

(OPEN ACCESS)

Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic properties from the intestines of Caspian sea white fish (*Rutilus frissi kutum*)

Seyed Hossein Hoseinifar^{*1}, Seyed Morteza Hoseini², Ali Taheri Mirghaed³,
Melika Ghelichpour⁴, Hesamaddin Shirzad-Aski⁵, Hien Van Doan⁶,
Ehab El-Haroun⁷, Roghieh Safari⁸, Majid Khanzadeh⁹

1. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hoseinifar@gau.ac.ir
2. Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran. E-mail: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com
3. Dept. of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: mirghaed@ut.ac.ir
4. Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran. E-mail: m.ghelichpour@ut.ac.ir
5. Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. E-mail: shirzad.hessam1364@gmail.com
6. Dept. of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand and Functional Feed Innovation Center (FuncFeed), Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. E-mail: hien.d@cmu.ac.th
7. Fish Nutrition Research Laboratory, Dept. Animal Production, Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo, Egypt. E-mail: elharoun@kysu.edu
8. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com
9. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran and Animal Biological Product Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran Organization, Tehran, Iran. E-mail: majidkhanzadeh92@yahoo.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 08.10.2024

Revised: 08.12.2024

Accepted: 08.13.2024

Keywords:

Lactic acid bacteria,

Probiotic,

Rutilus frissi kutum

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are part of the typical intestinal flora of many fish. The aim of this research was to isolate and identify lactic acid bacteria with probiotic potential from adult Caspian white fish. For this purpose, 30 pieces of adult white fish were caught from the Caspian Sea and sterile samples were taken from their intestines. The isolated lactic acid bacteria were isolated and purified by phenotypic (gram staining, biochemical tests) and molecular methods. Then these bacteria were evaluated based on salinity, pH, temperature and antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri*. Following specialized tests, including cultivation in a MacConkey, MRS medium, and various pH levels, this number was reduced to 9 confirmed strains. The probiotic potential of the remaining 9 bacteria was assessed at temperatures of 4, 20, and 40 °C, as well as at salinities of 1%, 2%, 3%, and 4%. Additionally, their antibacterial activity against *A. hydrophila* and *Y. ruckeri* were evaluated. Ultimately, after performing tests to evaluate probiotic potential, four isolates such as *Aerococcus*, *Pediococcus pentosaceus* (two isolates), and

Lactococcus plantarum demonstrated the highest probiotic effectiveness compared to the other isolates.

Cite this article: Hoseinifar, Seyed Hossein, Hoseini, Seyed Morteza, Taheri Mirghaed, Ali, Ghelichpour, Melika, Shirzad-Aski, Hesamaddin, Van Doan, Hien, El-Haroun, Ehab, Safari, Roghieh, Khazadeh, Majid. 2026. Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic properties from the intestines of Caspian sea white fish (*Rutilus frissi kutum*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (1), 111-124.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2024.22701.1895

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با ویژگی پروبیوتیکی از روده ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frissi kutum*)

سید حسین حسینی فر^{۱*}، سید مرتضی حسینی^۲، علی طاهری میرقائد^۳، ملیکا قلیچ پور^۴، حسام‌الدین شیرزاد اسکی^۵، هین ون دوان^۶، ایهاب ال هارون^۷، رقیه صفری^۸، مجید خان‌زاده^۹

۱. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hoseinifar@gu.ac.ir
۲. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان، ایران. رایانامه: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com
۳. گروه بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: mirghaed@ut.ac.ir
۴. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان، ایران. رایانامه: m.ghelichpour@ut.ac.ir
۵. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: shirzad.hessam1364@gmail.com
۶. گروه علوم جانوری و آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه چیانگ مای، چیانگ مای، تایلند و مرکز نوآوری خوراک عملکردی (FuncFeed)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه چیانگ مای، چیانگ مای، تایلند. رایانامه: hien.d@cmu.ac.th
۷. آزمایشگاه تحقیقات تغذیه ماهی، گروه تولیدات دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه قاهره، قاهره، مصر. رایانامه: elharoun@kysu.edu
۸. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com
۹. گروه پژوهشی فرآورده‌های بیولوژیک دامی، سازمان جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران. رایانامه: majidkhanzadeh92@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	باکتری‌های اسید لاکتیک بخشی از فلور نرمال روده بسیاری از ماهیان هستند. هدف از این
مقاله کامل علمی- پژوهشی	پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با توان پروبیوتیکی از ماهی سفید
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰	خزری (<i>Rutilus frissi kutum</i>) بالغ بود. بدین‌منظور تعداد ۳۰ قطعه ماهی بالغ سفید از دریای
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۲	خزر صید و از روده آن‌ها به صورت استریل نمونه‌برداری شد. باکتری‌های اسید لاکتیک جدا
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳	شده توسط روش‌های فنوتیپی (رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی) و مولکولی جداسازی و
	خالص‌سازی شدند. سپس این باکتری‌ها بر اساس شاخص‌های شوری، pH، دما و فعالیت
	ضدباکتریایی علیه <i>Aeromonas hydrophila</i> و <i>Yersinia ruckeri</i> (مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ۵۶ جدایه ۲۲ باکتری مشکوک به باکتری‌های

