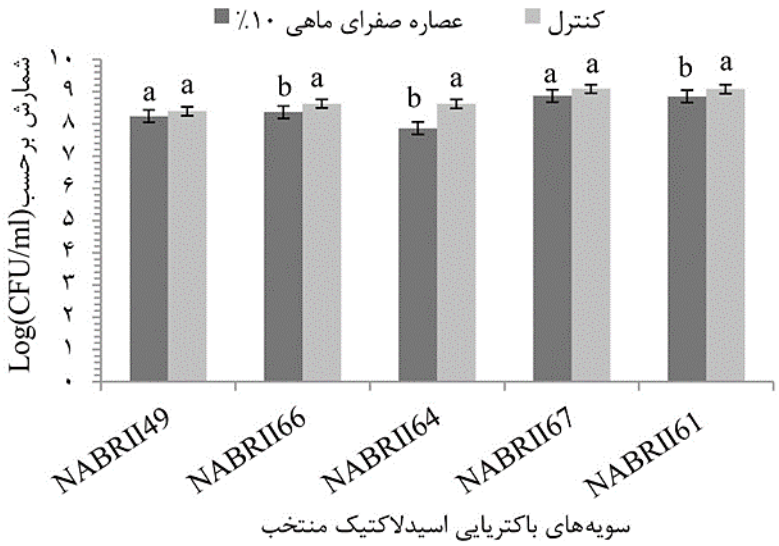
مقاومت به عصاره صفرای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان: مقاومت به املاح صفراوی ماهی (۱۰ درصد)، در شکل ۳ گزارش شده است. بر این اساس، تعداد کلنی‌های تشکیل شده طی ۱/۵ ساعت در تمامی سویه‌های باکتریایی منتخب به جز NABRII49 و NABRII67 به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل کاهش یافت ($P<۰/۰۵$).

ارزیابی مهار رشد باکتری بیماری‌زا *S. iniae*: نتایج حاصل از این مطالعه در رابطه با پتانسیل مهار رشد عامل باکتری بیماری‌زا *S. iniae*، نشان داد که تمامی ۵ سویه باکتریایی منتخب جداسازی شده قادر به مهار باکتری بیماری‌زا مربوطه بودند (شکل ۴). بر اساس میانگین هاله عدم رشد در تست آگار دولایه، سویه‌های NABRII49، NABRII66، NABRII67 و NABRII64 در مقایسه با سویه NABRII61 به‌طور معنی‌داری بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه باکتری بیماری‌زا نشان دادند ($P<۰/۰۵$).

فعالیت همولیتیک و حساسیت آنتی‌بیوتیکی: بر



شکل ۲ - مقاومت ۵ سویه باکتریایی منتخب نسبت به شرایط مختلف اسیدی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۱/۵ ساعت بر اساس Log (CFU/ml) (داده‌ها بر حسب Mean±SD) نمایش داده شده است، حروف متفاوت لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف pH در مقایسه با تیمار کنترل در هر سویه می‌باشد).



شکل ۳ - مقاومت ۵ سویه باکتریایی منتخب نسبت به عصاره صفرای ماهی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت بر اساس Log CFU/ml). (داده‌ها بر حسب Mean±SD) نمایش داده شده است، حروف متفاوت لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف pH در مقایسه با تیمار کنترل در هر سویه می‌باشد).

اساس مشاهدات، ۷۲ ساعت پس از کشت ۵ سویه باکتریایی منتخب بر روی به پلیت‌های Blood Agar، هیچ‌کدام از باکتری‌ها فعالیت بتاهمولیتیک نشان ندادند. نتایج تست آنتی‌بیوگرام بر اساس استاندارد CLSI 2016 در جدول ۲ آمده است. براین اساس، تمامی سویه‌ها دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بوده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه تنها در NABRII61 مشاهده شد.

