ارزیابی جدایه‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* به دست آمده از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) از لحاظ فعالیت‌های آنزیمی

- **سعید ضیایی‌نژاد:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، صندوق‌پستی: ۱۵۱-۶۳۶۱۵
- **مریم ابوعلی‌درویش‌طاهری*:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان ، صندوق پستی: ۱۵۵-۸۴۵۱۵
- **نفیسه سادات نقوی:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، صندوق پستی: ۱۵۵-۸۴۵۱۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

این پژوهش با هدف مقایسه جدایه‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس به‌دست آمده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) از لحاظ میزان فعالیت‌های آنزیمی انجام پذیرفت. بنابراین در شرایط استریل از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی نمونه‌برداری شد. پس از کشت در محیط‌های اختصاصی و انجام تست‌های بیوشیمیایی و خالص‌سازی جدایه‌های باکتریایی مختلف، فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز با استفاده از سوبستراهای اختصاصی در شش جدایه از جنس باسیلوس و دو جدایه از جنس لاکتوباسیلوس مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت ویژه هر سه آنزیم در جدایه‌های جنس باسیلوس بیش از جدایه‌های جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد. از لحاظ فعالیت پروتئاز، جدایه B۹ با میانگین ۶/۵۰ (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) بیش‌ترین فعالیت را داشت که دارای تفاوت معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) با سایر جدایه‌ها بود. بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آمیلاز به‌ترتیب در جدایه B۹ از باسیلوس (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۳/۳۰) و جدایه L٤ از لاکتوباسیلوس (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۰/٤۳) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) با هم بودند. بیش‌ترین فعالیت لیپاز نیز در جدایه‌های B۹ (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۱/۸۰) و B۳ (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۱/٦٦) از باسیلوس مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) با سایر جدایه‌ها بود.

کلمات کلیدی: آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، ماهی هامور معمولی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: abooali.maryam@gmail.com

مقدمه

در آبزی‌پروری در سال ۱۹۸۰ برای اولین‌بار پیش‌بینی شد که باکتری‌هایی یافت خواهند شد که نه تنها به‌عنوان غذا، بلکه به‌عنوان کنترل‌کننده‌های بیولوژیک بیماری ماهیان و فعال کننده‌های چرخه مواد غذایی مفید می‌باشند (Yasuda و Taga، ۱۹۸۰). استفاده از باکتری‌ها به‌عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری در چند سال گذشته گسترش زیادی یافته است (Ziaei Nejad و همکاران، ۲۰۰۶)، اما به‌طور عمده در بسیاری از مطالعات انتخاب باکتری‌های پروبیوتیکی براساس توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی استوار است (Gibson، ۱۹۹۹؛ Gatesoupe و Lesel، ۱۹۹۸؛ Rengpipat و همکاران، ۱۹۹۸؛ Rico-Mora و همکاران، ۱۹۹۸). به‌نظر می‌رسد که تولید ترکیبات مفید نیز باید هنگام انتخاب پروبیوتیک‌ها مدنظر قرار گیرد. این ترکیبات که می‌توانند برای میزبان مفید باشند شامل رنگدانه‌ها (Holmstorm و همکاران، ۲۰۰۲)، پروتئین‌ها (Klein و همکاران، ۱۹۹۸)، اسیدهای چرب (Yazawa، ۱۹۹۶؛ Shirasaka و همکاران، ۱۹۹۵)، ویتامین‌ها (Sugita و همکاران، ۱۹۹۱) و آنزیم‌های گوارشی (Ramirez و Dixon، ۲۰۰۳؛ Hansen و Olafsen، ۱۹۹۹) می‌باشند. آنزیم‌ها ترکیبات مفیدی هستند که برخی از باکتری‌ها قادر به تولید آن‌ها می‌باشند. این آنزیم‌های گوارشی تجزیه شیمیایی درشت مغذی‌های غذایی از قبیل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها را در دستگاه گوارش تسریع می‌کنند (Mathews و Van Holde، ۱۹۹۰) و باکتری‌های پروبیوتیکی که دارای چنین ویژگی باشند، می‌توانند هم در بعد بهبود کیفیت تغذیه‌ای و افزایش رشد (اگر در جیره غذایی مصرف شوند) نقش داشته باشند و هم اثرات مفیدی بر کیفیت آب داشته باشند (اگر به‌عنوان پروبیوتیک آب مصرف شوند) (ضیایی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۸). اگر عملکرد رشد و کیفیت تغذیه در آبزی پروری تجاری افزایش یابد، احتمالاً هزینه‌های تولید نیز کاهش می‌یابند. بنابراین اگر ماهی‌ها بتوانند بیش‌تر در برابر بیماری‌ها مقاومت کنند و زنده بمانند، از نظر اندازه، مرغوب و بهتر قابل فروش می‌شوند و متعاقباً هزینه دارو و نهایتاً هزینه‌های تولید شدیداً کاهش خواهد یافت (Burr و Gatlin، ۲۰۰۵). از این‌رو پژوهش حاضر به‌منظور سنجش فعالیت ویژه آنزیمی در باکتری‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به‌عنوان یک معیار اولیه جهت انتخاب جدایه‌های پروبیوتیکی اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در بهار ۱۳۹۲ و بر روی ۱۵ قطعه ماهی هامور معمولی جوان و سالم حاصل از صید در بندردیلم از استان بوشهر انجام شد. محل انجام تحقیق، آزمایشگاه بیولوژی دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان بود. جهت استریل نمودن سطح خارجی بدن، ماهیان به مدت یک دقیقه به‌وسیله بنزالکونیوم کلراید (۰/۱ درصد) شسته شدند.