واژه‌های کلیدی:

باکتری‌های اسید لاکتیک،
پروبیوتیک،
ماهی سفید خزری

اسید لاکتیک بودند که پس از آزمایش‌های تخصصی مانند کشت در محیط مک‌کانکی، MRS و pHهای مختلف به ۹ باکتری کاهش یافت. برای ارزیابی توان پروبیوتیکی ۹ باکتری باقی‌مانده در دماهای ۴، ۲۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، شوری ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد و فعالیت ضد باکتریایی علیه *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در انتها پس از انجام آزمایش‌های توان پروبیوتیکی، ۴ جدایه مانند *آئروکوکوس (Aerococcus)*، *پدیکوکوس پنتاسئوس (Pediococcus pentosaceus)* (۲ جدایه) و *لاکتوکوکوس پلانتاروم (Lactococcus plantarum)* بیش‌ترین توان پروبیوتیکی نسبت به سایر جدایه‌ها را داشتند.

استناد: حسینی‌فر، سید حسین، حسینی، سید مرتضی، طاهری میرقاند، علی، قلبچ‌پور، ملیکا، شیرزاد اسکی، حسام‌الدین، ون دوان، هین، ال هارون، ایهاب، صفری، رقیه، خان‌زاده، مجید (۱۴۰۵). جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با ویژگی پروبیوتیکی از روده ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frissi kutum*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۵ (۱)، ۱۲۴-۱۱۱.

Doi: 10.22069/japu.2024.22701.1895



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

باکتری‌های مضر سلامت روده را بهبود می‌بخشند و به گونه‌های مفید اجازه رشد می‌دهند. آن‌ها سیستم ایمنی را تحریک کرده و تولید اسید لاکتیک را افزایش می‌دهند و آمین‌های سمی را کاهش می‌دهند که منجر به جذب بهتر اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها می‌شود (۶). علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها فلور میکروبی روده را بازسازی و تقویت می‌کنند و از طریق بهبود دسترسی به مواد مغذی ضروری، به رشد آبزیان کمک می‌کنند. پروبیوتیک‌ها همچنین جذب کلسیم، سنتز ویتامین، تعادل میکرو فلور روده، جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب را افزایش و سطح کلاسترول را کاهش می‌دهند (۷). بنابراین، پروبیوتیک‌ها را می‌توان به عنوان یک افزودنی مناسب در جیره های غذایی آبزیان برای افزایش قابلیت هضم کربوهیدرات‌های پیچیده استفاده کرد (۸).

با توجه به مزایای یاده شده توسط پروبیوتیک‌ها، امروزه جداسازی باکتری‌های مفید از جوامع پیچیده و بزرگ میکروبی بسیار رایج شده است. در حال حاضر، پروبیوتیک‌ها در درمان بالینی و حفظ تعادل جوامع میکروبی روده در ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در این میان باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل ارزش بالا برای جداسازی مناسب هستند (۹).

ماهی سفید خزری (*Rutilus frisii kutum*) یکی از گونه‌های بومی دریای خزر و گونه‌ای از کپور ماهی‌های در دریای خزر است. این ماهی به دلیل داشتن گوشت مناسب و طعم عالی بازارپسندی مناسبی دارد و به یکی از محبوب‌ترین ماهی‌ها برای صید تبدیل شده است (۱۰). از آنجایی که ماهی سفید خزری در لیست انقراض ماهیان دریای خزر قرار دارد، برای تکثیر و ذخیره‌سازی مجدد در دریای خزر، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند باعث افزایش میزان بقا، تقویت سیستم ایمنی در مواجهه با محیط چالش برانگیز دریا شود (۱۱). هدف از این پژوهش ارزیابی

