بررسی توانایی و کارایی پروبیوتیکی باکتری‌های فیتاز مثبت در شرایط آزمایشگاهی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

- **مرضیه نظری**: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **مجتبی علیشاهی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **تکاور محمدیان***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **حسین معتمدی**: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ۱۳۵

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹٤

چکیده

جایگزینی پروتئین حیوانی با پروتئین گیاهی از راهکارهای اصلی کاهش قیمت خوراک در آبزیان است. ۷۰ درصد فسفر در گیاهان به‌صورت فیتات است که برای ماهیان قابل جذب نیست و موجوداتی که فاقد آنزیم‌های فیتازی هستند دسترسی کمی به این ماده دارند. هدف این تحقیق بررسی توان پروبیوتیکی باکتری‌هایی است که قادر به تجزیه فیتات به‌وسیله تولید آنزیم فیتاز هستند. بدین منظور ۵ باکتری با توان بالای تولید آنزیم فیتاز شامل:۱- (phas۳۲) *Citrobacter farmeri*، ۲- (fish۱۲) *Klebsiella oxytoca*، ۳- (Fish۲۲) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae*، ٤- (Rsh۲۱) *Raoultella terrigena* و ۵- *Enterobacter cloacae* (Fish۱۱) که از منابع مختلف کشاورزی و آبزی پروری جداسازی شده بودند، انتخاب شدند. سپس این باکتری‌ها براساس شاخص‌های پروبیوتیکی شامل: مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی، خاصیت آنتاگونیستی، توان آب‌گریزی و عدم بیماری‌زایی برای ماهی مقایسه و ارزیابی گردیدند. باکتری لاکتوباسیلوس کازئی که یک پروبیوتیک پذیرفته شده آبزیان می‌باشد نیز به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد. تمام ۵ جدایه مورد بررسی توان تحمل اسیدیته بهتری نسبت لاکتوباسیلوس کازئی داشتند و بیش‌ترین توان تحمل اسیدیته را Phas۳۲ و Fish۱۲ داشتند. هم‌چنین غلظت‌های ۰/۵ تا ۳ درصد نمک‌های صفراوی تأثیری بر رشد باکتری‌های مورد بررسی نداشت (p>۰/۰۵). در مورد فعالیت آنتاگونیستی، هیچ‌کدام از جدایه‌های فیتاز مثبت فعالیت آنتاگونیستی در برابر دو باکتری بیماری‌زای یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا نداشتند، هرچند لاکتوباسیلوس کازئی فعالیت آنتاگونیستی مناسبی در برابر این دو باکتری نشان داد (p>۰/۰۵). جدایه Fish۱۱ درتست آنتی بیوگرام بیش‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک نشان داشت. در خصوص فعالیت آب‌گریزی تمام باکتری‌های مورد مطالعه، به‌جز Fish۱۱ بقیه باکتری‌ها توان آب‌گریزی قابل رقابت با لاکتوباسیلوس کازئی داشتند. در این مطالعه باکتری‌های تولیدکننده فیتاز دارای برخی شاخص‌های پروبیوتیکی قابل رقابت با لاکتوباسیلوس کازئی بودند ولی تفاوت معنی داری بین پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها مشاهده نگردید و بایستی علاوه بر بررسی‌های کامل‌تر شاخص‌های پروبیوتیکی، بررسی‌های درون‌تنی (In vivo) نیز در مورد این جدایه‌ها انجام شود تا در صورت مناسب بودن، به‌صورت مکمل پروبیوتیکی به غذای آبزیان اضافه گردند.

کلمات کلیدی: باکتری‌های فیتاز مثبت، ماهی کپور معمولی، پروبیوتیک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: takavar_m2002@yahoo.com