در شرایط استریل قطعاتی از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش بریده شد و نمونه‌ها به‌طور جداگانه در آب شور استریل هموژن شدند و بعد فیلتر گردیدند. سپس به نمونه‌ها شوک حرارتی داده (نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند) و بعد به‌طور سریالی رقیق‌سازی شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های رقیق شده به‌روش کشت سطحی به‌طور جداگانه در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت پخش گردید که در این مرحله از دو محیط کشت انتخابی جهت جداسازی جدایه‌های باکتریایی استفاده شد که عبارت بودند از: محیط کشت *باسیلوس سرئوس* آگار (کیولاب، کانادا) برای انتخاب جنس *باسیلوس* و محیط کشت MRS آگار (کیولاب، کانادا) برای انتخاب جنس *لاکتوباسیلوس*.

پتری‌دیش‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس کلونی‌های باکتریایی تشکیل شده براساس واحد تشکیل‌دهنده کلونی شمارش و کلونی‌ها براساس ویژگی‌های ظاهریشان شامل رنگ، فرم و اندازه در محیط‌های کشت انتخابی (Vine و همکاران، ۲۰۰۴) و هم‌چنین براساس انجام تست‌های بیوشیمیایی رایج (Adams و Moss، ۲۰۰۲؛ Brooks و همکاران، ۱۹۹۸؛ Holt، ۱۹۹۴)، جداسازی، خالص‌سازی و کدگذاری گردیدند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی مربوط به *باسیلوس‌ها* شامل: رنگ‌آمیزی گرم، تشکیل اسپور، آزمایش کاتالاز و آزمایش بی‌هوازی مطلق می‌باشد که در آزمایش بی‌هوازی مطلق جهت تمایز *باسیلوس‌ها* از کلستریدیوم‌ها از جار بی‌هوازی استفاده شد (Brooks و همکاران، ۱۹۹۸؛ Holt، ۱۹۹۴). آزمایش‌های بیوشیمیایی مربوط به لاکتوباسیلوس‌ها شامل: رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسیدفست، آزمایش کاتالاز و آزمایش هیدرولیز آرژنین می‌باشد (Adams و Moss، ۲۰۰۲؛ Holt، ۱۹۹۴). در واقع جهت تمایز *لاکتوباسیلوس‌ها* از *لوکونوستوک‌ها*، آزمایش هیدرولیز آرژنین انجام شد.

باکتری‌های *باسیلوس* با کد B و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* با کد L مشخص شدند. بعد از جداسازی باکتری‌ها، ذخایر

خالص‌سازی شده این باکتری‌ها هم بر روی آگار با سطح شیب‌دار و هم در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد (با استفاده از گلیسرول استریل) نگه‌داری گردید (Vine و همکاران، ۲۰۰۲).

برای آماده‌سازی جدایه‌ها جهت سنجش آنزیمی، ذخیره‌ای از هر یک از باکتری‌ها در محیط کشت مارین براث (اسکارلا، اسپانیا) با تراکم 10^8 (تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه اصلی) تهیه گردید. برای این منظور یک کلونی خالص از ذخیره باکتری روی آگار با سطح شیب‌دار برداشته شد و در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط مارین براث تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور نگه‌داری گردید. براساس رابطه میزان تراکم باکتری و جذب نوری در طول موج ۶۴۰ نانومتر که از پروفیل رشد باکتری به‌دست آمد (Vine و همکاران، ۲۰۰۲)، تراکم فوق برای هر جدایه حاصل گردید. سپس محیط کشت حاوی باکتری به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ (پارس‌آزما، ایران) شد و محلول رویی برای سنجش آنزیمی برداشت گردید.