تشدید شیوه‌های پرورش ماهی‌ها منجر به افزایش مشکلات مربوط به استرس و بیماری‌های آبزیان و به دنبال آن مرگ و میر قابل توجه و زیان اقتصادی قابل توجهی برای تولیدکنندگان آبی پروری شده است. اهمیت پرداختن به استرس و مشکلات بیماری در پرورش ماهی با این واقعیت افزایش می‌یابد که آبی پروری منبع اولیه محصولات آبی برای مصرف انسان است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ تقریباً دو سوم تولید جهانی را تشکیل دهد (۱). رشد پیش‌بینی شده آبی پروری به عنوان منبع اولیه محصولات آبی، همراه با ضرورت توسعه شیوه‌های پایدار، بر ضرورت پژوهش در مورد درمان‌های جدید برای بیماری‌های عفونی ماهی تأکید می‌کند. شیوع بیماری در مزارع پرورش ماهی یک مانع بزرگ برای غلبه بر آن است و کشف راه‌حل‌های درمانی مؤثر در تضمین دوام و پایداری طولانی مدت صنعت آبی پروری بسیار مهم خواهد بود (۲). از سوی دیگر، آنتی‌بیوتیک‌ها و شیمی‌درمانی برای جلوگیری از مسائل زیست‌محیطی در مورد ظهور باکتری‌های مقاوم به دارو ممنوع یا محدود شده‌اند (۳). در این میان، تجویز رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها به عنوان یک مکمل غذایی امیدوارکننده برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد شده است. به طور رایج، پروبیوتیک‌های تجاری در آبی پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). با این حال، با توجه به تفاوت در شرایط فیزیولوژیکی، اکولوژی میکروبی روده و محیط کشت، پروبیوتیک‌های تجاری همیشه کاربردی نبوده‌اند. براساس این واقعیت، دانشمندان بر جداسازی و تجویز پروبیوتیک‌های مرتبط با میزبان بیش از پیش تأکید کردند، که به پروبیوتیک‌ها این اجازه را می‌دهد تا بهتر با شرایط محیط و شرایط فیزیولوژیکی میزبان سازگار شوند (۵). پروبیوتیک‌ها با از بین بردن

کمی و کیفی باکتری‌های مفید روده ماهی سفید خزری می‌باشد که توانایی بالقوه پروبیوتیکی دارند.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک: برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از روده ماهیان از روش مریفلد و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی اصلاح استفاده شد (۱۲). برای این منظور ماهیان بالغ سفید دریای خزر بلافاصله پس از صید از دریا (تعداد ۳۰ قطعه ماهی به وزن تقریبی ۱/۵ کیلوگرمی در ۵ مرحله نمونه‌برداری) به کمک جعبه حاوی یخ به آزمایشگاه (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) منتقل شدند. پس از ضدعفونی سطح شکمی ماهی‌ها با الکل ۷۰ درصد، در شرایط استریل اقدام به باز کردن شکم ماهی، جدا نمودن روده، بازگشایی و تخلیه محتویات آن و سپس شستشوی سه مرحله‌ای سطح داخلی روده شد. سپس کل روده‌ها وزن شده و حدود ۱۰ گرم روده با حدود ۱۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی همگن شدند و سه رقت تهیه شد. پس از تهیه رقت‌های موردنظر، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط کشت اختصاصی جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک (MRS)، کشت شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت در شرایط بی‌هوای گرم خانه‌گذاری شدند. پس از ۹۶ ساعت تعداد ۵۶ جدایه بر روی محیط کشت رشد کرده بودند. از این تعداد ۱۶ جدایه از رده مخمرها بودند که از پژوهش کنار گذاشته شدند. پس از کشت مجدد جدایه‌های مشکوک به باکتری‌های اسید لاکتیک، رنگ‌آمیزی گرم جهت اطمینان از خالص بودن باکتری‌ها و همچنین بررسی مورفولوژی انجام باکتری‌ها شد.

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها به شیوه برون‌تنی (*in vitro*): برای ارزیابی توان پروبیوتیکی

جدایه‌ها از رفتار رشد باکتری‌ها در شرایط محیطی مختلف شامل شوری و درجه حرارت از روش وو و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد (۱۳). برای بررسی رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در ۳ دمای متفاوت (۴، ۲۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و رفتار رشد آن‌ها رفتار رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در شوری‌های مختلف (۱، ۲، ۳ و ۴ درصد) با استفاده از NaCl، انجام شد.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی: برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌ها علیه *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* از روش توصیه شده توسط دوو و همکاران (۲۰۰۴) با اندکی تغییر استفاده شد (۱۴). در ابتدا باکتری‌های بیماری‌زا در محیط برات در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و پس از آن مقدار ۲ درصد از کشت فوق به محیط BHI آگار نیمه مذاب در دمای ۴۵ درجه اضافه گردیدند و با روش پورپلیت مخلوط شدند و به مدت ۲ ساعت در محیط آزمایشگاه باقی‌مانده تا پلیت‌ها خشک شده و اقدام به حفره چاهک شود. پس از حفر چاهک توسط سر سملپر آبی رنگ، باکتری‌های اسیدلاکتیکی که در محیط کشت MRS به مدت یک شب (Overnight) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شده بودند نیز پس از سانتریفیوژ شدن به مقدار ۳۰ میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته و گرم‌خانه‌گذاری شدند تا قطر هاله عدم رشد محاسبه شوند. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه، هاله عدم رشد سویه‌ها اندازه‌گیری شدند.

شناسایی گونه باکتری‌های لاکتوباسیلی به دست آمده از مطالعات بیوشیمیایی به شیوه مولکولی: در ابتدا DNA باکتری‌های موردنظر توسط روش فنل کلروفورم-لیزوزیم استخراج گردیدند و خلوص آن‌ها توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد (۱۵). در ادامه برای انجام آزمایش PCR از یک جفت پرایمر عمومی باکتری‌ها برای شناسایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس

تأیید بر اساس کیفیت خوانش تریم شدند و آن ناحیه توسط نرم‌افزار MegaX بررسی گردیدند. سپس با استفاده از وب سایت NCBI-BLAST همپوشانی هر سکانس با داده بانک جهانی بررسی شده و جنس احتمالی تشخیص داده شد.

