شناسایی گونه‌های لاکتوباسیل مزوفیل موجود در روده ماهیان سفید (*Rutilus kutum* Kamensky, 1901) دریای خزر با تست تأییدی PCR

پویا خوش‌خیال صابر [1]، سید جاوید مرتضوی تبریزی [*1]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. صندوق پستی: ۵۱۵۷۹۴۴۵۳۳

تاریخ دریافت: ۵ مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۴ مهر ۱۳۹۶

چکیده

لاکتوباسیل‌ها گونه‌های باکتری گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی میله‌ای می‌باشند که دارای نقش اکولوژیکی مهمی در دستگاه گوارش می‌باشند که شامل تولید مواد ضدمیکروبی، افزایش پاسخ سیستم ایمنی و افزایش قابلیت دسترسی مواد مغذی است. جهت شناسایی لاکتوباسیل‌های موجود در روده ماهیان سفید اقدام به صید تعداد ۴۰ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی از دریای خزر گردید. سپس نمونه‌ها تحت شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد تبریز منتقل و بعد از بررسی فنوتیپیکی و بیوشیمیایی، ۱۰ نمونه لاکتوباسیل موردنظر برای تشخیص گونه‌ها بر اساس ساختار مولکولی ژن 16 srDNA، اقدام به استخراج DNA و شناسایی لاکتوباسیل‌ها با پرایمر اختصاصی نموده و سپس به‌منظور شناسایی اولیه گونه‌ها از آنزیم برشی Taq1 استفاده گردید. سپس ۳ نمونه متفاوت به‌منظور تشخیص قطعی جهت توالی یابی ارسال گردید. نتایج توالی یابی حاکی از تشابه ۹۹-۹۷٪ توالی‌های موردنظر با توالی‌های ژن‌های 16 SrDNA ثبت‌شده در بانک اطلاعاتی برای گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم بود و تنها یک نمونه تشابه ۸۹٪ با گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*Lactobacillus Fermentum*) داشت که نمونه موردنظر برای توالی یابی به‌صورت پارشیال فرستاده شد و بعد توالی یابی با شماره ژن JQ906262 تحت عنوان Lactobacillus sp. RU1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence در سایت ncbi ثبت شد.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس، ماهی سفید، مزوفیل.

* عهده‌دار مکاتبات (✉)، j.mortazavi@iaut.ac.ir

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

مقدمه

ماهی سفید دریاچه خزر یکی از ماهیان پرارزش شیلاتی است. این ماهی در سواحل جنوبی دریاچه خزر زندگی می‌کند. این ماهی برای تخم‌ریزی و تولیدمثل از اوایل اسفند تا اواخر اردیبهشت‌ماه هنگامی‌که درجه حرارت آب ۱۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد است از دریاچه خزر وارد رودخانه‌های جنوبی شده مبادرت به تخم‌ریزی می‌نماید، ماهیان سفید دریاچه خزر در حدود سه‌سالگی بالغ می‌شوند. مواد غذایی ماهی سفید شامل نرم‌تنان، سخت‌پوستان ریز و لارو حشرات است ولی در هنگام مهاجرت برای تخم‌ریزی، تغذیه آن‌ها قطع می شود (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹). پراکندگی ماهی سفید در دریای خزر و دریای سیاه و دریای آزوف و رودخانه‌های اطراف آن است. ماهی سفید عمدتاً در حوزه جنوبی دریای خزر از رودخانه کورا واقع در ضلع غربی تا رودخانه اترک واقع در جنوب شرقی پراکنده است. در حوزه جنوبی دریای خزر ذخایر این ماهی در منطقه گیلان به‌مراتب بیشتر از منطقه مازندران است. علت اساسی گرایش ماهی سفید در حوزه جنوبی دریای خزر بخصوص در منطقه گیلان علاوه بر شرایط فیزیکی از قبیل درجه حرارت، رطوبت، مقدار نور، مربوط به مواد غذایی، محل‌های مناسب زادوولد است (رضوی صیاد،۱۳۷۴).