به‌منظور تعیین فعالیت ویژه آنزیم ابتدا باید میزان پروتئین محلول در نمونه‌ها مشخص می‌گردید. تا با تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین، فعالیت ویژه آنزیم به‌دست آید. میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به‌روش Bradford (۱۹۷۶)، با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد سنجیده شد. نمونه‌های آزمایشی با افزودن ۹۰ میکرولیتر بافر ۰/۰۵ مول Tris (pH=۷/۸) به‌همراه ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد به ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به‌دست آمد. به این صورت میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (شیماتزو مدل ۱۶۰ -UV) و پس از رسم منحنی استاندارد در مد quantitative در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین گردید.

فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش Bernfeld (۱۹۵۵) و با استفاده از سوبسترای نشاسته تعیین گردید. برای این منظور ابتدا معرف DNS از طریق حل نمودن ۱ گرم پودر ۲-هیدروکسی ۳،۵-دی نیترو بنزوئیک اسید در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اضافه نمودن ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۲۰ میلی‌لیتر سود ۲ مولار و رساندن حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم، ۱۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۲۹۰ میکرولیتر بافر استات ۰/۰۵ مولار و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۲ درصد (حجم/وزن) در بافر استات افزوده شد. این مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط به ۱ میلی‌لیتر معرف DNS افزوده شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعد جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر به‌عنوان فعالیت آمیلاز قرائت گردید. فعالیت ویژه آمیلاز کل با تقسیم کردن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول هر نمونه بر حسب میلی‌گرم بر واحد بین‌المللی پروتئین به‌دست آمد.

فعالیت پروتئاز کل نیز براساس روش Anson (۱۹۳۸) تعیین گردید. به این صورت‌که ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱/۵ درصد کازئین با pH=۷ به‌عنوان سوبسترا در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه گردید. واکنش حاصله به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و سپس جهت متوقف نمودن آن ۲ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (۰/۴ مولار) به مخلوط افزوده شد. مخلوط حاصله فیلتر گردید و ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۰/۴ مولار به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده افزوده شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه گردید. سپس جذب مخلوط حاصله توسط اسپکتروفتومتر به‌عنوان فعالیت پروتئاز کل در طول موج ۶۶۰ نانومتر قرائت گردید. فعالیت ویژه پروتئاز کل نیز با تقسیم کردن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول هر نمونه بر حسب میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین به‌دست آمد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم لیپاز، ۳۰۰ میکرولیتر سوبسترای p-نیتروفنیل‌میریستات به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه افزوده شد و با بافر بی‌کربنات آمونیوم (۲۵ میلی‌مولار) حاوی ۰/۵ درصد Triton X-100 به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم لیپاز در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت ویژه لیپاز کل با تقسیم نمودن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول حاصل از هر نمونه بر حسب میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین حاصل گردید (Albro و همکاران، ۱۹۸۵).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، میانگین داده‌های به‌دست آمده از فعالیت ویژه هر آنزیم با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد با هم مقایسه گردید. با توجه به این که آزمون دانکن به مقایسه میانگین‌های یک شاخص در دو یا چند گروه می‌پردازد، به کمک این آزمون میانگین داده‌های به‌دست آمده از فعالیت ویژه هر کدام از آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در جدایه‌های باکتریایی مختلف در دو یا چند گروه مورد مقایسه قرار گرفت.

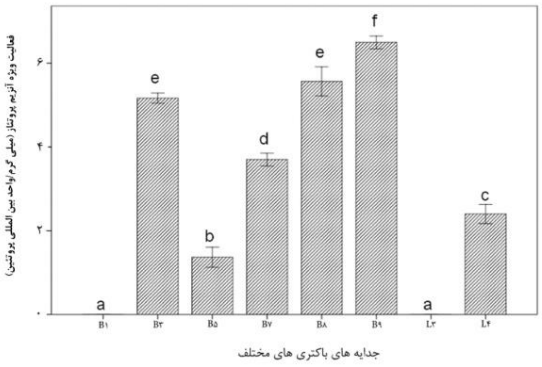
در واقع در این جا هر کدام از فعالیت‌های آنزیمی به‌عنوان یک شاخص در نظر گرفته شد. به‌عبارتی یک‌بار میانگین‌های فعالیت آمیلازی (به‌عنوان یک شاخص) جدایه‌های مختلف در دو یا چند گروه مورد مقایسه قرار گرفت و بار دیگر میانگین‌های فعالیت پروتئازی جدایه‌های مختلف در چند گروه مقایسه شد و در پایان نیز میانگین‌های فعالیت لیپازی جدایه‌های مختلف در چند گروه مقایسه گردید.