برای تکثیر ژن 16S rRNA به شرح زیر استفاده شد (جدول ۱). پس از بررسی نتایج PCR بر روی ژل الکتروفورز نمونه‌ها جهت تعیین توالی به صورت دوطرفه به شرکت مام ژن در تهران ارسال گردیدند. پس از انجام تعیین توالی، ابتدا خوانش‌های خام توسط نرم‌افزار Chromas بررسی شدند. نواحی مورد

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص باکتری‌های اسید لاکتیک.

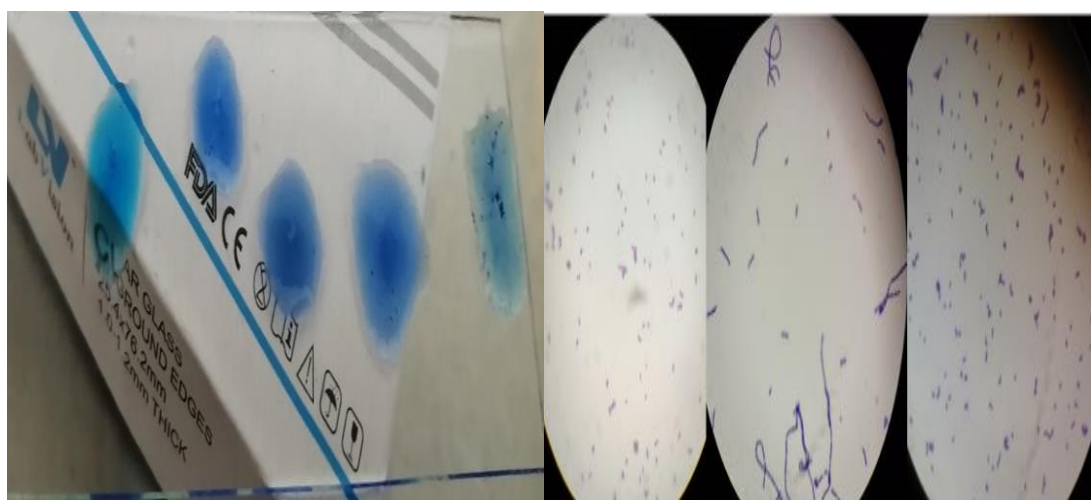
Table 1. Primers used to identify LAB.

ردیف نوکلئوتیدی پرایمر Primer sequence	نام پرایمر Primer name
1492r: 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	16 S rRNA R
27f: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	16 S rRNA F

مرحله کشت خطی انجام داده شد تا به باکتری خالص رسیده و آزمایش‌های مربوطه آغاز گردند. در این مرحله ۲۸ باکتری باقی‌مانده جهت بررسی قدرت تولید کاتالاز بررسی شدند و ۶ باکتری دیگر نیز حذف شدند (شکل ۱).

نتایج

از ۵۶ باکتری کشت داده شده به تعداد ۴۰ جدایه بر اساس شکل ظاهری (جدایه‌های کرم رنگ یک تا دو میلی‌متری و مشکوک به باکتری‌های لاکتوباسیل) و ۲۸ باکتری براساس رنگ‌آمیزی گرم برای ادامه پژوهش انتخاب شدند (شکل ۱). در انتها مجدداً دو



شکل ۱- رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز جهت تأیید خلوص جدایه‌ها.

Figure 1. Gram staining and catalase test to confirm the purity of isolates.

جهت اطمینان از ۲۲ جدایه باقی‌مانده در جنس باکتری‌های اسید لاکتیک آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه مانند رشد در محیط مک کانکی، رشد در محیط کشت مایع (MRS) در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۴/۴ و ۹/۶ انجام شد. نتایج آزمایش‌ها برای ۲۲ جدایه در جدول ۲ آورده شده است (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمیایی جهت تفکیک باکتری‌های اسید لاکتیک.

Table 2. Results of biochemical tests for the separation of lactic acid bacteria.

pH ۹/۴	pH ۴/۴	MRS ۴۵ °C	MRS ۱۵ °C	مک کانکی آگار MacConkey Agar	سویه‌ها Strains
+	+	+	+	+	1
-	-	-	-	-	2
-	+	+	+	+	3
+	+	+	+	+	4
+	-	-	-	+	5
+	+	+	+	-	6
+	+	-	+	+	7
-	-	+	+	+	8
+	+	+	+	+	9
-	-	-	-	-	10
+	+	+	+	+	11
-	-	-	+	-	12
-	-	-	+	-	13
+	+	+	+	+	14
+	-	-	+	-	15
+	+	+	+	+	16
-	-	+	+	+	17
+	+	+	+	+	18
+	+	-	+	-	19
-	-	+	+	+	20
+	+	+	+	+	21
+	+	+	+	+	22

محیط اسیدی و یا قلیایی نبودند. در مجموع تعداد ۱۳ باکتری حذف شده و ۹ باکتری جهت بررسی توان پروبیوتیکی انتخاب شده و مورد آزمایش قرار گرفتند.