لاکتوباسیل‌ها گونه‌های باکتری گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی میله‌ای می‌باشند که بیشتر کربوهیدرات‌ها را به لاکتات و استات تخمیر می‌نمایند. انواع مختلفی از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی برای رشد آن‌ها ضروری است (Kandler and Weiss, 1986). لاکتو باسیل‌ها دارای نقش اکولوژیکی مهمی در دستگاه گوارش می‌باشند که شامل: تولید مواد ضدمیکروبی، افزایش پاسخ سیستم ایمنی، افزایش قابلیت دسترسی مواد مغذی و استفاده از برخی از کربوهیدرات‌های غیرقابل‌هضم است (Fuller, 1989; Havenaar *et al*., 1992). به‌عنوان‌مثال لاکتوباسیل‌های اسیدوفیل، ارگانیسم‌های تخمیری هستند که اسیدلاکتیک تولید می‌نمایند تا تعادل اسید را در روده تثبیت نمایند. طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌های پاتوژنیک که در روده هستند، در شرایط خنثی یا کمی قلیایی و یا کاملاً اسیدی رشدشان متوقف می‌شود. اشرشیا کلی باکتری بیماری‌زای شاخص و بارز روده است، اما در حضور لاکتوباسیلوس‌ها رشدش محدودشده و متوقف می‌شود (شیوا زاد، ۱۳۸۳). با توجه به عمل گسترده این فاکتورها، محیط سالمی برای روده تثبیت و تعادل روده حفظ می‌شود، عفونت‌های مضر از بین رفته و عملکرد غذایی تا حداکثر مقدار، بالا می‌رود (خیابانی، ۱۳۸۶ و زمان زاد ۱۳۸۴). لاکتو باسیل‌ها در دستگاه گوارش انواع مختلفی از مهره‌داران، به‌ویژه ماهیان آب شیرین حضور دارند (Gonzalez *et al*., 2000). تحقیقات نشان داده که برخی از لاکتوباسیل‌ها مانند لاکتوباسیلوس لاکتیس، فرمنتوم و پلانتارم می‌توانند باعث کاهش اتصال عوامل بیماری‌زای ماهی به موکوس روده شوند (Balcázara *et al*., 2008) همچنین در تحقیقات اخیر اثرات انتی اکسیدانی برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم تحت شرایط آزمایشگاهی مشخص‌شده است (Mikelsaar & Zilmer, 2009)

با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در ماهیان، لذا در این تحقیق سعی شد تا گونه‌های لاکتوباسیل موجود در روده ماهیان سفید موجود در دریای خزر را شناسایی نماییم.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

مواد و روش‌ها

طی این بررسی تعداد ۴۰ قطعه ماهی سفید به‌صورت تصادفی صید شد. سپس نمونه‌ها تحت شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل و بعد از تشریح با رعایت اصول استریل، ۱ گرم از محتویات مدفوع از قسمت یک‌سوم قدامی روده برداشته و به میزان ۹ برابر وزن آن، محلول نمکی نرمال استریل به آن اضافه گردید تا هموژن گردد و از محلول فوق رقت‌های سریالی در دامنه 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه شد و به ازای هر رقت دو پلت در سطح محیط کشت MRS آگار کشت داده آن‌ها را در جار بی‌هوازی با گاز پک نوع C به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردیدند. بعدازاین مدت پلیت‌ها بر اساس اشکال و پیگمان پرگنه، خالص‌سازی شده، سپس در شرایط بی‌هوازی با گاز پک C به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری و از کشت خالص تست کاتالاز و اکسیداز عمل آمد در صورت منفی بودن هر دو تست و مشاهده باسیل‌های گرم مثبت فاقد اسپور و غیر اسید فست در رنگ امیزی گرم و منفی بودن تست حرکت، پرگنه به‌عنوان لاکتوباسیل احتمالی شناسایی گردیدند (Dworkin, *et al*. 2006).

برای تائید لاکتوباسیل بودن نمونه‌های خالص محیط کشتOF نتیجه F در محیط، حرکت منفی، کشت در محیط گلوکز براث با لوله درهام و تخمیر گلوکز، منفی بودن واکنش در محیط کشت نیترات، انجام گردید. برای تشخیص گونه لاکتوباسیل تست‌های رشد در دمای ۱۵ درجه و ۴۵ درجه، تولید اسید از قندهای آرابینوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، رافینوز، سالیسین، سوربیتول و تره هالوز، هیدرولیز اسکولین و آرژنین انجام گردید (Dworkin, *et al*., 2006). نتایج بر اساس جدول زیر مطابقت داده‌شده و نتایج حاصله ثبت و موردبررسی بعدی قرار گرفتند (جدول ۱).