نتایج

در این پژوهش شش جدایه مربوط به جنس *باسیلوس* (با کدهای B_2، B_3، B_5، B_7، B_8 و B_9) و دو جدایه مربوط به جنس *لاکتوباسیلوس* (با کدهای L_3 و L_4) از دستگاه گوارش ماهی هامورمعمولی جداسازی و خالص‌سازی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که هر ۸ جدایه باکتریایی به‌دست آمده از هامورمعمولی دارای توانایی تولید هر سه نوع آنزیم گوارشی یا حداقل یکی از آن‌ها می‌باشند. اما بین فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در جدایه‌های مختلف تفاوت چشمگیری مشاهده شد. در کل، باکتری‌های جنس *باسیلوس* از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در مقایسه با باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس*، در وضعیت بالاتر و بهتری قرار داشتند (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). هم‌چنین از لحاظ فعالیت ویژه هر سه آنزیم در تمام حالات جدایه‌های B_9 و B_3 باکتری‌های بسیار فعالی بودند.

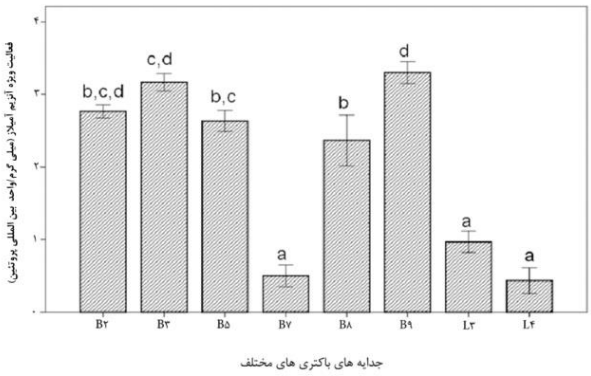
از لحاظ فعالیت‌های پروتئازی، به‌طورکلی جدایه‌های B_9، B_8 و B_3 باکتری‌های فعالی بودند. ولی بالاترین میزان فعالیت پروتئازی به جدایه B_9 با میانگین ۶/۵۰ (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) تعلق گرفت که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها بود (شکل ۱). از بین جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* نیز جدایه L_4 فعالیت بیش‌تری را نشان داد.

در همه باکتری‌های جداسازی شده فعالیت آمیلازی وجود داشت. به‌طوری‌که بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز به‌ترتیب در جدایه B_9 از *باسیلوس‌ها* (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۳/۳۰) و جدایه L_4 از *لاکتوباسیلوس‌ها* (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۰/۴۳) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) با هم بودند. البته در بین جدایه‌های *باسیلوس* جدایه‌های B_3 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۳/۱۶) و B_2 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۲/۷۶) فعالیت آمیلازی قابل توجهی از خود نشان دادند و از بین جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* نیز جدایه L_3 فعالیت بیش‌تری داشت (شکل ۲).



شکل ۱: نمودار فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) در جدایه‌های مختلف

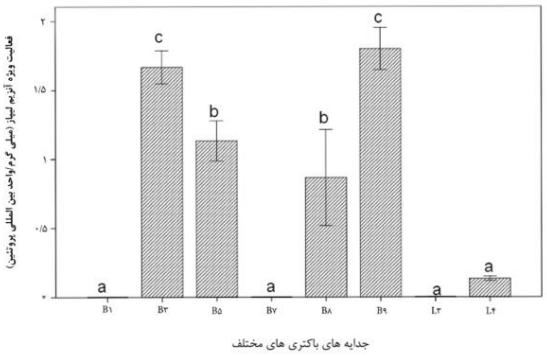
برای هر جدایه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است. B نماد جدایه‌های *باسیلوس* و L نماد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌باشد. جدایه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌دار ندارند (P<۰/۰۵).



شکل ۲: نمودار فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) در جدایه‌های مختلف

برای هر جدایه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است. B نماد جدایه‌های *باسیلوس* و L نماد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌باشد. جدایه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌دار ندارند (P<۰/۰۵).