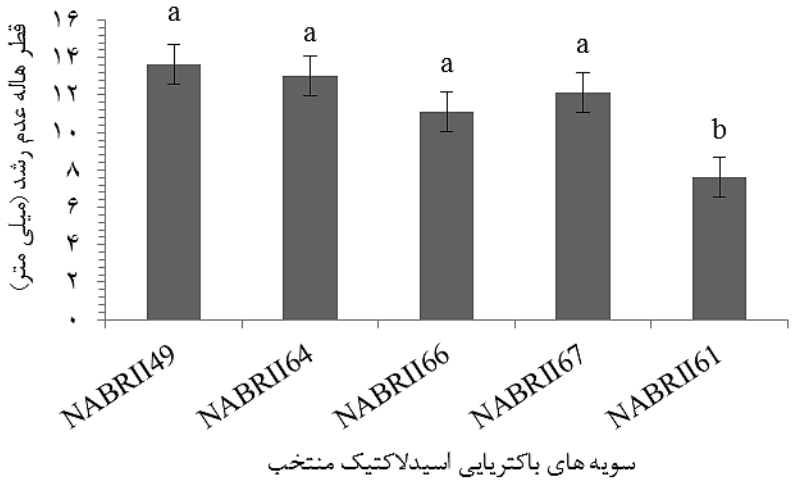
بحث

دستگاه گوارش ماهیان نخستین جایگاه مطلوب در جهت کلونیزه شدن ارگانیسم‌های مفید باکتریایی است و باکتری‌های اسیدلاکتیک جز بزرگترین اجتماعات میکروبی موجود در این محیط هستند (Asfie *et al.*, 2003; Balcázar *et al.*, 2007). عوامل مختلفی مانند شرایط فیزیکوشیمیایی آب، فیزیولوژی و سیستم گوارشی میزبان و رژیم غذایی و تغییر فصول بر تنوع

جدول ۲- حساسیت ۵ سویه باکتریایی اسیدلاکتیک منتخب نسبت به ۸ آنتی بیوتیک تجاری در مقادیر استاندارد.

نام آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	سویه‌های باکتریایی منتخب				
		NABRII49	NABRII66	NABRII64	NABRII61	NABRII67
آمپی‌سیلین	Am	S	S	S	S	S
استرپتومایسین	Sm	I	S	S	S	I
تتراسایکلین	Te	R	R	R	R	R
کانامایسین	Km	S	S	S	S	S
اریترومایسین	Em	I	I	I	I	S
جنتامایسین	Gm	S	S	S	S	S
کلرامفنیکل	Cl	S	S	S	R	S
کلیندامایسین	Cm	S	S	S	S	S

S: حساس، I: بینابینی، R: مقاوم



شکل ۴ - نتایج مربوط به فعالیت ضدمیکروبی و قطر هاله عدم رشد باکتری *S. iniae* ایجاد شده توسط ۵ سویه باکتریایی اسیدلاکتیک منتخب. قطر هاله عدم رشد، بر اساس اندازه‌گیری حاشیه خارجی باکتری اسیدلاکتیک منتخب تا حاشیه داخلی هاله عدم رشد عامل بیماری‌زا محاسبه شد.

گونه‌های باکتریایی دستگاه گوارش اثر می‌گذارند (Romero *et al*., 2014). در این مطالعه تمامی سویه های جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان، به زیرگونه‌های *L. lactis* تعلق داشتند. پتانسیل پروبیوتیکی زیرگونه‌های *L. lactis* (*L. lactis subsp. Lactis* و *L. lactis subsp. cremoris*) در برخی از مطالعات ارزیابی و اثبات شده است (Balcázar *et al*., 2008; Muñoz-Atienza *et al*., 2013). زیر گونه‌های *L. lactis* علی‌رغم وجود تنوع ژنتیکی پایین در ژن 16S rRNA دارای تنوع وسیعی از صفات فنوتیپی و بیوشمیایی هستند (Itoi *et al*., 2009). همچنین به‌دلیل سازگاری بالا در محیط‌های مختلفی مانند سطوح گیاهی (Salama *et al*., 1995)، ماهیان آب‌شور و شیرین (Itoi *et al*., 2008; Didinen *et al*., 2018) یافت می‌شوند.

نخستین گام در غربال کلنی‌های مفید باکتریایی بررسی میزان تحمل آن‌ها نسبت به شرایط فیزیولوژیک دستگاه گوارش است. pH معده تحت تاثیر عواملی همچون ظرفیت بافری اجزای جیره، سن ماهی و آنزیم های ترشحی تغییر می‌کند (Freitag, 2007). Bucking و Wood (۲۰۰۹) مشاهده کردند که pH معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان درست قبل از تغذیه حدود سه و یک ساعت پس از آن به حدود ۵ خواهد رسید. بنابراین، باکتری‌ها باید قادر به تحمل این محدوده باشند. در این مطالعه، تمامی سویه‌های باکتریایی منتخب قادر به تحمل pH= ۳- ۷/۵ و هیچ-کدام در معرض pH= ۲/۵ قادر به تشکیل کلنی نبودند. در مطالعات دیگر نیز نتایج مشابه این تحقیق حاصل