استخراج DNA از نمونه‌های ۲۴ ساعته کشت داده‌شده در محیط MRS مایع انجام شد. ده میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی در دور 7000 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد و از پلت‌ها برای استخراج DNA استفاده شد. ابتدا مقداری ازت مایع به‌منظور انتقال راحت پلت‌ها به هاون چینی، بر روی پلت‌ها ریخته شد و سپس پلت‌ها به هاون چینی منتقل و با افزودن مقداری ازت مایع اضافی و با استفاده از دسته‌هاون، پودر دارای سلول‌های باکتریایی منفرد تهیه شد. برای لیز کردن سلول‌ها از بافرلیز استفاده شد. بعد از ریختن بافرلیز در هاون‌های چینی استریل حاوی سلول‌های پودر شده، سلول‌ها خرد و به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. ویال‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در بن ماری قرار داده شدند. بعد از ۶۰ دقیقه، ویال‌های حاوی سلول‌های لیز شده را به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ کرده و مایع رویی به و یال‌های دیگر منتقل و هم‌حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل با نسبت‌های ۱:۲۴ به آن اضافه شد و به‌آرامی تکان داده شد. سپس دو فاز تشکیل‌شده در مرحله قبل با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه، جداسازی و با برداشتن لایه رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر هم‌حجم آن‌ها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد. با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

خشک‌شده در ۵۰ میکرو لیتر آب دیونیزه حل گردید. برای آگاهی از کیفیت و کمیت استخراج DNA، ۵ میکرو لیتر از DNA حل‌شده در ۵۰ میکرو لیتر آب دیونیزه، با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و در همه نمونه‌ها DNA ژنومی باکیفیت و غلظت خوب مشاهده شد (لطفی و همکاران، ۱۳۸۹).

جدول ۱: تشخیص گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس به همراه نتایج حاصل از تحقیق (Cowan, 2011)

نوع آزمایش	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
رشد در دمای ۱۵°C	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
رشد در دمای ۴۵°C	+	+	+	+	d	-	-	-	+	+
تولید گاز از گلوکز	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
تولید اسید از:										
ارابینوز	-	-	-	-	-	d	+	+	d	+
گالاکتوز	+	d	-	+	+	+	+	V	+	+
لاکتوز	+	-	d	+	+	d	+	d	d	+
مالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مانیتول	-	-	-	-	+	+	+	d	-	-
رافینوز	d	-	-	+	-	+	+	d	+	-
سالیسین	+	+	+	+	d	+	+	-	d	-
تره هالوز	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
هیدرولیز اسکولین	+	+	+	+	d	+	+	d	+	-
هیدرولیز ارژینین	-	+	d	-	-	-	-	+	+	+

۱-lactobacillus acidophilus
۲-lactobacillus jenseni
۳-lactobacillus jeichmannii
۴-lactobacillus salivarius
۵- lactobacillus casei
۶-lactobacillus plantarum
۷-lactobacillus brevis
۸-lactobacillus cellobiosus
۹-lactobacillus fermenti
۱۰-نتایج حاصل از آزمایش

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و تکثیر قطعه 16s rRNA PCR

یا واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرو لیتر، با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده در سطح جنس برای ایزوله‌ها انجام گرفت (جدول ۲). واکنش زنجیره پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سی ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌های تکثیر یافته به نسبت ۶ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل موردنظر توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و نوارهای تکثیر یافته DNA در همه

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

نمونه‌ها به‌صورت تک نوار و با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری گردید (لطفی و همکاران، ۱۳۸۹).

جدول ۲: پرایمرهای مورداستفاده در واکنش PCR

پرایمر	توالی
16SF	F:5′AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3′
16SR	R:5′ AAGGTTACCTCACCGACTTC 3′

برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیرشده با PCR (ARDRA[1])

پس از تکثیر قطعه 16s rDNA با پرایمرهای اختصاصی شناسایی اولیه گونه‌ها با استفاده از آنزیم‌های برشی، برش داده شدند. برای هر محصول PCR، دو واکنش هضم به‌طور جداگانه با آنزیم‌های TaqI به عمل آمد. واکنش‌های هضم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام شد. بعد از تکثیر قطعات16s rDNA، به‌منظور انجام هضم آنزیمی ابتدا محصولات تکثیرشده، خالص‌سازی گردید. انجام گرفت (لطفی و همکاران،۱۳۸۹).