در تمام جدایه‌های مورد مطالعه، میزان فعالیت لیپازی کم‌تر از میزان فعالیت آمیلازی و پروتئازی بود. بیش‌ترین فعالیت ویژه آنزیم لیپاز نیز در جدایه‌های B_9 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۱/۸۰) و B_3 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۱/۶۶) از *باسیلوس* مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) با سایر جدایه‌ها بود (شکل ۳).



شکل ۳: نمودار فعالیت ویژه آنزیم لیپاز (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) در جدایه‌های مختلف

برای هر جدایه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است. B نماد جدایه‌های *باسیلوس* و L نماد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌باشد. جدایه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌دار ندارند (P<۰/۰۵).

بحث

همان‌طورکه پیش‌تر نیز اشاره شد، از جمله مراحلی که جهت ارزیابی توان پروبیوتیکی جدایه‌های به‌دست آمده در نظر گرفته می‌شود، بررسی تولید ترکیبات مفیدی هم‌چون آنزیم‌های گوارشی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. اگرچه فعالیت آنزیمی در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها از جمله گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارد (رسولی و همکاران، ۱۳۸۸)، ولی فعالیت آنزیمی با منشاء میکروبی مصارف صنعتی داشته و به‌علاوه کشت، غربالگری و مهندسی ژنتیک باکتری‌های مولد آنزیم، آسان‌تر از سایر موجودات می‌باشد (حسینی و رضوی‌پور، ۱۳۸۸). در این میان نیز جنس *باسیلوس* طیف وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی شامل پروتئاز و آمیلاز را تولید می‌کند. می‌توان بیان نمود که ممکن است باکتری‌های تولیدکننده آنزیم نقش مهمی را در شکستن اجزاء غذا و جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش آبزیان به‌ویژه در دوران لاروی داشته باشند.

به‌دلیل کامل نبودن دستگاه گوارشی لاروها به‌ویژه در مورد لارو ماهیان دریایی از نظر آنزیم‌های گوارشی، مشکلاتی مانند پایین بودن رشد و بازماندگی لاروها و وابستگی زیاد به غذای زنده با توجه به هزینه بالای این نوع غذا در این زمینه نمایان شده است. بنابراین افزایش سطح آنزیم‌های گوارشی ممکن است به افزایش نرخ رشد منتهی شود.

در همین راستا گزارش شده است که افزایش آنزیم‌ها با منشاء خارجی فاکتور رشد را در لارو ماهی شانک بهبود بخشیده است (Kolkovski و همکاران، ۱۹۹۳). هم‌چنین نتیجه مشابهی نیز در مورد آزاد ماهی آتلانتیک به‌دست آمده است (Carter و همکاران، ۱۹۹۴). به‌علاوه ثابت شده است که افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی *باسیلوس* به سیستم پرورشی لارو میگوی سفید هندی، می‌تواند با افزایش دادن آنزیم‌های گوارشی میگو، رشد و شاخص‌های تغذیه‌ای را افزایش دهد (Ziaei Nejad و همکاران، ۲۰۰۶). با توجه به این که مشکل بسیاری از گونه‌ها در آبزی‌پروری، هضم و جذب جیره‌های غذایی مصنوعی در طول دوران اولیه لاروی می‌باشد و بیان شده است که این امر به‌دلیل کمبود سطح آنزیم‌های گوارشی مسئول هضم غذا می‌باشد (Kolkovski و همکاران، ۱۹۹۷)، بنابراین افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی که قادر به تولید آنزیم‌های مفید هستند، امکان دارد در هضم غذاهای مصنوعی مؤثر بوده و دوره غذادهی با غذاهای زنده و نیز هزینه‌های بالای آن را کاهش دهد (ضیایی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۸).

تحقیقات گسترده در مورد استفاده از آنزیم‌ها در حیوانات و انسان‌ها، یک موقعیت اجباری را برای افزودن آنزیم‌های گوارشی به جیره‌های غذایی فراهم می‌کند. اضافه کردن این آنزیم‌ها به رژیم غذایی نه تنها به هضم غذا کمک می‌نماید بلکه ممکن است به ذخیره شدن آنزیم‌های درونی برای انجام اعمال متابولیکی مهم در بدن کمک کند. به‌علاوه تحقیقات بیش از نیم قرن گذشته در حیوانات و انسان‌ها تأیید می‌کند که آنزیم‌های مکمل می‌توانند دسترسی زیستی درشت‌مغذی‌ها و ریزمغذی‌ها را افزایش دهند و بروز و شدت علائم گوارشی مرتبط با هضم ضعیف یا ناقص را کاهش دهند (Wolfson و همکاران، ۲۰۰۸).