مقدمه

از آن‌جاکه حدود ۷۰ درصد هزینه آبزی‌پروری متعلق به هزینه‌های تأمین خوراک می‌باشد (FAO، ۲۰۰۸)، توسعه آبزی پروری منوط به استفاده از روش‌های مناسب برای افزایش کیفیت خوراک به‌ویژه در سیستم‌های کشت متراکم ماهی می‌باشد. در صنعت آبزی‌پروری حدود ۸۸٪ پروتئین خوراک توسط منابع با منشاء آبزیان به‌ویژه پودر ماهی تأمین می‌گردد (FAO، ۲۰۰۸). با توجه به گران‌قیمت بودن این اجزای غذایی و هم‌چنین کاهش صید ماهی از دریا، بایستی جایگزینی مناسب و ارزان‌تر برای این مواد یافت، غذاهای آبزیانی که بر پایه پروتئین‌های گیاهی هستند (مانند سویا) غنی از فسفر می‌باشند (cheng و همکاران، ۲۰۰۳). اما ۷۰ درصد فسفر در گیاهان به‌صورت فیتات است که برای ماهیان قابل جذب نیست (Dorsch و همکاران، ۲۰۰۳). فیتیک اسید (میواینوزیتول ۴،۵،۱،۲،۳و۶-هگزاکیس دی‌هیدروژن فسفات) بیش‌ترین فرم ذخیره‌ای فسفر در دانه‌ها و گرده‌ها می‌باشد. موجوداتی که فاقد آنزیم‌های هیدرولیزکننده فیتاز هستند دسترسی کمی به این ماده دارند. فیتات از روده این موجودات عبور می‌کند و از راه مدفوع دفع می‌شود. دفع این ماده باعث ایجاد مشکلات زیست‌محیطی از جمله آلودگی به فسفر و افزیش بیش از حد باکتری‌ها، قارچ‌ها و پلانکتون‌ها در آب می‌شود. علاوه بر آن فیتات به پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و موادمعدنی متصل می‌شود و کمپلکس نامحلولی را تشکیل می‌دهد که در نتیجه قابلیت استفاده، فعالیت و هضم آن‌ها را کاهش می‌دهد. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده که کمپلکس‌های فیتات پروتئین کم‌تر مورد حمله آنزیم‌های پروتئولیتیک قرار می‌گیرند (Rao و همکاران، ۲۰۰۹؛ Cao و همکاران، ۲۰۰۷). علت تشکیل کمپلکس فیتات با مواد معدنی این است که اسیدفیتیک دارای مقدار بالایی از فسفات است که باعث ایجاد بار منفی زیادی در دامنه وسیعی از pH می‌شود. بنابراین کاتیون‌های دو ظرفیتی با بار مثبت را شلاته می‌کند و باعث جذب ضعیف آن‌ها در دستگاه گوارش می‌شود. فیتاز یک آنزیم ویژه برای هیدرولیز کردن فیتات است. این آنزیم در دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات وجود دارد، اما میزان آن به‌طور طبیعی پایین است و یا در حیوانات تک معده‌ای وجود ندارد (Viemaو همکاران، ۲۰۰۴). علاوه بر این جذب و دسترسی زیستی مواد معدنی ضروری از جمله کلسیم، روی، منیزیم و آهن نیز تحت اثرات منفی حاصل از شکل‌گیری کمپلکس نامحلول کلات با فیتات قرار می‌گیرد (Papatryphonو همکاران، ۱۹۹۹). حتی برخی آنزیم‌ها از جمله پپسین، آمیلوپسین و آمیلاز توسط فیتات‌ها مهار می‌شوند. از طرفی فیتات ممکن است با قابلیت هضم چربی و نشاسته نیز تداخل داشته باشد (Cosgrove، ۱۹۶۶).

غنی‌سازی مواد غذایی با فیتاز می‌تواند باعث کاهش فسفات دفعی به‌میزان ۵۰ درصد در موجودات شود (Mittal و همکاران، ۲۰۱۱). در طی دو دهه اخیر استفاده از فیتازهای میکروبی در رژیم‌های غذایی خوک و ماکیان به‌منظور افزایش استفاده از غذاهای گیاهی، بیش‌تر شده است، هم‌چنین در آبزی‌پروری با افزایش فسفات قابل دسترس در دستگاه گوارش آبزیان می‌تواند مفید واقع شود. فیتازها در باکتری‌هایی مثل *Aerobacter aerogenes*، *Pseudomonas* sp.، *E.coli*، *Bacillus* sp. و *Enterobacter* sp. تولید می‌شود (Kim و همکاران، ۱۹۹۸). آنزیم‌های خوراکی فیتاز در تغذیه ماهی به‌صورت پودر، گرانوله و یا مایع استفاده می‌شوند.

استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان باکتری‌هایی که با تغییر فلور روده باعث اثرات تحریک رشد، ایمنی و سلامت موجود می‌شوند ایده نسبتاً جدیدی است که در آبزی‌پروری شکل گرفته است (Vijavabaskar و Somasundaram، ۲۰۰۸). این مواد از طریق بهبود و تعادل میکروفلور روده و مسدود کردن محل اتصال باکتری‌های بیماری‌زا، افزایش تولید برخی سایتوکین‌ها، افزایش قدرت ایمنی و اثر بر جذب مواد غذایی اثرات خود را اعمال می‌نمایند (Verrth و همکاران، ۲۰۰۶؛ sugita و همکاران، ۱۹۹۸). تابه‌حال باکتری‌های بسیار متنوع که دارای اثرات پروبیوتیکی در ماهی‌ها هستند گزارش شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به *لاکتوباسیلوس*، *آئروموناس*، *Citrobacter*، *Klebsiella* و... اشاره نمود (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸). یک باکتری دارای خواص پروبیوتیکی باید بتواند از محیط معده و روده عبور نموده و در برابر شرایط اسیدی معده، اثر صفرا و آنزیم‌های روده مقاومت داشته باشد.