شد (Pérez-Sánchez *et al*., 2011; Balcázar *et al*., 2008). علاوه بر این املاح صفراوی مترشحه در مجرای گوارشی یک عامل محدودکننده دیگر در میزان رشد باکتری است. توانایی زنده‌مانی در املاح صفراوی و عبور از مجرای گوارشی ممکن است، بیانگر وجود آنزیم‌های هیدرولیزکننده نمک‌های صفراوی (BSH) می‌باشد که در حقیقت، تغییردهنده برخی از ویژگی های ترکیبات صفراوی است (De Smet *et al*., 1995). بر اساس نتایج، تمامی سویه‌های باکتریایی منتخب قادر به تشکیل کلنی در عصاره صفرای ۱۰ درصد بودند. نتایج مشابهی در این زمینه، گواه مقاومت باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت به املاح صفراوی است (Itoi *et al*., 2008; Brink *et al*., 2005; Mukherjee and Ghosh, 2016).

باکتری‌های اسیدلاکتیک مختلف قادر به تولید ترکیبات خارج سلولی مهارکننده و باکتریواستاتیک علیه عوامل بیماری‌زای دیگر هستند و توسط افزایش کلنی‌های مفید، سبب ایجاد تعادل در جوامع میکروبی خواهند شد (Brunt and Austin, 2005). در این مطالعه نیز، ۵ باکتری اسیدلاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی توانستند باکتری بیماری‌زای مربوطه را مهار کنند. Sahnouni و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ۳۸ سویه *L. lactis* جداسازس شده از دستگاه گوارش ماهیان دریایی، مشاهده کردند که این سویه‌ها قادر به بروز فعالیت ضدمیکروبی علیه *Aeromonas hydrophila* هستند. البته در این مطالعه صرفا به بررسی کمی مهار عامل بیماری‌زا توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک پرداخته شده است. بنابراین نحوه عملکرد سویه‌ها در معرض عامل بیماری‌زا عامل مهمی بوده که باید در آینده ارزیابی گردد.

ایمنی زیستی یک مسئله مهم در مورد انتخاب سویه‌های پروبیوتیک مخصوصا سویه‌های جدید و شناسایی نشده می‌باشد. اولین معیار در زمینه استفاده ایمن از باکتری‌های اسیدلاکتیک، عدم بیماری‌زایی است (Tejero-Sariñena *et al*., 2012). باکتری های بیماری‌زا توسط ترشح برخی سموم پروتئینی مانند آلفاتوکسین، قادر به تجزیه دیواره گلبول‌های قرمز هستند (Titball *et al*., 1991). در این مطالعه هیچ‌کدام از سویه‌های باکتریایی منتخب فعالیت بتاهمولیتیک نشان ندادند و بر اساس آزمایش‌های *in vitro* غیر بیماری‌زا تلقی می‌شوند. علاوه بر این، عدم انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های اسیدلاکتیک، دومین معیار مهم در ارزیابی ایمنی زیستی است (EFSA, 2007). امروزه به‌دلیل استفاده غیر مجاز از مواد ضدعفونی‌کننده به‌منظور درمان و کنترل عوامل مهاجم، ظهور سویه‌های مقاوم به درمان افزایش یافته است (Sihag and Sharma, 2012). در این مطالعه، تمامی باکتری‌های منتخب دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به تتراسایکلین بودند. مکانیسم‌های متعددی در جهت ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارند. در حضور آنتی‌بیوتیک، باکتری‌ها به‌دلیل جهش، با نرخ بالایی رشد و تکثیر می‌یابند و این ویژگی را از طریق انتقال ژن توسط پلاسمیدهای باکتریایی به گونه های دیگر منتقل و سبب گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی می‌شوند (Clewell *et al*., 1995). از طرفی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی با اثر بر پمپ‌های افلوکس سلول باکتریایی و سنتز پروتئین‌های محافظت کننده ریبوزومی سبب بروز مقاومت خواهند شد (Aminov *et al*., 2001).