از این رو در پژوهش حاضر تولید آنزیم توسط باکتری‌های جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان معیاری اولیه جهت غربال‌سازی جدایه‌های پروبیوتیکی بالقوه در نظر گرفته شد.

در مورد تولید آنزیم توسط باکتری‌ها تحقیقات زیادی صورت گرفته است. در این راستا گزارش شده است که باکتری‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک، دارای توانایی تولید آنزیم می‌باشند. به‌طوری‌که جدایه *باسیلوس* BP_5 با میانگین ۳/۱۳ (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) بیش‌ترین فعالیت پروتئازی را داشت. بیش‌ترین فعالیت آمیلازی مشاهده شده (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۳/۰۰) و بیش‌ترین فعالیت لیپازی مشاهده شده (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین ۱/۴۰) نیز به جدایه *باسیلوس* BP_6 تعلق داشت (ضیایی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۸). در مطالعات متعددی نیز فعالیت آنزیم‌های

مختلف در باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس به اثبات رسیده است (Lindgren و Refai، ۱۹۸۴). هم‌چنین *باسیلوس‌های* تولید کننده آمیلاز از ماهیانی مانند کپور و تیلاپیا جداسازی شده‌اند و فعالیت آنزیمی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفته است (Sugita و همکاران، ۱۹۹۷). به‌علاوه مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی تولید کننده آمیلاز، لیپاز، سلولاز و پروتئاز نیز از دستگاه گوارش ماهیان کپورهندی و چینی جداسازی شده است (Bairagi و همکاران، ۲۰۰۲). هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های مختلف در باکتری‌های جنس *باسیلوس* به اثبات رسیده است (Esakkiraj و همکاران، ۲۰۰۹). به‌علاوه گزارش شده است که *باسیلوس‌های* تولیدکننده آنزیم‌های آمیلاز، سلولاز و پروتئاز در مناطق جلو روده و پشت روده از مجاری معده‌ای-روده‌ای ماهی *لیبو بتا* جداسازی شده‌اند (Mondal و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه‌ای نیز باکتری‌های بومی تولید کننده پروتئاز و آمیلاز از روده کپورماهیان بزرگ هندی جداسازی شدند و نتایج حاکی از این بود که پنج تا از ده سویه شناسایی شده به جنس باسیلوس تعلق داشت (Ray و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه دیگری وجود باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* تولیدکننده آلکالین پروتئاز در مایع روده‌ای ماهی کپور هندی به اثبات رسیده است (Geethanjali و Subash، ۲۰۱۱)، ولی به دلیل این که فاکتورهای زیادی از جمله ترکیب و شرایط محیط کشت و مانند آن بر فعالیت آنزیم‌ها تأثیرگذار می‌باشند و از طرف دیگر فعالیت آنزیمی براساس واحدهای متفاوتی بیان شده است، بنابراین مقایسه چندانی بین نتایج به‌دست آمده نمی‌توان انجام داد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جنس *باسیلوس* از لحاظ فعالیت‌های آمیلازی، پروتئازی و لیپازی در مقایسه با جنس *لاکتوباسیلوس*، در وضعیت بالاتر و بهتری قرار داشت و در کل، جدایه‌های فعال از نظر فعالیت‌های آمیلازی، پروتئازی و لیپازی، جدایه‌های B_9 و B_3 تشخیص داده شدند و در تمام جدایه‌های مورد مطالعه، فعالیت‌های آمیلازی وجود داشت و میزان فعالیت لیپازی کم‌تر از میزان فعالیت آمیلازی و پروتئازی بود. بنابراین بررسی فعالیت آنزیم‌ها به‌عنوان ترکیبات مفید در باکتری‌های جداسازی شده را می‌توان به‌عنوان یک مرحله غربالگری در انتخاب باکتری‌های پروبیوتیکی قرار داد. هر چند سنجش‌های آنزیمی در جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، این پدیده را که جدایه‌های مورد نظر حتماً در شرایط بدن آبزی نیز همین مقدار فعالیت آنزیمی را از خود نشان دهند، تضمین نمی‌کند، چرا که شرایط محیط دستگاه گوارش آبزیان با شرایط محیط کشت متفاوت است. هم‌چنین در دستگاه گوارش آبزیان ممکن است شرایطی حاکم باشد که باکتری قادر به استقرار و کلونی‌سازی نباشد و یا حتی ممکن است به تعدادی که در پژوهش حاضر جهت سنجش آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی به‌کار برده شد یعنی به تعداد 10^8 (تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه اصلی) نرسد. البته این امکان هم وجود دارد که دلیل عدم استقرار و یا استقرار به تعداد ناکافی باکتری‌ها، به‌خاطر نامساعد بودن شرایط دستگاه گوارش و یا بیش‌تر بودن سرعت شستشوی این باکتری‌ها از دستگاه گوارش نسبت به سرعت رشد آن‌ها باشد (Vine و همکاران، ۲۰۰۴)، ولی مسلماً سنجش آنزیم‌ها یا هر ترکیب مفید دیگر مانند ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، اسیدهای چرب و مانند آن به‌عنوان شاخصی در مراحل انتخاب پروبیوتیک‌ها مفید و دارای ارزش خواهد بود (Vine و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین با توجه به مشکلات موجود در هضم و جذب جیره‌های غذایی مصنوعی طی دوران اولیه لاروی به‌دلیل کمبود سطح آنزیم‌های گوارشی مسئول هضم غذاها، امید است که افزودن جدایه‌های باکتریایی پروبیوتیکی بالقوه به‌دست آمده از این پژوهش که قادر به تولید آنزیم‌های مفید می‌باشند، بتوانند در هضم غذاهای مصنوعی مؤثر بوده و بنابراین دوره غذادهی با غذاهای زنده و نیز هزینه‌های بالای آن را کاهش دهند.

