

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

پویا خوش‌خیال صابر^۱، سید جاوید مرتضوی تبریزی^{۱*}

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

تاریخ پذیرش: ۲۴ مهر ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۵ مرداد 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 ضد میکروبی، 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 به صورت تصادفی از دریای خزر گردید. سپس نمونه‌ها تحت شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد تبریز منتقل و بعد از بررسی فنوتیپیکی و بیوشیمیایی، ۱۰ نمونه لاکتوباسیل مورد نظر برای تشخیص گونه‌ها بر اساس ساختار مولکولی ژن 16 srDNA، اقدام به استخراج DNA و شناسایی لاکتوباسیل‌ها با پرایمر اختصاصی نموده و سپس به منظور شناسایی اولیه گونه‌ها از آنزیم برشی Taq1 استفاده گردید. سپس ۳ نمونه متفاوت به منظور تشخیص قطعی جهت توالی‌یابی ارسال گردید. نتایج توالی‌یابی حاکی از تشابه ۹۹-۹۷٪ توالی‌های مورد نظر با توالی‌های ژن‌های 16 SrDNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی برای گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم بود و تنها یک نمونه تشابه ۸۹٪ با گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*Lactobacillus Fermentum*) داشت که نمونه مورد نظر برای توالی‌یابی به صورت پارشیال فرستاده شد و بعد توالی‌یابی 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

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 اردیبهشت ماه هنگامی که 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 می‌شود (و ثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹). پراکنندگی 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 به مراتب 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). لاکتوباسیل‌ها دارای نقش اکولوژیکی مهمی در دستگاه گوارش می‌باشند که شامل: تولید

مواد ضد میکروبی، افزایش پاسخ سیستم ایمنی، افزایش قابلیت دسترسی مواد مغذی و استفاده از برخی از کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم است (Fuller, 1989; Havenaar et al., 1992). به عنوان مثال لاکتوباسیل‌های اسیدوفیل، ارگانسیم‌های تخمیری هستند که اسیدلاکتیک تولید می‌نمایند تا تعادل اسید را در روده تثبیت نمایند. طیف گسترده‌ای از ارگانسیم‌های 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 محدود شده 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 حد اکثر مقدار، بالا می‌رود (خیابانی، ۱۳۸۶ و زمان زاد ۱۳۸۴). لاکتوباسیل‌ها 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 پلانترام 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 مشخص شده 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.

مواد و روش‌ها

طی این بررسی تعداد ۴۰ قطعه ماهی سفید به صورت تصادفی صید شد. سپس نمونه‌ها تحت شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل و بعد از تشریح با رعایت اصول استریل، ۱ گرم از محتویات مدفوع از قسمت یک سوم 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 جاربیه‌های با گاز پک نوع C به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. بعد از این 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 گرمخانه‌گذاری 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 آمیزی گرم و منفی بودن تست حرکت، پرگنه به عنوان لاکتوباسیل احتمالی شناسایی گردیدند (Dworkin, et al. 2006).

برای تأیید لاکتوباسیل بودن نمونه‌های خالص محیط کشت OF نتیجه F در محیط، حرکت منفی، کشت در محیط گلوکز برات با لوله درهم 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 تیره هالوز، هیدرولیز

اسکولین و آرژنین انجام گردید (Dworkin, et al., 2006). نتایج بر اساس جدول زیر مطابقت داده شده و نتایج حاصله ثبت و مورد بررسی بعدی قرار گرفتند (جدول ۱).

استخراج DNA از نمونه‌های ۲۴ ساعته کشت داده شده 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 به منظور 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 ویال‌های دیگر منتقل و هم‌حجم آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل با نسبت‌های ۱:۲۴ به آن اضافه شد و به آرامی تکان داده شد. سپس دو فاز تشکیل شده 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

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

جدول ۱: تشخیص گونه های 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	-	-	-	-	-	+	+	+	d	-
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 ارژنین	-	+	d	-	-	-	-	+	+	+
۱- lactobacillus acidophilus										
۲- lactobacillus jensenii										
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 زنجیره ای پلی مراز و تکثیر

قطعه 16s rRNA PCR

یا واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرو لیتر، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در سطح جنس برای ایزوله ها انجام گرفت (جدول ۲). واکنش زنجیره پلیمرازی با چرخه های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه

سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و سی ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه های تکثیر یافته به نسبت ۶ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل موردنظر توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و نوارهای تکثیر یافته DNA در همه

نمونه‌ها به صورت 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 مورد استفاده در واکنش PCR

توالی	پرایمر
16SF F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	
16SR R: 5'AAGGTTACCTCACC GACTTC 3'	

برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیر شده با PCR (ARDRA)

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 به طور 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 قطعات 16s rDNA، به منظور انجام هضم آنزیمی ابتدا محصولات تکثیر شده، 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، به منظور 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