ارسال نمونه‌ها برای انجام توالی یابی

بعد از انجام واکنش زنجیره پلیمرازی و تکثیر قطعات 16s rDNA، به‌منظور تشخیص قطعی، محصولات PCR برای انجام توالی یابی به شرکت فضا پژوه ارسال شد. واکنش زنجیره پلیمرازی در حجم ۵۰ میکرو لیتری برای هر ۴ ایزوله انجام و سپس محصولات PCR با استفاده از پروتکل آورده شده در شکل ۲-۲ خالص‌سازی گردید و غلظت محصولات PCR قبل از خالص‌سازی و بعدازآن با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد و همچنین با تعیین جذب نوری در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر (OD_{260}) مشخص و از وجود غلظت موردنیاز (۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتر) برای انجام توالی یابی اطمینان حاصل شد. هر واکنش PCR برای انجام دو واکنش توالی یابی با آغازگرهای مستقیم و معکوس تهیه شدند. هر یک از ۴ محصول PCR در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در حجم‌های ۴۰ میکرو لیتر به همراه دو آغازگر مستقیم و معکوس (با غلظت‌های ۵ پیکومول بر میکرو لیتر) در حجم‌های ۵۰ میکرو لیتر، برای توالی یابی ارسال شدند. در این تحقیق جهت الکتروفورز محصولات، 1kb DNA Ladder محصول شرکت فرمنتاز به‌عنوان سایز مارکر استفاده‌شده است.

نتایج

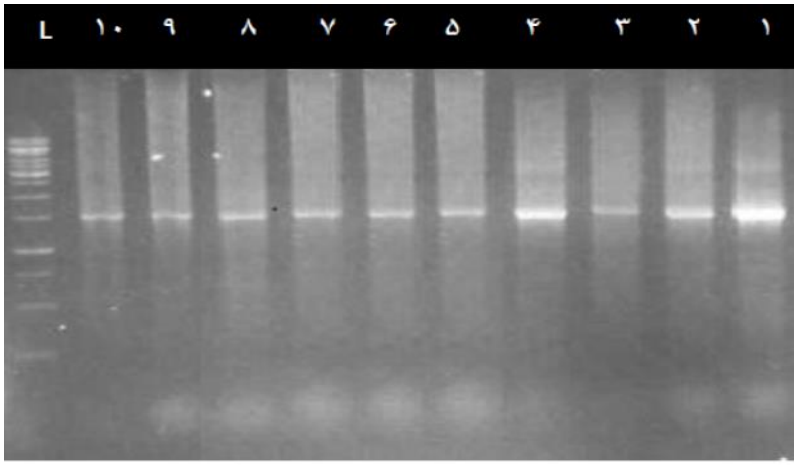
از بین ۴۰ نمونه اخذشده از ماهیان سفید بعد از کشت و بررسی بیوشیمیایی تعداد ۱۰ نمونه به‌عنوان گونه لاکتوباسیلوس جداسازی شدند. چون استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای داشتن اطلاعات بسیار موثق بر روی هویت و تنوع گونه‌های لاکتوباسیل در ماهیان ضرورت دارد (Bucio, 2006). لذا لاکتوباسیل‌های جداشده جهت تائید آزمایش PCR بر روی آن‌ها انجام گرفت؛ که ابتدا DNA نمونه‌ها با استفاده از روشی که ذکر گردید جداسازی گردید. جنس لاکتوباسیل توالی‌های16s rRNA ایزوله‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی جنس لاکتوباسیل، طی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر داده شد (جدول ۲). قطعاتی به‌اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید، در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل شد. همان‌طوری که انتظار