در مجموع می‌توان گفت که از لحاظ فعالیت ویژه هر سه نوع آنزیم گوارشی جدایه B_9 در همه حال فعال‌ترین جدایه بود. به‌دلیل طبیعت ماهی هامور معمولی که یک ماهی گوشت‌خوار می‌باشد، جدایه‌هایی که فعالیت پروتئازی بیش‌تری دارند جهت استفاده به‌عنوان پروبیوتیک در ماهی هامور، در اولویت می‌باشند. از این‌رو نتیجه اصلی این پژوهش براساس داده‌های موجود، این می‌تواند باشد که جدایه‌های B_9، B_8 و B_3 که همگی فعالیت‌های پروتئازی بالایی نشان دادند، توان تبدیل به پروبیوتیک تجاری را برای ماهی هامور معمولی دارند.

منابع

۱. **حسینی، ف. و رضوی‌پور، ر.، ۱۳۸۸.** بهینه‌سازی تولید لیپاز توسط سویه‌های *باسیلوس* جدا شده از لجن فعال. فصلنامه دانش میکروب شناسی. سال ۱، شماره ۳، صفحات ۱ تا ۵.

۲. **رسولی، ا.؛ موسوی‌گرگری، س.؛ سروری‌زنجانی، ر. و درویش‌علیپورآستانه، ش.، ۱۳۸۸.** تعیین خصوصیات سویه بومی گونه *باسیلوسی* مولد آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به دما. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. دوره ۸، شماره ۴،

صفحات ۳۰۳ تا ۳۱۶.

۳. **ضیایی‌نژاد، س.؛ رفیعی، غ.؛ غفله‌مرمضی، ج.؛ میرواقفی، ع. و فرحمند، ح.، ۱۳۸۸.** بررسی تولید آنزیم توسط باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*) در شرایط *in vitro* با هدف انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی. مجله علوم و فنون دریایی. دوره ۸، شماره‌های ۱و۲، صفحات ۱ تا ۱۰.

4. **Adams, M.R. and Moss, MO., 2002.** Food Microbiology. Second edition. Mashhad, Ferdowsi University of Mashhad Publication. 611 p.

5. **Albro, P.W.; Hall, R.D.; Corbett, J.T. and Schroeder, J., 1985.** Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. Biochim Biophys Acta. Vol. 835, pp: 477-490.

6. **Anson, M.L., 1938.** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. Vol. 22, pp: 79-89.

7. **Bairagi, A.; Ghosh, K.S.; Kumar, S.; Sen, S.K. and Ray, A.K., 2002.** Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tract. Aquaculture International. Vol. 10, pp: 109-121.

8. **Bernfeld, P., 1955.** Amylase, α and β. Methods in Enzymology. Vol. 1, pp: 149-158.

9. **Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing, the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. Vol. 72, pp: 248-254.

10. **Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A., 1998.** Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Twenty-first editions. Appleton and Lange Stamford, Connecticut. 740 p.

11. **Burr, G. and Gatlin, D., 2005.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. Journal of the world Aquaculture Society. Vol. 36, No. 4, pp: 425-436.