این تحقیق به‌منظور ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های دارای توان هیدرولیزکننده فیتاز و انتخاب بهترین جدایه از آن‌ها صورت گرفت. نتایج این مطالعه می‌تواند به معرفی پروبیوتیک‌هایی منجر شود که علاوه بر دارا بودن خواص مناسب پروبیوتیک‌ها، ویژگی تولید فیتاز بالا را نیز دارند و در هنگام استفاده به همراه خوراک، هر دو اثر مناسب را در ماهی القا می‌کنند.

مواد و روش‌ها

تشخیص باکتری‌های تولیدکننده فیتاز: این تحقیق در سال ۱۳۹۳ و در آزمایشگاه تخصصی بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. به‌منظور جداسازی باکتری‌های با توان تولید فیتاز، از منابع مختلف شامل:

خاک مزارع شبدر، لوبیا، دستگاه گوارش کپور و بستر استخر پرورشی کپور ماهیان استفاده شد (ابراهیمیان، ۱۳۹۲). برای انتخاب باکتری‌های با بالاترین توان تولید آنزیم فیتاز، تعداد ۷۰ جدایه به‌دست آمده از منابع فوق در محیط PSM (Phytase screening medium) جامد به‌صورت نقطه‌ای کشت داده‌شدند (Mukesh و همکاران، ۲۰۰۴). جدایه‌های دارای هاله شفاف به محیط PSM broth تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان فعالیت فیتاز تولید شده توسط باکتری در محلول رویی به‌روش رنگ‌سنجی مولیبدات و با استفاده از اسیدفیتیک سنجیده شد (Mittal و همکاران، ۲۰۱۱). برای شناسایی جدایه‌های مورد نظر، تست‌های بیوشیمیایی شامل: رنگ‌آمیزی گرم، اسنات تست، کاتالاز، اکسیداز، OF، مصرف سیترات، MR/VP، تولید اندول، هضم ژلاتین و تجزیه اوره انجام شد (Garrity و همکاران، ۲۰۰۵). جهت تأئید نهایی، استخراج DNA از باکتری با استفاده از (کیت شرکت سیناژن ایران) صورت گرفت و نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش PCR تعیین هویت شدند.

بررسی توان پروبیوتیکی باکتری‌ها دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیم فیتاز: از مجموع باکتری‌های دارای توان تولید فیتاز، ۵ باکتری که بیش‌ترین فعالیت تولید فیتاز را داشتند (phas۳۲، fish۱۲، Rsh۲۱، fish۲۲ و fish۱۱) برای بررسی از نظر توان پروبیوتیکی در این تحقیق انتخاب شدند.

تحمل باکتری‌ها نسبت به pH: به‌منظور بررسی تحمل نسبت به شرایط مختلف pH، سوسپانسیون باکتریایی از هریک از ۵ باکتری تولیدکننده فیتاز تهیه شده و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در PBS حاوی HCl با pH بین ۲ تا ۹ در سه تکرار قرار داده شدند. سپس ۴ رقت متوالی از باکتری در PBS استریل تهیه و از هر رقت در محیط کشت TSA کشت داده شد. بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، باکتری‌ها شمارش و میزان زنده‌مانی باکتری‌ها در شرایط مختلف اسیدی مشخص گردید (Balcazar و همکاران، ۲۰۰۸).

تحمل نسبت به نمک‌های صفرا: برای سنجش تحمل جدایه‌های به‌دست آمده نسبت به صفرا از روش Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳ و ۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده شد. به‌طور خلاصه سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۱ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی (سدیم دئوکسی کولات و دئوکسی کولات به نسبت مساوی) (۰/۵، ۳، ۵، ۷، ۹) در سه تکرار قرار داده شده و تعداد باکتری پس از زمان فوق، با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد نمک‌های صفراوی) مقایسه گردید.

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی: جهت بررسی فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز، از روش Jayanth و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده شد. به‌طور خلاصه، ابتدا از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها در محیط TSB به کمک میکروپیپت کشت خطی در مرکز پلیت روی محیط TSA و MRS آگار تهیه و سپس از کشت ۱۸ ساعته *آئروموناس هیدروفیلا* AH04 و *یرسینیا روکری* در محیط TSB، به‌صورت عمود تا ۱ میلی‌متری کشت خطی (در سه تکرار) کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوباسیون و منطقه مهار رشد (بین باکتری‌های تولیدکننده فیتاز و *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینا روکری*) با خط‌کش اندازه‌گیری شد (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۲).