[1] Amplified ribosomal DNA and restriction analysis

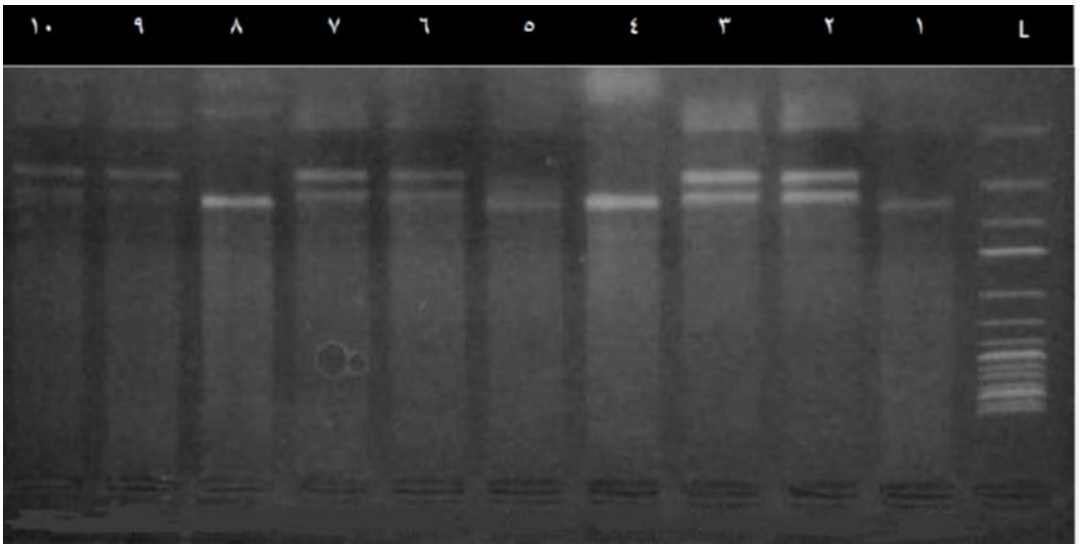
[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

می‌رفت و در شکل ۱ نشان داده‌شده است، محصولات تکثیری با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و به‌صورت تک نوار حاصل شدند. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از 1kb DNA Ladder استفاده شد. لازم به ذکر است که الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در ژل آگارز ۱/۵٪ انجام شد.

به‌منظور اثبات اینکه قطعات تکثیر یافته همان توالی‌های16s rDNA بوده و هم‌چنین مقایسات الگوی برشی ایزوله‌های موردنظر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با آنزیم‌های TaqI برش داده شدند (شکل ۲).



شکل ۱: قطعات تکثیری توالی‌های 16s rDNA ایزوله‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی



شکل ۲- برش محصولات PCRبا آنزیم TagI

بررسی نتایج توالی یابی سویه‌های

پس از تائید اندازه موردنظر به‌منظور توالی یابی چهار نمونه متفاوت به‌دست‌آمده به شرکت ماکروژن کره توسط شرکت فزاپژوه ارسال شد. چهار توالی مربوط به 16s rRNA هر سویه که از تکثیر توالی‌های 16s rRNA با آغازگرهای مستقیم و معکوس حاصل‌شده بود، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Chromos و BLAST (bl2seq) مورد

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و Align شدند. توالی‌های کامل به‌دست‌آمده از Align رشته‌های Plus و Minus با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی از طریق برنامه Blast[1] مقایسه شدند. نتایج توالی یابی در مورد ۳ سویه حاکی از تشابه ۹۹-۹۷٪ توالی‌های موردنظر با توالی‌های ژن‌های 16s rRNA ثبت‌شده در بانک اطلاعاتی برای گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*L. Fermentum*) بود و تنها یک نمونه تشابه ۸۹٪ با گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم داشت که نمونه موردنظر برای توالی یابی به‌صورت پارشیال فرستاده شد؛ و بعد توالی یابی با شماره ژن JQ906262 تحت عنوان Lactobacillus sp. RU1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence در سایت ncbi ثبت شد.

نتایج توالی یابی در مورد باکتری جداشده حاکی از این بودند که این ۳ سویه موردنظر در درون گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم بوده است و یک نمونه به‌عنوان سویه جدید است. این یافته‌ها، مطابق با نتایج به‌دست‌آمده از تست‌های بیوشیمیایی و تعیین الگوی برشی برای این سویه‌ها بودند.