با توجه به نتایج می‌توان گفت که ۵ سویه باکتریایی اسیدلاکتیک منتخب متعلق به *L. lactis*، به شکل متنوعی قادر به تحمل شرایط دستگاه گوارش و مهار عامل بیماری‌زا بودند. بر اساس آنالیز ایمنی زیستی، تمامی باکتری‌ها فاقد فعالیت بتاهمولیتیک و دارای الگوی‌های فنوتیپی متفاوت مقاومت آنتی بیوتیکی بودند. از آنجایی که آزمایش‌های *in vitro* اولین گام در بررسی پتانسیل پروبیوتیکی ارگانیسم‌های باکتریایی است، تایید سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی از جمله الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با واسطه پلاسمید و توانایی باکتری‌ها در معرض محیط آبی تحت شرایط آزمایشی *in vivo* در سویه‌های جداسازی شده،

نیازمند مطالعات بیشتری خواهد بود.

تشکر و قدردانی

تمامی بخش‌های این مطالعه، تحت حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، واقع در شمال کشور انجام شده و زیرمجموعه‌ای از یک پروژه مصوب دارای شناسه: ۱۲۰۵۰۵۹۴۵۵۹۴۰۰۱ می‌باشد. بنابراین از کلیه کارشناسان و اعضای هیئت علمی در بخش‌های میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی جانوری به پاس راهنمایی‌های کاربردی و مفید سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

Aminov R.I., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R.I. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 22-32.

Asfie M., Yoshijima T., Sugita H. 2003. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. *Fisheries Science* 69, 21-26.

Balcázar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Gironés O., Múzquiz J.L. 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 122(3-4), 373-380

Balcázar J.L., Vendrell D., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Muzquiz J.L., Girones O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278(1-4), 188-191.

Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Truck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496.

Brink M., Todorov S.D., Martin J. H., Senekal M., Dicks L.M.T. 2006. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology* 100(4), 813-820.

Brunt J., Austin B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease* 28, 693-701.

Bucking C., Wood C.M. 2009. The effect of postprandial changes in pH along the gastrointestinal tract on the distribution of ions between the solid and fluid phases of chyme in rainbow trout. *Aquaculture Nutrition* 15(3), 282-296.

Chang C.I., Liu W.Y., Shyu, C.Z. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43, 153-157.

Clewell D.B., Flannagan S.E., Jaworski D.D. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology* 3, 229-236.

Defoirdt T., Sorgeloos P., Bossier P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* 14(3), 251-258.

De Smet I., Van Hoorde L., Vande Woestyne M., Christiaens H., Verstraete W. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 292-301.

Didinen B.I., Onuk E.E., Metin S., Cayli O. 2018. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture Nutrition* 24(1), 400-407.

EFSA 2007. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) a roach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal* 587, 1-16.

FAO 2015. National aquaculture sector overview: Iran (Islamic republic of). http: //www.fao.org/fishery/countrysector/naso iran/en.

FAO 2016. The State of world fisheries and aquaculture: contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome, Italy. 200 p.

Freitag M. 2007. Organic acids and salts promote performance and health in animal

Carnevali O., Picchietti S., Davies S.J. 2011. Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research* 344, 135-146.

Mukherjee A., Ghosh K. 2016. Antagonism against fish pathogens by cellular components and verification of probiotic properties in autochthonous bacteria isolated from the gut of an Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). *Aquaculture Research* 47(7), 2243-2255.

Muñoz-Atienza E., Gómez-Sala B., Araújo C., Campanero C., del Campo R., Hernández P.E., Herranz C., Cintas L.M. 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology* 13, 1-22.

Nikoskelainen S., Salminen S., Bylund G., Ouwehand A. 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2430-2435.

North B.P., Ellis T., Turnbull J.F., Davis J., Bromage N.R. 2006. Stocking density practices of 479 commercial UK rainbow trout farms. *Aquaculture* 259(1), 260-267.

Ortega C., García I., Irgang R., Fajardo R., Tapia-Cammas D., Acosta J., Avendaño-Herrera R. 2018. First identification and characterization of *Streptococcus iniae* obtained from tilapia (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico. *Journal of Fish Diseases* 41(5), 773-782.

Pérez-Sánchez T., Balcázar J.L., García Y., Halaihel N., Vendrell D., De Blas I., Merrifield D.L., Ruiz-Zarzuela I. 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases* 34(7), 499-507.

Prasad J., Gill H., Smart J., Gopal P.K. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.

Romero J., Ringø E., Merrifield D.L. 2014. The gut microbiota of fish. In: D.L. Merrifield, E. Ringø (Eds.). Aquaculture Nutrition: Gut husbandry. In: C. Lückstädt (Ed.). Acidifiers in Animal Nutrition-A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance, Nottingham University Press, Nottingham, England. pp: 1-11.