با توجه به جدول ۲ پس از بررسی تست‌های فوق تعداد ۷ جدایه قادر به رشد در دمای ۱۵ و یا ۴۵ درجه سانتی‌گراد نبودند. به علاوه ۶ جدایه در محیط مک کانکی رشد نکرده و ۹ جدایه نیز قادر به رشد در

با توجه به جدول ۳، نتایج رشد یا عدم رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در درجه‌ها و شوری‌های مختلف نمایش داده شده است. پس از بررسی‌های انجام شده ۴ باکتری حذف و ۵ باکتری برای تجزیه و تحلیل بیش‌تر انتخاب شدند. باکتری منتخب پس از ارزیابی نتایج به شرح ذیل می‌باشند (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج رشد یا عدم رشد باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی سفید به منظور بررسی توان پروبیوتیکی.

Table 3. Results of growth or lack of growth of lactic acid bacteria isolated from the intestines of white fish to investigate probiotic potency.

شوری ۴ درصد Salinity 4%	شوری ۳ درصد Salinity 3%	شوری ۲ درصد Salinity 2%	شوری ۱ درصد Salinity 1%	دمای ۴۰ درجه Temperature 40 °C	دمای ۲۰ درجه Temperature 20 °C	دمای ۴ درجه Temperature 4 °C	سویه‌ها Strains
+	+	+	+	+	+	+	1
-	-	+	+	+	+	-	4
+	+	+	+	+	+	+	9
+	+	+	+	+	+	+	11
-	-	+	+	+	+	-	14
+	+	+	+	+	+	+	16
-	-	+	+	+	+	-	18
-	-	+	+	+	+	+	21
+	+	+	+	+	+	+	22

هم‌چنین چهار جدایه در این بین نیز هاله عدم رشد علیه باکتری بیماری‌زای *یرسینیا راکری* داشتند. در این مرحله یک جدایه دیگر نیز حذف شد و ۴ جدایه دیگر جهت تعیین هویت انتخاب شدند. سپس برای تشخیص قطعی جنس و گونه و یا سویه از روش مولکولی استفاده شد.

جهت اطمینان از توان پروبیوتیکی سویه‌ها ۵ سویه باقی‌مانده پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه، هاله عدم رشد سویه‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل شده در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد که چهار جدایه علیه *آئروموناس هیدروفیلا* هاله عدم رشدی بین ۹ تا ۱۱ میلی‌متر داشتند.

جدول ۴- میزان فعالیت ضد باکتریایی (هاله عدم رشد) جدایه‌های به‌دست آمده از میکروبیوتای روده‌ای ماهی سفید خزری.

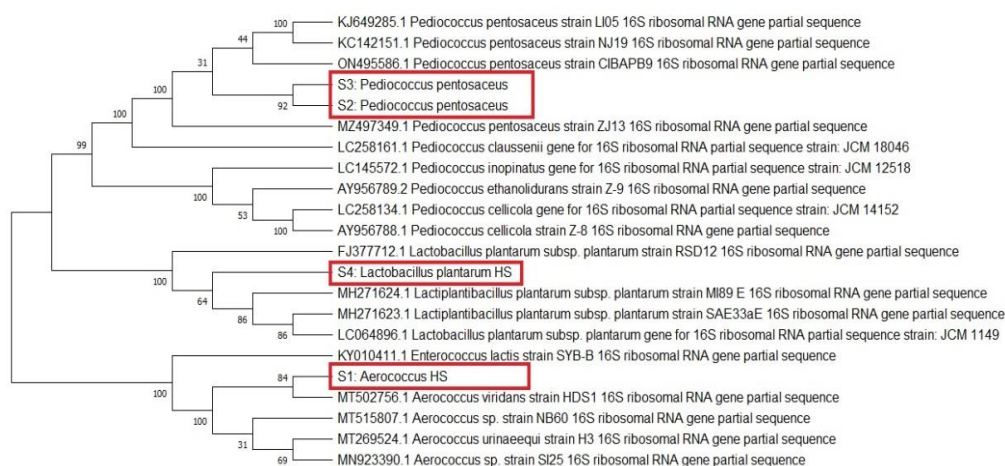
Table 4. Antibacterial activity (zone of inhibition) of isolates obtained from the intestinal microbiota of Caspian whitefish.