آزمون آنتی‌بیوگرام: به‌منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مورد بررسی از روش انتشار دیسک (disk diffusion) یا Kirby_Bauer استفاده شد. برای این منظور آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان ازجمله استرپتومایسین، فلورفنیکل، تتراسایکلین، اریترومایسین، لینکواسپکتین و فورازولیدون انتخاب شدند. مواد لازم شامل محیط‌های کشت اختصاصی (MRS) و غیراختصاصی (TSA)، دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مذکور بود. به‌طور خلاصه پس از کشت و انکوباسیون ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط جامد TSA چند کلونی را برداشته و در محیط مایع TSB به‌مدت تقریبی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و پس از این مدت با سانتریفیوژکردن و خارج کردن مایع رویی، سوسپانسیون باکتری با سرم فیزیولوژی استریل به نحوی که با کدورت ۰/۵ مک فارلند برابری نماید، تهیه شد. پس از آن ۲۰ میکرولیتر از هر باکتری به‌طور جداگانه در پلیت‌های حاوی محیط TSA تازه، به‌صورت چمنی کشت داده شد. پس از ۵-۳ دقیقه که سطح محیط خشک شد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله مناسب به‌وسیله پنس استریل بر روی سطح محیط به طوری‌که کاملاً در تماس با محیط باشد، قرار داده شدند. تمام مراحل کشت و دیسک‌گذاری در زیر هود انجام شد تا احتمال آلودگی ثانویه به حداقل برسد. سپس محیط‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شدند و در پایان، نتایج با اندازه‌گیری قطر محدوده عدم رشد و مقایسه آن‌ها با *لاکتو باسیلوس کازئی* به‌عنوان نمونه استاندارد پروبیوتیکی، اعلام شد.

توان آب‌گریزی: درصد آب‌گریزی باکتری‌های مورد بررسی با ارزیابی میزان چسبندگی با هیدروکربن‌ها با استفاده از روش Golberg و همکاران (۱۹۹۰) انجام گرفت. به‌طور خلاصه سوسپانسیون باکتریایی از هر باکتری تهیه شد، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت معادل ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. این سوسپانسیون با نسبت ۱ به ۴ با تولوئن به‌مدت دو دقیقه مخلوط گردید و پس از آن به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی شدن این زمان دو فاز آبی و روغنی ایجاد شد. جذب نوری فاز آبی در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه‌گیری شده و آب‌گریزی براساس فرمول زیر محاسبه گردید:

۱۰۰ × {جذب نوری اولیه/ (جذب نوری ثانویه– جذب نوری اولیه)} = درصد آب‌گریزی

عدم بیماری‌زایی برای ماهی: اثرات مضر احتمالی باکتری‌های مورد بررسی به‌روش Brunt و Austin (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. برای این‌کار پس از کشت و شستشوی باکتری‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی و ۳×۰^{۸} واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر (CFU/ml به‌صورت داخل صفاقی در ۵ گروه مجزا (در هر گروه تعداد ۲۰ قطعه ماهی به وزن ۵±۲۰ گرم تهیه شده از مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید ملکی خوزستان) و در سه تکرار به ماهی کپور معمولی تزریق گردید و پرورش در آکواریوم‌های جداگانه انجام گرفت. به ماهیان گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی تزریق شد. پس از گذشت هفت روز از کبد و کلیه قدامی ماهیان کشت باکتریایی تهیه شده و حضور باکتری‌ها، ارزیابی گردید.

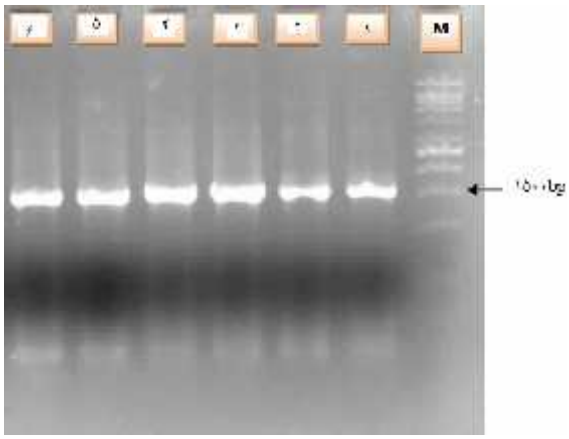
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS (نسخه ۱۹) به‌طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. به‌منظور مقایسه شاخص‌های تیمارهای تحت بررسی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی استفاده گردید. $p<۰/۰۵$ مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید. نتایج به‌صورت Means±STDV مطابق روش Kulikovsky و همکاران (۱۹۹۶) ارائه شد.

نتایج

از بین ۲۳ جدایه دارای بالاترین میزان فعالیت آنزیمی، ۵ جدایه: *Citrobacter farmeri*، *Klebsiella oxytoca*، *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae*، *Raoultella terrigena* و *Enterobacter cloacae* که به‌ترتیب از مزرعه لوبیا، بستر مزرعه پرورش کپورماهیان، ریزوسفر مزرعه شبدر و دستگاه گوارش کپور معمولی جداسازی شده بودند، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

شناسایی باکتری‌های مولد فیتاز: با توجه به نتایج مربوط به بررسی خصوصیات فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده فیتاز، Phas۳۲ مربوط به جنس *Citrobacter* و fish۱۲ مربوط به جنس *Klebsiella* می‌شد. هم‌چنین Rsh۲۱ در جنس *Raoultella*، fish۱۱ در جنس *Entrobacter* و fish ۲۲ در جنس *Klebsiella* قرار گرفتند.

شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های Phas۳۲، Rsh۲۱ و fish۱۲: به‌منظور بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده، محصول استخراج ژنوم مربوط به هر ۵ سویه الکتروفورز گردید. نتیجه حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. ۱ (FISH۱۲)، ۲ (FISH۱۱)، ۳ (FISH۲۲)، ۴ (RSH۲۱)، ۵ (PHA۳۲)، ۶ (کنترل مثبت)، M (مارکر ۵۰۰ تا ۱۰۰۰۰جفت باز). باند مشخص شده با پیکان ۱۵۰۰ جفت باز است.

تحمل نسبت به pH: در بررسی تحمل باکتری‌ها نسبت به pH، fish۱۲ و Phas۳۲ به‌صورت جزئی در pH=۲ رشد نموده و دارای بیش‌ترین توان تحمل در pH=۵ بودند. در pH=۳ نیز باکتری‌های Phas۳۲، Fish۲۲ و Rsh۲۱ دارای بیش‌ترین توان تحمل بودند درحالی‌که در این pH، *L.Casei* رشد نکرد. در نهایت تمامی باکتری‌های جداسازی‌شده دارای توان زیستی بالاتری نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* در تمامی pHهای مورد آزمایش بودند.

کم‌ترین توان تحمل در برابر اسیدیته‌های مختلف را *L.casei* داشت به‌طوری که در pHهای مختلف اختلاف معنی‌داری با دیگر باکتری‌ها دارد (p<۰/۰۵) و در مجموع بیش‌ترین توان تحمل را Phas۳۲ و Fish۱۲ داشتند.

جدول۱: تحمل pHهای مختلف جدایه‌های فیتاز مثبت (CFU/ml) به‌صورت میانگین ± انحراف معیار در طول یک‌ساعت (میانگین‌ها براساس تعداد×۱۰^۹ می‌باشد)

باکتری / pH	Fish۱۲	Phas۳۲	Fish۲۲	Fish۱۱	Rsh۲۱	*L.Casei*
۲	۱/۷۵×۱۰^۵±۰/۰۰۵	۳/۴۵×۱۰^۵±۰/۰۰۳	فاقد کلنی	فاقد کلنی	فاقد کلنی	فاقد کلنی
۳	۷/۱۵ ± ۰/۰۱	۱۲ ± ۱	۱۱/۵ ±۰/۱۴	۶/۵ ±۰/۱	۱۱/۳ ±۰/۱	فاقد کلنی
۴	۲۳/۶۵ ±۰/۰۲	۱۹/۵ ± ۰/۲	۱۹/۱۳ ± ۰/۷۵	۱۱/۴۵ ±۰/۱	۱۵/۸۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۱ ± ۰/۰۱
۵	۲۰/۲ ± ۰,۷	۱۹/۲۴ ±۰/۱۱	۰/۱ ± ۱۸/۴۵	۱۲/۸۳ ± ۰/۰۷	۲۱۴/۹ ±۳۴۶/۲	۱۱/۹ ±۱/۲۷
۶	۲۰/۵۱ ± ۰,۰۹	۱۷/۸۵ ± ۰/۰۳	۱۹/۳ ± ۰/۱۱	۱۰/۴۳ ±۰/۱۳	۱۳/۰۵ ± ۰/۰۱	۱/۸۷ ± ۰/۰۲
۷	۱۷/۵ ± ۰,۱۱	۱۴/۶۶ ± ۰/۰۱۵	۱۵/۵۴ ± ۰/۱۱	۱۳/۰۸ ±۰/۹۹	۱۸/۲ ±۰/۱۲	۲/۰۹ ±۱/۰۱
۸	۱۷/۱ ± ۰,۰۱	۱۶/۴۵ ±۰/۰۰۵	۱۷/۹۵ ±۰/۰۳	۹/۶۲ ±۰/۰۱	۱۴/۴ ±۰/۲۶	۲۵ ± ۱
۹	۱۰/۴۵ ± ۰/۰۲	۱۱/۱ ±۰/۰۲	۱۲/۴۶ ± ۰/۰۱	۶/۲۳ ± ۰/۰۸	۱۱/۶ ± ۰/۰۸	۰/۹۳ ± ۰/۳

تحمل نسبت به صفرا: باکتری‌های فیتاز مثبت مورد بررسی، در غلظت‌های ۰/۵ و ۳ درصد نمک‌های صفراوی رشد زیادی داشتند و در رقت‌های مشخص شده قابل شمارش نبودند (بالای ۵۰۰ کلنی در پلیت) هرچند در مورد *لاکتوباسیلوس کازئی* کاهش تعداد باکتری شمارش شده در این غلظت‌ها مشاهده گردید. در بقیه غلظت‌های نمک‌های صفراوی تغییرات تعداد باکتری شمارش شده از نظر آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵)، به‌طوری‌که غلظت‌های ۵، ۷ و ۹ درصد نمک‌های فوق اثر بازدارنده‌ای بر رشد باکتری‌های فیتاز مثبت نداشتند، البته در مورد باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، کاهش معنی‌دار رشد باکتری با افزایش غلظت نمک‌های صفراوی (از ۰/۵ تا ۹درصد) مشاهده گردید.