بحث

لاکتوباسیل‌ها برای اولین بار از روده‌ی مارماهی اروپایی (*Anguila anguila*)، سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis*)، ماهی گل قرمز (*Scardinius erithrophtalmus*)، ماهی سوف سربزرگ (*Gymnocephalus cernuus*)، شاه کولی (*Alburnus alburnus*)، سیم نقره‌ای (*Blicca bjoerkna*)، ماهی سر مخروطی آلاند (*leuciscus cephalus*) و اسبله (*Silurus glanis*) و گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) گزارش‌شده است (Juell *et al.*, 2001;,Madsen *et al.*, 2000). لاکتوباسیل‌ها، بخش اصلی میکروفلورای طبیعی روده در برخی از انواع ماهیان از قبیل ماهی کاد (*Gadus morhua*)، Saithe (*Pollachius virens*)، کاپلین (*Mallotus villosus*)، شاه‌ماهی (*Clupea harengus*)، ماهی آزاد گرگ ماهی (*Anarhichas lupus*) است (Jankauskiene, 2002). بیشتر شواهد از گونه‌های سالمون مثل Arctic charr (*Salvelinus alpinus*)، Atlantic salmon (*Salmo salar*) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بوده است (Ringø *et al.*,2000).

طی این بررسی که در بهار سال ۱۳۹۴ انجام گردید از ۳۰ ماهی سفید نمونه‌برداری شده از دریای خزر به دنبال آزمایش‌های بیوشیمیایی که انجام گردید ۱۰ نمونه لاکتوباسیلوس، شناسایی شد. در بررسی Kvasnikov و همکاران (۱۹۹۷) در ماهیان کپور معمولی (*ciprinus carpio*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichtus molitrix*) و سر گنده (*Aristichthus nobilis*)، موجود در محیط رودخانه بود، لاکتوباسیل‌های متداول جداشده شامل: *L.plantarum*، *L.casei*، *L.leichmannil*، *L.acidophilus*، *L.fermenti*، *L.cellobiosus* و *L.buchneri* بودند (Bucio, 2006). در تحقیقی که توسط Ghanbari و همکاران (۲۰۰۹) انجام گردید. تعداد لاکتوباسیل روده ماهی خاویاری ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*) را به ترتیب در محدوده $10^{5/3}$ تا $10^{6/4}$ cfu/g گزارش نمودند. *L. sakei* و *L. plantarum* عمده‌ترین لاکتوباسیل جداسازی شده بود. (Ghanbari, 2009).

[1] **blastn suite**: BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

در تحقیقی که توسط عزیز پور (۲۰۰۹) به‌منظور شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت، ۹٪ از باکتری‌های موجود در محیط کشت باکتریایی تهیه‌شده از محتویات روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و ۸٪ آن‌ها متعلق به جنس اینتروکوکوس بودند. در این آزمایش جنس لاکتوباسیلوس‌های جداشده تا حد گونه طبقه‌بندی شدند. گونه‌های لاکتو باسیل شناسایی‌شده *L. plantarum* بودند. *L. plantarum* باکتری غالب در بین جمعیت‌های باکتری‌های اسیدلاکتیکی بود که از روده جدا گردید که میزان آن ۹٪ بود (Azizpor, 2009)؛ که این مطالعه با یافته‌های فوق مطابقت دارد. تابه‌حال مطالعات کمی لاکتو باسیل‌های موجود در محتوای روده ماهیان آب شیرین را بررسی نموده‌اند (Kvasnikov *et al*., 1977; Cai *et al*., 1999) و بروز لاکتو باسیل‌های متداول همانطوریکه توسط Kandler و Weiss (۱۹۸۶) توصیف‌شده در ماهی و میگو نادر می‌باشند (Kandler and Weiss.1986). با توجه به اینکه تاکنون هیچ‌گونه بررسی در مورد لاکتوباسیل‌های ماهیان سفید موجود در دریای خزر انجام نگرفته است. لذا طی این بررسی، توانستیم لاکتوباسیل را از روده این ماهیان جداسازی نماییم و نتایج توالی یابی در مورد باکتری جداشده حاکی از این بودند که گونه‌های لاکتوباسیلوس موجود متعلق به گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم *L. Fermentum* بوده است و یک نمونه به‌عنوان سویه جدید است. اثرات لاکتوباسیلوس فرمنتوم به‌عنوان باکتری مفید که باعث کاهش عفونت، بهبود ظرفیت انتی اکسیدانی و بهبود وضعیت سیستم ایمنی می‌شود مشخص‌شده است (Sharma, *et al* 2014).

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. خیابانی، ع.، ۱۳۸۶. پروبیوتیک‌ها و مکانیسم عملکرد آن‌ها در آبزیان. مقطع کارشناسی ارشد رشته بیولوژی ماهیان دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۸۰-۷۰.