<i>Y. ruckeri</i>		<i>A. hydrophila</i>		سویه‌ها Strains
خنثی نشده Not neutralized	خنثی شده Neutralized	خنثی نشده Not neutralized	خنثی شده Neutralized	
11.98	10.23	10.49	9.32	1
8.82	*	11.17	11.42	9
11.18	11.87	11.60	11.36	11
12.15	9.12	11.52	11.81	16
11.95	12.21	11.58	11.12	22

* نشان‌دهنده عدم تشکیل هاله و رشد باکتری بیماری‌زا می‌باشد

مشابهت ۹۹/۷۳ درصد برای جدایه ۱۱، باکتری پدیکوکوس پنتاسئوس با میزان مشابهت ۹۹/۷۳ درصد برای جدایه ۱۶ و باکتری لاکتوکوکوس پلانتاروم با میزان مشابهت ۹۹/۸۶ درصد برای جدایه ۲۲ بودند (شکل ۲).

براساس توالی به‌دست آمده از چهار جدایه انتخاب شده و براساس بلاست کردن در بانک اطلاعات ژنتیکی باکتری‌ها، سویه‌ها به ترتیب باکتری جنس *Aerococcus* با میزان مشابهت ۹۹/۳ درصد برای جدایه ۱، باکتری پدیکوکوس پنتاسئوس با میزان



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک سویه‌های اسید لاکتیکی با استفاده از توالی‌های 16S rRNA نشان می‌دهد.

Figure 2. Phylogenetic tree showing lactic acid strains using 16S rRNA sequences.

هم‌چنین تغییر pH از طریق تولید اسیدهای آلی مرتبط است (۱۹). در سال‌های اخیر، پژوهش‌گران به دنبال معرفی پروبیوتیک‌های مؤثرتر بوده‌اند تا بازدهی تولید آبزیان را افزایش دهند. روده ماهی‌ها از انواع میکروارگانیسم‌های ناشناخته و اکوسیستم‌های پویایی تشکیل شده است که علاوه بر سلامت عمومی میزبان آبزی، نقش اساسی در فرآیندهای هضم، جذب مواد مغذی و بقای ماهی ایفا می‌کنند (۲۰). رشد، نمو و ایمنی ذاتی ماهی‌ها به احتمال زیاد به میکروب‌های روده‌ای بستگی دارد. برای بهره‌برداری از مزایای این میکروب‌های مفید (پروبیوتیک)، جداسازی و شناسایی آن‌ها ضروری است. بسیاری از پروبیوتیک‌های تجاری موجود در بازار برای استفاده در آبزی‌پروری معمولاً تأثیر چندانی ندارند، زیرا اغلب از منابع غیرماهی‌ها استخراج شده‌اند (۲۱). بنابراین تجویز کافی و مناسب پروبیوتیک‌های وابسته به میزبان منجر به تقویت

بحث

امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌طور قابل توجهی رایج شده است و تعداد زیادی از مطالعه‌ها اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها را بر گونه‌های مهم ماهی‌ها از نظر اقتصادی نشان می‌دهند (۱۶ و ۱۷). با تغییر ترکیبات غذایی، می‌توان فلور میکروبی روده ماهی‌ها را تحت تأثیر قرار داد. پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند، که به‌عنوان افزودنی‌های غذایی به کار می‌روند و تأثیرات مثبتی بر سلامت و رشد میزبان (آبزیان) دارند (۱۸). پروبیوتیک‌ها باید با گونه هدف سازگاری داشته باشند، زیرا این سازگاری به آن‌ها کمک می‌کند تا بهتر با میکروبیوتای بومی روده رقابت کرده و در میزبان جدید مستقر شوند. اثرات ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها به تولید مواد مختلفی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها، سیدروفورها، لیزوزیم‌ها، پروتازها و

که نشان از توان بالای پروبیوتیکی این باکتری‌هاست (۳۰). آگوستینا و همکاران (۲۰۲۲) پروبیوتیک‌های اسیدلاکتیک (انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس) جدا شده از ماهی *Puntioplites waandersi* در درجه حرارت‌های ۱۵، ۲۵ و ۴۵ و شوری‌های ۳، ۵ و ۷ درصد مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند این پروبیوتیک‌ها توانایی رشد در درجه حرارت‌ها و شوری‌های مختلف را دارد (۳۱).

در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار وجود باکتری‌هایی با خاصیت مهارکنندگی علیه باکتری‌های بیماری‌زا مانند جنس *آئروموناس* گزارش شد (۳۲). از آن پس این آزمایش به یکی از آزمایش‌های اصلی برای ارزیابی توان پروبیوتیکی باکتری‌های جدا شده از روده مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر ۴ جدایه ۱، ۱۱، ۱۶ و ۲۲ دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* بودند و جدایه ۹ به دلیل عدم تشکیل هاله رشد علیه *یرسینیا راکری* از ادامه ارزیابی حذف شد. به موازات نتایج ما خواص ضدباکتریایی باکتری‌های جدا شده از ماهی‌های شور جنوب (حلوا سفید، *O. ruber*، ماهی شیر، ماهی قباد و هامور) علیه *ویبریو هاروی*، *ویبریو کلرا*، *ویبریو آلیجنولیتیکوس*، *ویبریو پاراهمولایتیکوس*، *استرپتوکوکوس اینیایی* و *کلستریدیوم کوکلاریوم* مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که این پروبیوتیک‌ها توان بالایی در مهار رشد باکتری‌های ذکر شده دارند (۲۷). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر پروبیوتیک‌های اسید لاکتیک علیه باکتری‌های *آئروموناس هیدروفیلا*؛ *پزودوموناس* و *ادواردزیلا ایکتالوری* در ماهی *P. waandersi* مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که پروبیوتیک‌های اسید لاکتیک توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زای یاد شده را دارند (۳۱).