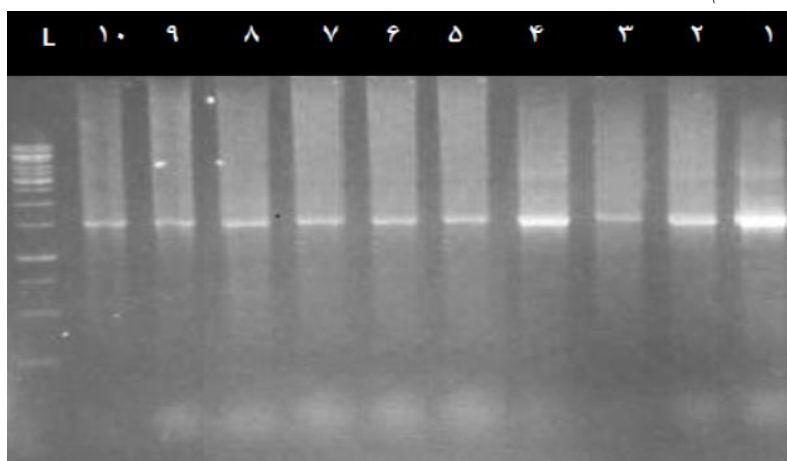
خالص‌سازی گردید و غلظت محصولات PCR قبل از خالص‌سازی و بعد از آن با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد و همچنین با تعیین جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر (OD₂₆₀) مشخص و از وجود غلظت مورد نیاز (۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتر) برای انجام توالی یابی اطمینان حاصل شد. هر واکنش PCR برای انجام دو واکنش توالی یابی با آغازگرهای مستقیم و معکوس تهیه شدند. هر یک از ۴ محصول PCR در تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری 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 فرمتاز به عنوان سایز مارکر استفاده شده است.

نتایج

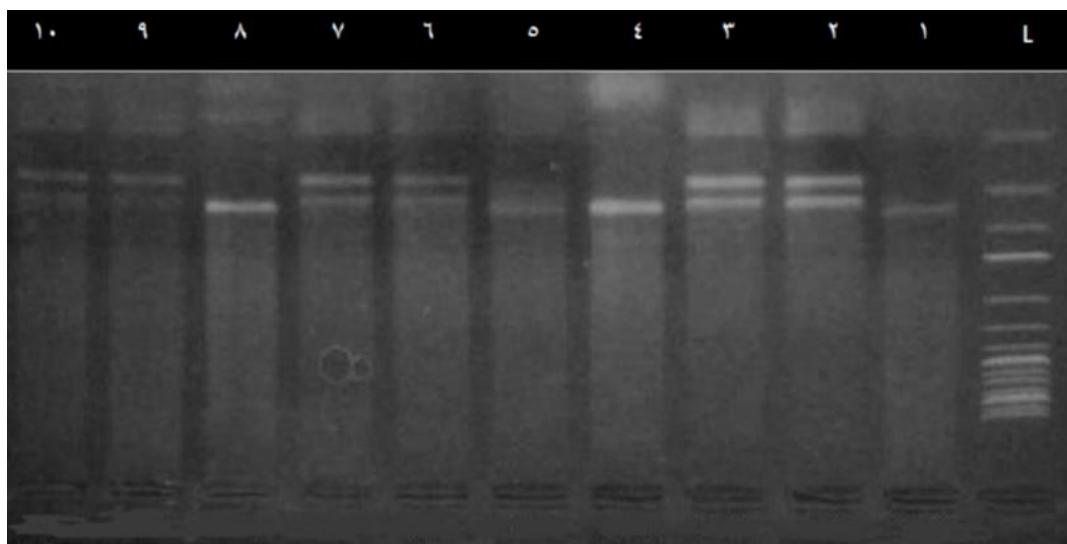
از بین ۴۰ نمونه اخذ شده از ماهیان سفید بعد از کشت و بررسی بیوشیمیایی تعداد ۱۰ نمونه به عنوان گونه لاکتوباسیلوس جداسازی شدند. چون استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای داشتن اطلاعات بسیار موثق بر روی هویت و تنوع گونه‌های لاکتوباسیل در ماهیان ضرورت دارد (Bucio, 2006). لذا لاکتوباسیل‌های جدا شده جهت تأیید آزمایش PCR بر روی آن‌ها انجام گرفت؛ که ابتدا DNA نمونه‌ها با استفاده از روشی که ذکر گردید جداسازی گردید. جنس لاکتوباسیل توالی‌های 16s rRNA ایزوله‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی جنس لاکتوباسیل، طی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تکثیر داده شد (جدول ۲). قطعاتی به اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید، در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرز حاصل شد. همان‌طوری که انتظار

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

به منظور اثبات اینکه قطعات تکثیر یافته همان توالی‌های 16s rDNA بوده و هم‌چنین مقایسات الگوی برشی ایزوله‌های موردنظر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با آنزیم‌های TaqI برش داده شدند (شکل ۲).