جدول۲: تحمل جدایه های فیتاز مثبت (واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر) به‌صورت میانگین ± انحراف معیار در غلظت‌های متفاوت صفرا در طول یک‌ساعت (میانگین‌ها براساس تعداد^۹۱۰ × می‌باشد)

باکتری / غلظت‌نمک	Fish۱۲	Phas۳۲	Fish۲۲	Fish۲۲	Rsh۲۱	*L.Casei*
۰/۵	*غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۰/۴۴ ± ۰/۰۵
۳	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۰/۳۳ ±۰/۰۱۵
۵	۰/۶۲±۰/۰۰۳	۰/۳۹ ± ۰/۰۴	۰/۶۵ ±۰/۰۴	۱/۰۸ ±۰/۰۰۴	۰/۵۴ ±۰/۰۲	۰/۲۵ ± ۰/۰۴
۷	۰/۶۳ ± ۰/۰۵	۰/۴۴ ±۰/۰۳	۰/۷۷ ±۰/۰۶	۰/۹۲ ±۰/۰۲۳	۰/۶۳ ±۰/۰۷	۰/۱۶ ±۰/۰۳
۹	۰/۳۹ ± ۰/۰۷	۰/۴۳ ± ۰/۱	۰/۵۶ ±۰/۱۱	۰/۹۸ ± ۰/۱	۰/۶۲ ± ۰/۲۲	فاقد کلنی
شاهد	۰/۷۵ ± ۰/۱۱	۰/۴۷ ± ۰/۰۸	۰/۸۵ ± ۰/۱۱	۱/۲۶ ± ۰/۱۷	۰/۸۲ ±۰/۱۶	۰/۹۹±۰/۱۱

* تعداد کلونی‌ها بیش از ۵۰۰ بودند.

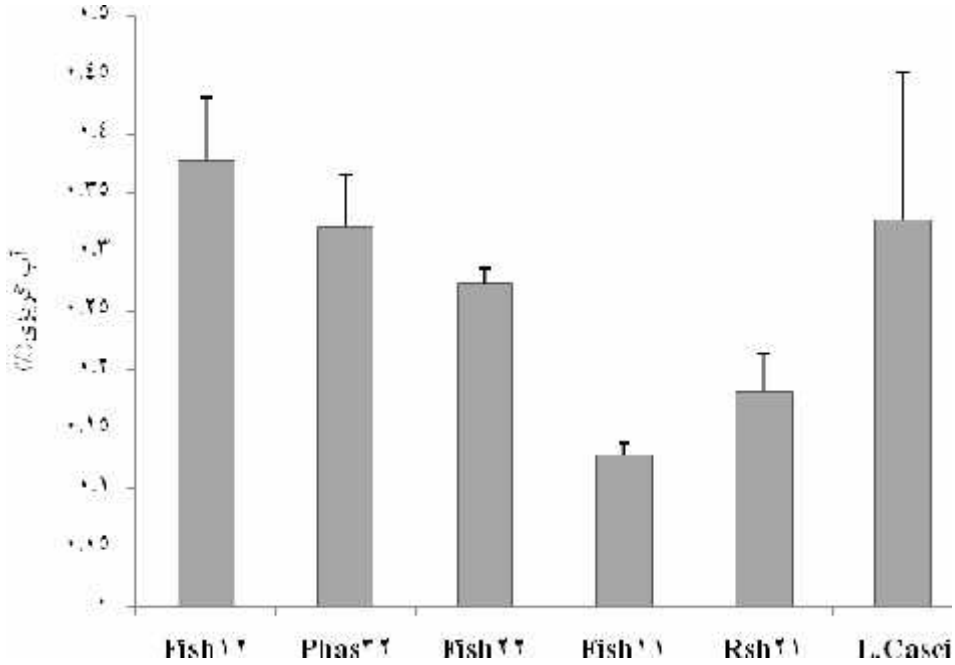
ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی: در ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی مشخص شد که همه جدایه‌های فیتاز مثبت فاقد فعالیت آنتاگونیستی بودند اما *لاکتوباسیلوس کازئی* فعالیت آنتاگونیستی خود را بر علیه دو باکتری بیماری‌زای *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* نشان داد.