سیستم ایمنی شده و به بهبود سلامت میزبان کمک می‌کند. برای انتخاب بهترین کاندیدها به عنوان پروبیوتیک‌ها، باید جنبه‌های خاصی در نظر گرفته شوند که شامل غیربیماری‌زا بودن برای میزبان، توانایی رقابت با میکروب‌های نامطلوب و جلوگیری از رشد آن‌ها و قابلیت چسبیدن به اپیتلیوم روده هستند (۲۲). در این مطالعه ۴ سویه باکتری از ماهی سفید خزری جدا شدند. باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک شامل *آئروکوکوس*، *پدیکوکوس پتاسئوس* و *لاکتوکوکوس پلانٹاروم* بودند. مطالعه حاضر بیش‌تر جدایه‌ها باکتری‌های اسید لاکتیک بودند که از روده ماهی سفید دریای خزر جدا شدند. به موازات نتایج ما باکتری‌های اسید لاکتیک از ماهی سفید خزری (۲۳)، ماهی *Puntius sophore* (۲۴)، ماهی‌های آب شیرین (قرل‌آلای رنگین‌کمان، کپور معمولی، کاراس و سوف) (۲۵)، گربه‌ماهی (*Arius thalassinus*)، (۲۶)، ماهی‌های آب شور (حلوا سفید، *Otolithes ruber*، ماهی شیر، ماهی قباد و هامور) (۲۷) و ماهی سرماری (۲۸) نیز جداسازی شده‌اند.

با توجه به جدول ۲ از ۹ باکتری منتخب بعد از ارزیابی توان پروبیوتیکی باکتری‌ها در درجه‌ها و شوری‌های مختلف ۵ باکتری توان رشد در درجه‌ها و شوری آزمایش شده را داشتند. همسو با نتایج ما سویه *استافیلوکوکوس جداسازی شده* در درجه حرارت و شوری‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این باکتری در درجه حرارت‌های (۱۵، ۳۰، ۴۵، ۵۵ درجه) و شوری (۲، ۴، ۶ و ۸ درصد) به خوبی رشد کرد (۲۹). هم‌چنین باکتری‌های اسید لاکتیک (*لاکتوکوکوس پلانٹاروم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لاکتوکوکوس گارویه*) جدا شده از میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) در دماها (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه) و شوری‌های (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ درصد) مختلف رشد قابل توجهی داشتند

نتیجه‌گیری

از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ۴ جدایه از روده ماهی سفید شامل *آئروکوکوس*، *پدیکوکوس پنتاسئوس* و *لاکتوکوکوس پلاتناروم* (باکتری‌های اسید لاکتیک) قدرت بالایی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا بر علیه *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* داشتند. هم‌چنین این جدایه‌ها توانستند طیف وسیعی از دماها و شوری‌ها را تحمل کنند. با توجه به ویژگی‌های ذکر شده و جدایه‌های اسید لاکتیک از روده ماهی سفید خزری پتانسیل خوبی به‌عنوان پروبیوتیک دارند.

قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی ارائه شده توسط مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی برای انجام این پژوهش تشکر می‌کنند.

منابع مالی

این پژوهش توسط مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی تامین شده است.

منابع

1. Beltrán, J. M. G., & Esteban, M. Á. (2022). Nature-identical compounds as feed additives in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 123, 409-416.
2. Imtiaz, N., Anwar, Z., Waiho, K., Shi, C., Mu, C., Wang, C., & Qingyang, W. (2024). A review on aquaculture adaptation for fish treatment from antibiotic to vaccine prophylaxis. *Aquaculture International*, 32(3), 2643-2668.
3. Liu, X., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, Y., Xu, J., Gao, X., ... & Zhang, X. (2020). Impact of *Aeromonas hydrophila* and infectious spleen and kidney necrosis virus infections on susceptibility and host immune response in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *Fish & Shellfish Immunology*, 105, 117-125.
4. Dawood, M. A., Magouz, F. I., Salem, M. F., Elbialy, Z. I., & Abdel-Daim, H. A. (2020). Synergetic effects of *Lactobacillus plantarum* and β -glucan on digestive enzyme activity, intestinal morphology, growth, fatty acid, and glucose-related gene expression of genetically improved farmed tilapia. *Probiotics and Antimicrobial proteins*, 12, 389-399.
5. Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 129(1), 116-136.
6. Kwoji, I. D., Aiyegoro, O. A., Okpeku, M., & Adeleke, M. A. (2021). Multi-strain probiotics: synergy among isolates enhances biological activities. *Biology*, 10(4), 322.
7. Mondal, S., Mondal, D., Mondal, T., & Malik, J. (2022). Application of probiotic bacteria for the management of fish health in aquaculture. In *Bacterial Fish Diseases* (pp. 351-378). Academic Press.
8. Kim, M. G., Lim, H., Lee, B. J., Hur, S. W., Lee, S., Kim, K. W., & Lee, K. J. (2020). Replacing fish meal with a mixture of plant and animal protein sources in the diets of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(4), 577-582.
9. Jiang, S., Cai, L., Lv, L., & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-14.
10. Rahbar, M., Khoshkholgh, M., & Nazari, S. (2023). Population structure of Caspian Kutum (*Rutilus frisii*, Nordmann, 1840) in the southern coast of Caspian Sea using genome-wide