Ghiasi M., Zahedi A., Rostami H. 2000. The occurrence of streptococcosis in rainbow trout broodstock in Mazenderan Province, north of Iran. Proceeding of the 1st Aquatic Animal Health Conference, Ahwaz, Iran. 2000.

Gómez-Sala B., Muñoz-Atienza E., Sánchez J., Basanta A., Herranz C., Hernández P.E., Cintas L.M. 2015. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *European Food Research and Technology* 241(3), 341-356.

Harlioglu M., Farhadi A. 2017. Iranian fisheries status: an update (2004-2014). *Fisheries and Aquaculture Journal* 8:192.

Hoshina T., Sano T., Morimoto T. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 44, 57-68.

Itoi S., Abe T., Washio S., Ikuno E., Kanomata Y., Sugita H. 2008. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis subsp. Lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology* 121, 116-121.

Itoi S., Yuasa K., Washio S., Abe T., Ikuno E., Sugita H. 2009. Phenotypic variation in *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology* 107(3), 867-874.

Lyons P.O., Turnbull J.F., Dawson K.A., Crumlish M. 2015. Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquaculture Research* 48, 77-91.

McDonald I.R., Kenna E.M., Murrell J.C. 1995. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 116-121.

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bøgwald J., Castex M., Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302(1-2), 1-18.

Merrifield D.L., Harper G., Mustafa S.,

health, probiotics and prebiotics. John Wiley and Sons, London. pp: 75-100.

Sahnouni F., Boutiba-Maatallah A., Bouhadi D., Boutiba Z. 2014. Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis ssp. lactis* strains isolated from marine fish caught in the Algerian west coast. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* 2, 1838-1843.

Salama M.S., Musafija-Jeknic T., Sandine W.E., Giovannoni S.J. 1995. An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis subsp. cremoris. Journal of Dairy Science* 78, 1004-1017.

Shoemaker C.A., Evans J.J., Klesius P.H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188(3-4), 229-235.

Sihag R.C., Sharma P. 2012. Probiotics: the new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 7, 72-103.

Soltani M., Jamshidi S., Sharifpour I. 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 25, 95-106.

Tejero-Sariñena S., Barlow J., Costabile A., Gibson G.R., 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* 18(5), 530-538.

Titball R.W., Leslie D.L., Harvey S.H., Kelly D.A. 1991. Hemolytic and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin are dependent on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway. *Infection and Immunity* 59(5), 1872-1874.

Toranzo A.E., Romalde J.L., Magariños B., Barja J.L. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Mediterraneennes* 86, 155-176.

Toure R., Kheadr E., Lacroix C., Moroni O., Fliss I. 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1058-1069.

Weinstein M.R., Litt M., Kertesz D.A., Wyper P., Rose D., Coulter M., McGeer A., Facklam R., Ostach C., Willey B.M., Borczyk A. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *New England Journal of Medicine* 337(9), 589-594.

Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine against *Streptococcus iniae*

Faezeh Mortezaei[1], Maryam Royan[*2], Hamid Allaf Navirian[1], Aria Babakhani[1]

[1]Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
[2]North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
*Corresponding author: m.royan@abrii.ac.ir

Received: 2018/10/11 Accepted: 2018/12/29

Abstract

In this study, the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout intestine with inhibitory activity against *Streptococcus iniae* was evaluated by *in vitro* experiments. For this purpose, gram-positive and catalase negative lactic acid bacteria were screened based on probiotic characteristics such as acid and bile salt tolerance, antimicrobial activities against *S. iniae* and bio-safety assay including haemolytic activity and antibiotic susceptibility to eight major commercial antibiotics. At last, genotypic identification of candidate lactic acid bacteria isolates carried out by 16S rRNA gene sequence analysis. Based on results, among 148 bacterial isolates, five lactic acid bacteria strains belonged to the *Lactococcus lactis* subsp. were tolerant to pH=3-7.5, fish bile extract (10%) and had antimicrobial activity against *S. iniae*. Also, the bio-safety assay results revealed that none of the bacterial strains showed beta-haemolytic activity and all candidate bacterial strains exhibited phenotypic resistance to tetracycline. The multiple antibiotic resistant (tetracycline and chloramphenicol) was observed only in *L. lactis* NABRII61. This study showed that the five lactic acid bacteria isolated from rainbow trout intestinal microflora could be considered as probiotic strains in aquaculture. However, further experiments are required to confirm the nature of antibiotic resistance.

Keywords: *In vitro* experiments, Lactic acid bacteria, Probiotic bacteria, Rainbow trout.