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام: نتایج مربوط به آنتی‌بیوگرام باکتری‌های تولیدکننده فیتاز مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طورکه در جدول مشخص است اکثر باکتری‌ها دارای مقاومت مشابه در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج می‌باشند، البته جدایه Fish۱۲ تقریباً نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان داد.

جدول۳: آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌های فیتاز مثبت (واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر) بصورت میانگین ± انحراف‌معیار در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رای

آنتی‌بیوتیک / باکتری	استرپتومایسین	فلورفنیکل	تتراسایکلین	اریترومایسین	لینکومایسین	فورازولیدون
Fish۲۲	۱۷±۲/۶	۲۴/۳±۱/۱	۱۶/۳±۱/۱	۵±۵	۱۹/۳±۱/۱	۱۹±۱/۷
Rsh۲۱	۱۲±۳	۲۷±۳	۱۸±۱	۰	۲۰/۶±۳	۲۱/۳±۱/۵
Fish۲۲	۱۴±۱/۷	۲۴±۱	۱۴±۱	۰	۲۰/۳±۰/۵۷	۲۱±۱
Phas۳۲	۱۳±۱	۲۵±۵	۱۶/۶±۳	۱±۰	۲۷±۲/۵	۲±۵
Fish۱۲	۱۴±۱	۳۱/۳±۱/۵	۱۴/۶±۰/۵۷	۰	۲۰/۶±۱/۱	۲۲/۶±۰/۵۷
L.Casei	۱±۰	۳۷±۲/۵	۲۵±۵	۲۷/۶±۲/۵	۲۵±۱	۲۷/۶±۲/۵

توان آب‌گریزی: توان آب‌گریزی باکتری‌های فیتاز مثبت مورد بررسی در شکل ۱ آورده شده است. به‌جز گونه Fish۱۱ تفاوت معنی‌داری بین توان آب‌گریزی بقیه باکتری‌ها مشاهده نگردید($p>۰/۰۵$) و بیش‌ترین توان آب‌گریزی را Fish۱۲ داشت.



شکل ۱: توان آب‌گریزی باکتری‌های فیتاز مثبت مورد بررسی (نتایج براساس میانگین ±انحراف معیار بیان شده است)

عدم بیماری‌زایی برای ماهی: بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها در مطالعات درون تنی نشان داد که باکتری‌های مورد بررسی که توانایی تولید فیتاز را داشتند، در تزریق داخل صفاقی هیچ‌گونه تلفات و ضایعه بافتی مشخص در ماهی کپور معمولی ایجاد ننمودند.

بحث

کاهش هزینه خوراک از عمده‌ترین روش‌های توسعه آبزی پروری است و به این منظور جایگزین نمودن منابع پروتئین دامی با پروتئین گیاهی مناسب‌ترین روش می‌باشد، یکی از عوامل محدودکننده استفاده از منابع پروتئین گیاهی وجود نمک‌های فیتات است که علاوه بر دسترسی زیستی ناچیز فسفر، آلودگی محیط زیست و ممانعت جذب مواد معدنی و آلی در روده را باعث می‌شوند. آنزیم فیتاز با تجزیه املاح فیتات علاوه بر بالا بردن دسترسی زیستی فسفر، مانع اثرات منفی آن‌ها می‌گردد (Choi و همکاران، ۲۰۰۱؛ Kim و همکاران، ۱۹۹۸). باکتری‌های تولید کننده فیتاز راهکار مناسبی برای تجزیه فیتات خوراک می‌باشند (Greiner و Konietzny، ۲۰۰۶). لذا در این تحقیق توان پروبیوتیکی باکتری‌هایی که در مطالعه ابراهیمیان (۱۳۹۳) از بین ده‌ها باکتری جدا شده از منابع کشاورزی و آبزی‌پروری دارای بیش‌ترین توان تولید فیتاز بودند، بررسی گردید. ۵ جدایه باکتری که بیش‌ترین تولید آنزیم فیتاز را نشان دادند شامل *Citrobacter farmeri* strain، *Raoultella terrigena* strain، *Klebsiella oxytoca* strain، *Klebsiella penumonia* strain و *Entrobacter cloacae strain* بودند. تحقیقات زیادی در زمینه جداسازی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز در جهان صورت گرفته است، Khan و همکاران (۲۰۱۱)، جداسازی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز را از دستگاه گوارش چهار گونه ماهی کپور انجام دادند. هم‌چنین Roy و همکاران (۲۰۰۹) ، باکتریای‌های تولیدکننده فیتاز را در دستگاه گوارش چند گونه ماهی استخوانی آب‌شیرین پرورش یافته در زیستگاه‌های غذایی مختلف جداسازی نمودند. Shobirin و همکاران (۲۰۰۹) از مزرعه ذرت در مالزی و حسین‌خانی و همکاران (۲۰۰۹) از خاک و مدفوع ماکیان موفق به جداسازی باکتری‌های تولید کننده فیتاز شدند.