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



شکل ۲- برش محصولات PCR با آنزیم TaqI

بررسی نتایج توالی‌یابی سویه‌های

پس از تأیید اندازه موردنظر به منظور توالی‌یابی چهار نمونه متفاوت به دست آمده به شرکت ماکروژن کره توسط شرکت فراپژوه ارسال شد. چهار توالی

مربوط به 16s rRNA هر سویه که از تکثیر توالی‌های 16s rRNA با آغازگرهای مستقیم و معکوس حاصل شده بود، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Chromos و BLAST (bl2seq) مورد

Juell et al.,) گزارش شده است (*gariepinus*) 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 Atlantic charr (*Salvelinus alpinus*)، Ringø et al., 2000) (*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 (*Cyprinus carpio*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و سرگنده (*Aristichthys nobilis*)، موجود در محیط رودخانه بود، لاکتوباسیل‌های متداول جدا شده شامل: *L. plantarum*، *L. casei*، *L. leichmannii* و *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 فیل ماهی (*Huso huso*) را به ترتیب در محدوده $10^{5/3}$ تا $10^{6/4}$ cfu/g گزارش نمودند. *L. plantarum* و *L. sakei* عمده‌ترین لاکتوباسیل جداسازی شده بود. (Ghanbari, 2009).

تجزیه و تحلیل قرار گرفت و Align شدند. توالی‌های کامل به دست آمده از Align رشته‌های Plus و Minus با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی از طریق برنامه Blast^۱ مقایسه شدند. نتایج توالی یابی در مورد ۳ سویه حاکی از تشابه ۹۹-۹۷٪ توالی‌های مورد نظر با توالی‌های ژن‌های 16S rRNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی برای گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم (L. *Fermentum*) بود و تنها یک نمونه تشابه ۸۹٪ با گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم داشت که نمونه مورد نظر برای توالی یابی به صورت 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 جدا شده حاکی از این بودند که این ۳ سویه مورد نظر در درون گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم بوده است و یک نمونه به عنوان سویه جدید است. این یافته‌ها، مطابق با نتایج به دست آمده از تست‌های بیوشیمیایی و تعیین الگوی برشی برای این سویه‌ها بودند.

بحث

لاکتوباسیل‌ها برای اولین بار از روده‌ی مارماهی اروپایی (*Anguilla anguilla*)، سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis*)، ماهی گل قرمز (*Scardinius erithrophthalmus*)، ماهی سوف سربرزرگ (*Gymnocephalus cernuus*)، شاه کولی (*Alburnus alburnus*)، سیم نقره‌ای (*Blicca bjoerkna*)، ماهی سر مخروطی آلاند (*leuciscus cephalus*) و اسبله (*Silurus glanis*) و گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias*)

^۱ blastn suite: BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query.

ایمنی می شود مشخص شده است (Sharma, et al 2014).

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. خیابانی، ع.، ۱۳۸۶. پروبیوتیک ها و مکانیسم عملکرد آن ها در آبزیان. مقطع کارشناسی ارشد رشته بیولوژی ماهیان دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۷۰-۸۰.
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، پایان نامه کارشناسی ارشد ۱۲-۸.
۴. شیوا زاد، م.، صیداوی، ع.، ۱۳۸۳. زیست فراهمی مواد مغذی (اسیدهای آمینه، مواد معدنی و ویتامین ها) 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 باکتری های با پتانسیل

در تحقیقی که توسط عزیز پور (۲۰۰۹) به منظور شناسایی بیوشیمیایی باکتری های اسیدلاکتیک موجود در ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان انجام گرفت، ۹٪ از باکتری های موجود در محیط کشت باکتریایی تهیه شده از محتویات روده ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان بالغ متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و ۸٪ آن ها متعلق به جنس اینتروکوکوس بودند. در این آزمایش جنس لاکتوباسیلوس های جدا شده تا حد گونه طبقه بندی شدند. گونه های لاکتوباسیل شناسایی شده *L. plantarum* بودند. *L. plantarum* باکتری غالب در بین جمعیت های باکتری های اسیدلاکتیکی بود که از روده جدا گردید که میزان آن ۹٪ بود (Azizpor, 2009)؛ که این مطالعه با یافته های فوق مطابقت دارد. تا به حال مطالعات کمی لاکتوباسیل های موجود در محتوای روده ماهیان آب شیرین را بررسی نموده اند (Kvasnikov et al., 1977; Cai et al., 1999) و بروز لاکتوباسیل های متداول همانطوریکه توسط Kandler و Weiss (۱۹۸۶) توصیف شده در ماهی و میگو نادر می باشند (Kandler and Weiss, 1986). با توجه به اینکه تاکنون هیچ گونه بررسی در مورد لاکتوباسیل های 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 جدا شده حاکی از این بودند که گونه های لاکتوباسیلوس موجود متعلق به گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم *L. Fermentum* بوده است و یک نمونه به عنوان سویه جدید است. اثرات لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان باکتری مفید که باعث کاهش عفونت، بهبود ظرفیت انتی اکسیدانی و بهبود وضعیت سیستم

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. Genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, 212AL.In: Sneath, PHA; Mair, NS; Sharpe, ME and Holt, 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., Møllergaard, 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 پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب، مجله پژوهش‌های صنایع غذایی. 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. I. Vendrella, D., Blasa, I.D., Ruiz-Zarzuella, 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.

- 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.