- single nucleotide polymorphism markers. *Fisheries Research*, 257, 106499.
11. Tarkhani, R., Imani, A., Hoseinifar, S. H., Moghanlou, K. S., & Manaffar, R. (2020). The effects of host-associated *Enterococcus faecium* CGMCC1. 2136 on serum immune parameters, digestive enzymes activity and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings. *Aquaculture*, 519, 734741.
 12. Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B., & Davies, S. J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 17(1), 73-79.
 13. Wu, C. C., Liu, C. H., Chang, Y. P., & Hsieh, S. L. (2010). Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*, 29(2), 258-263.
 14. Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2161-2171.
 15. Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of molecular biology*, 3(2), 208-IN1.
 16. Chauhan, A., & Singh, R. (2019). Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, 77(2), 99-113.
 17. Moroni, F., Naya-Català, F., Piazzon, M. C., Rimoldi, S., Caldach-Giner, J., Giardini, A., ... & Terova, G. (2021). The effects of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain used as probiotic on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, gut microbiota, and transcriptional response. *Frontiers in Marine Science*, 8, 659519.
 18. Vijayabaskar, P., & Somasundaram, S. T. (2008). Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology*, 7(1), 124-128.
 19. Kolochani, M. K., Mousavi, S. M., Zamani, I., Yavari, V., & Zakeri, M. (2022). Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts with probiotic ability from the intestine of gilthead seabream. *Iran Vet J*, 18.
 20. Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture research*, 41(11), 1553-1573.
 21. Kuebutornye, F. K., Lu, Y., Abarike, E. D., Wang, Z., Li, Y., & Sakyi, M. E. (2020). In vitro assessment of the probiotic characteristics of three *Bacillus* species from the gut of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, 412-424.
 22. Talpur, A. D., Memon, A. J., Khan, M. I., Ikhwanuddin, M., Daniel, M. D., & Abol-Munafi, A. B. (2012). Isolation and screening of lactic acid bacteria from the gut of blue swimming crab, *P. pelagicus*, an in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotics. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(1), 1.
 23. Hoseinifar, S. H., Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., Aski, H. S., Doan, H. V., ... & Khanzadeh, M. Comparison of the effects of host-associated (autochthonous) and commercial probiotics on immune responses, growth parameters and intestinal microbiota of Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1446927.
 24. Gupta, S., Mohanty, U., & Majumdar, R. K. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of India with reference to their probiotic potential. *Lwt*, 146, 111641.

25. Hanol Bektaş, Z. (2020). Identification and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from freshwater fish. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(4), 1795-1807.
26. Karyantina, M., Anggrahini, S., Utami, T., & Rahayu, E. S. (2020). Moderate halophilic lactic acid bacteria from Jambal roti: a traditional fermented fish of central Java, Indonesia. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29(10), 990-1000.
27. Mazlumi, A., Panahi, B., Hejazi, M. A., & Nami, Y. (2022). Probiotic potential characterization and clustering using unsupervised algorithms of lactic acid bacteria from saltwater fish samples. *Scientific Reports*, 12(1), 11952.
28. Kong, Y., Li, M., Li, R., Shan, X., & Wang, G. (2020). Evaluation of cholesterol lowering property and antibacterial activity of two potential lactic acid bacteria isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa argus*). *Aquaculture Reports*, 17, 100342.
29. Majumdar, R. K., & Gupta, S. (2020). Isolation, identification and characterization of *Staphylococcus* sp. from Indian ethnic fermented fish product. *Letters in Applied Microbiology*, 71(4), 359-368.
30. Mohamad, N., Manan, H., Sallehuddin, M., Musa, N., & Ikhwanuddin, M. (2020). Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as potential probiotics. *Aquaculture Reports*, 18, 100523.
31. Agustina, A., Saptiani, G., & Hardi, E. H. (2022). Isolation and identification of potential lactic acid bacteria as probiotics from the intestines of repang fish (*Puntioplites waandersi*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 15(1), 24-33.
32. Ochoa-Solano, J. L., & Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food microbiology*, 23(6), 519-525.