۲. رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۴. ماهی سفید. وزارت جهاد سازندگی، موسسه تحقیقات آموزش و شیلات ایران. صفحات ۱۶۰-۲.

۳. زمان زاد، ص.، ۱۳۸۴. تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدیفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدو باکتریوم و استرپتوکوکوس فائکیوم بر عملکرد نیمچه های گوشتی نر و ماده، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، پایان‌نامه کارشناسی ارشد۱۲-۸.

۴. شیوا زاد، م.، صیداوی، ع.، ۱۳۸۳. زیست‌فراهمی مواد مغذی(اسیدهای‌امینه، موادمعدنی و ویتامین‌ها) در حیوانات، (ترجمه) انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول، ۵۹-۵۵.

۵. لطفی، ح.، حجازی، م.ا.، ملکی زنجانی، ب.، برزگری، ا.، ۱۳۸۹. جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های با پتانسیل

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب، مجله پژوهش‌های صنایع غـذایی. ۳(۲۰)، ۱۷-۱.

۶. وثوقی، غ.، مستجیر، ب.، ۱۳۸۱.ماهیان آب شیرین، انتشارات دانشگاه تهران. چاپ پنجم، ۲۵۲-۲۴۷.

7. Azizpour, K. 2009. Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west Azarbaijan, Iran. Research Journal of Biological Science, 4 (3), 324-326.
8. Balcázara, J. l. Vendrella, D., Blasa, I.D., Ruiz-Zarzuelaa, I., Muzquiza, J. L. and Gironesa, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 278 (1-4), 188-191.
9. Bucio Galindo, A., Hartemink, R., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J. and Rombouts F.M. 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiol, 23, 476 -482.
10. Cai, Y.M., 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. The Journal of General and Applied Microbiology, 45(4), 177- 184.
11. Cowan, M.K., 2011. Microbiology: A Systems Approach. Published by: SEM. 3rd editions, 63.
12. Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer and E. Stackebrandt. 2006. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. Springer Science and Business Media Inc. Singapore.
13. Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, H. Stackebrandt E, Editors. 2006. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. NewYork: Springer, 320-404.
14. Fuller, R. Probiotics in man and animals. 1989. Journal of Applied Bacteriology, 66, 365-378.
15. Ghanbari, M., Rezari, 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) 27,152-157.
16. Gonzalez, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez, M.L., Otero, A.2000.Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. Food Microbiology, 17, 383-391.
17. Havenaar, R., Ten Brink, B., and Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R (Ed.), Probiotics: the scientific basis. (1st Edn.), London, Chapman and Hall, 209-224.
18. Jankauskiene, R. 2002. Defence mechanisms in fish: frequency of the genus Lactobacillus bacteria in the intestinal tract microflora of carps. Biologija, 2 , 13-16.
19. Juell, J.E. and Lekang, O.I. 2001. The effect of feed supply rate on growth of juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *Aquaculture Research*, 32, 459-464.
20. Kandler, O., and Weiss, N., 1986. GenusLactobacillus beijerinck 1901, 212AL.In: Sneath, PHA; Mair, NS; Sharpe, ME andHolt, JG (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209-1234.
21. Kvasnikov, E.I., Kovalenko, N.K. and Materinskaya, L.G. 1977. Lactic acid bacteria of freshwater fish. Mikrobiologiya ,46, 619-624 .
22. Madsen, H.C.K., Buchmann, K., Mellergaard, S. 2000. Treatment of trichodiniasis in eel *Anguilla anguilla* reared in recirculation systems in Denmark: alternatives to formaldehyde. Aquaculture, 186, 221–231.
23. Mikelsaar, M. and Zilmer, M. 2009. Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. Microbial Ecology in Health and Disease, 21 (1),1-27.
24. Ringø, E., Bendiksen, H.R., Wesmajervi, M.S., Olsen, R.E., Jansen, P.A. and Mikkelsen, H. 2000. Lactic acid bacteria

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]

associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Journal of Applied Microbiology, 89, 317-322.

25. Sharma R., Kapila, R., Kapasiya, M., Saliganti, V., Dass, G. and Kapila, S. 2014. Dietary supplementation of milk fermented with probiotic Lactobacillus fermentum enhances systemic immune response and antioxidant capacity in aging mice. Nutrition Research, 34 (11), 968-981.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-24]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.1.8.2]