12. **Carter, C.G.; Houlihan, D.F.; Buchanan, B. and McCarthy, I.A., 1994.** Growth and feed utilisation efficiencies of seawater Atlantic *Salmo salar* L. fed a diet containing supplementary enzymes. Aquacult Fish Manage. Vol. 25, pp: 37-46.

13. **Esakkiraj, P.; Immanuel, G.; Sowmya, S.M.; Iyapparaj, P. and Palavesam, A., 2009.** Evaluations of protease producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. Food and Bioprocess Technology. Vol. 2, No. 4, pp: 383-390.

14. **Gatesoupe, F.J. and Lesel, R., 1998.** An environmental approach to intestinal microflora in fish. Cahiers Agricult. Vol. 7, pp: 29-35.

15. **Geethanjali, S. and Subash, A., 2011.** Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish *Labeo rohita*. World Journal of Fish and Marine Sciences. Vol. 3, pp: 88-95.

16. **Gibson, L.F., 1999.** Bacteriocin activity and probiotic activity of *Aeromonas* media. Symp. Ser. Soc. Appl. Bacteriol. Vol. 28, pp: 243S-248S.

17. **Hansen, G.H. and Olafsen, J.A., 1999.** Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecol. Vol. 38, pp: 1-26.

18. **Holmstorm, C.; Egan, S.; Franks, A.; McCloy, S. and Kjelleberg, S., 2002.** Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiol Ecol. Vol. 41, pp: 47-58.

19. **Holt, J.G., 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. LWW. 787 p.

20. **Klein, G.; Pack, A.; Bonaparte, C. and Reuter, G., 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. international journal food microbiology. Vol. 41, No. 2, pp: 103-125.

21. **Kolkovski, S.; Tandler, A.; Kissil, G. and Gertler, A., 1993.** The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. Fish Physiology Biochemistry. Vol. 12, No. 3, pp: 203-209.

22. **Kolkovski, S.; Tandler, A. and Lzquierdo, M.S., 1997.** Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. 148, No. 4, pp: 313-322.

23. **Lindgren, S. and Refai, O., 1984.** Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. Journal of Appl. Bacterio. Vol. 51, pp: 221-228.

24. **Mathews, C.K. and van Holde, K.E., 1990.** Biochemistry. Redwood City. California. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1129 p.

25. **Mondal, S.; Roy, T. and Ray, A.K., 2010.** Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of Bata, *Labeo bata*. World Aquaculture Society. Vol. 41, No. 3, pp: 369-377.

26. **Ramirez, R.F. and Dixon, B.A., 2003.** Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Aquaculture. Vol. 227, pp: 417-426.

27. **Ray, A.k.; Roy, T.; Mondal, S. and Ringo, E., 2010.** Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 1462-1469.

28. **Rengpipat, S.; Phianphak, W.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasveta, P.; Sirirat, R.; Wannipa, P.; Somkiat, P. and Piamsak, M., 1998.** Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. Vol. 167, No. 3-4, pp. 301-313.

29. **Rico-Mora, R.; Voltolina, D. and Villaescusa-Celaya, J.A., 1998.** Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*) cultures. Aquacultural Engineering. Vol. 19, No. 1, pp: 1-6.

30. **Shirasaka, N.; Nishi, K. and Shimizu, S., 1995.** Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism. Vol. 1258, No. 3-5, pp: 225-227.

31. **Sugita, H.; Miyajima, C. and Deguchi, Y., 1991.** The vitamin B_{12}-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture. Vol. 92, No. 2, pp: 267-276.

32. **Sugita, H.; Kawasaki, J. and Deguchi, Y., 1997.** Productuon of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. Letters Appl. Microbiol. Vol. 24, pp: 105-108.

33. **Vine, N.G.; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2004.** In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal

mucus. FEMS Microbiology Letters. Vol. 231, pp: 145-152.

34. **Vine, N.G.; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006.** Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol, Rev. Vol. 30, pp: 404-427.

35. **Wolfson, D.; Olmstead, S.; Meiss, D. and Ralston, J., 2008.** Making Sense of Digestive Enzymes. Klaire Labs. ProThera, Inc. 8p.

36. **Yasuda, K. and Taga, N., 1980.** A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. Mer. Vol. 18, pp: 53-62.

37. **Yazawa, K., 1996.** Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. Lipids. Vol. 31, No. 1, pp: 297-300.

38. **Ziaei Nejad, S.; Habibi Rezaei, M.; Azari Takami, G.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A. and Shakouri, M., 2006.** The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture. Vol. 252, No. 2-4, pp: 516-524.