پروبیوتیک‌ها میکروب‌هایی هستند که وقتی به غذا اضافه شوند، ضمن بی‌خطر بودن، بر سلامتی و رشد میزبان نیز تأثیر مثبت می‌گذارند (Vijavabaskar و Somasundaram، ۲۰۰۸). در مطالعات مربوط به بررسی توان پروبیوتیکی باکتری‌ها، اولین مرحله بررسی عدم بیماریزایی باکتری در میزبان می‌باشد (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳؛Ringo و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج تحقیق جاری نشان داد که هیچ‌کدام از باکتری‌های مورد بررسی برای ماهی کپورمعمولی بیماری‌زایی نداشته و در تزریق داخل صفاقی با غلظت $۱۰^{۱۰}$ نیز بعد از ده روز هیچ‌گونه علائم بیماری یا تلفاتی در ماهی‌ها ایجاد نشد. Sica و همکاران (۲۰۱۲) نیز بر عدم بیماری‌زایی باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از محیط در قزل‌آلای رنگین‌کمان تاکید نمودند و باکتری‌های دارای توان پروبیوتیکی را به شرط عدم بیماری‌زایی در تزریق داخل صفاقی یا عضلانی در ماهی، ارزشمند دانسته‌اند. شاخصه مهم دیگری که در بررسی توان پروبیوتیکی باکتری‌ها اهیمت دارد، توان تحمل شرایط اسیدی و pHهای پایین است تا امکان عبور باکتری از معده و رسیدن به روده وجود داشته باشد. در تحقیق جاری هر ۵ جدایه تولیدکننده فیتاز دارای قدرت تحمل بالایی در pHهای اسیدی (pH=۳) بودند و حتی جدایه‌های Fish۱۲ و Phas۳۲ توان تحمل pH=۳ را به‌مدت یک‌ساعت داشتند. همه جدایه‌ها تحمل اسیدی مشابه یا بالاتری نسبت به شاهد مثبت (*لاکتوباسیلوس کازئی*) داشتند که با نتایج Succi و همکاران (۲۰۰۵) در مورد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جدا شده از پنیر و محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) در مورد لاکتوباسیلوس‌های جداشده از روده ماهی هم‌خوانی دارد. البته گزارشاتی از تحمل pH=۱ به‌مدت یک ساعت توسط برخی باکتری‌ها وجود دارد (Maragkoudakis و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعات مشابه تحمل pHهای در حد ۳ برای باکتری‌های کاندید پروبیوتیکی ارائه شده است (Tulini و همکاران، ۲۰۱۳). هم‌چنین Singh و همکاران (۲۰۱۳) توان تحمل شرایط اسیدی (pH=۵/۵) را برای باکتری تولیدکننده فیتاز گزارش نمودند. البته در بین جدایه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($p<۰/۰۵$). لذا می‌توان از نظر این شاخص هر ۵ جدایه را دارای شرایط مناسب پروبیوتیکی دانست.

اثرات ضدباکتریایی یکی از ویژگی‌هایی است که به باکتری‌های پروبیوتیکی نسبت داده می‌شود. اولین‌بار در مورد وجود خاصیت مهارکنندگی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا مانند جنس *آئروموناس*، در باکتری‌های آب شیرین توسط Ochoa و Olmos(۲۰۰۶) گزارش شد. از آن پس اثر آنتاگونیستی پروبیوتیک‌ها بر عوامل پاتوژن به‌وفور مورد بررسی قرار گرفته است (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸). پروبیوتیک باید با گونه هدف سازگاری داشته باشد چون در این‌صورت شانس بهتری برای رقابت با میکروب‌های بومی روده و استقرار در میزبان جدید را خواهد داشت. اثر ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها به تولید آنتی‌بیوتیک، باکتریوسین، سیدروفور، لیزوزیم و پروتئازهای ضدمیکروبی مربوط می‌شود (Verrth و همکاران، ۲۰۰۶؛ Sugita و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه جاری باکتری‌های تولیدکننده فیتاز مورد بررسی اثر ضدباکتریایی (آنتاگونیستی) چندانی در

برابر دو باکتری بیماریزای ماهی (*آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری*) نداشتند. در صورتی‌که *لاکتوباسیلوس کازئی* اثرات ضدباکتریایی در برابر این دو باکتری نشان داد که با نتایج محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) در مورد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مطابقت دارد. Adolfo (۲۰۰۴) گزارش نمود که برخی باکتری‌های پروبیوتیکی قادرند که عوامل بیماری‌زای ماهی و حتی انسان را مهار نمایند و آن‌ها ایجاد حالت اسیدی ناشی از وجود غلظت بالای گلوکز را یکی از دلایل احتمالی مهار دانستند. هرچند یکی از روش‌های تاثیر پروبیوتیک‌ها اثرات ضدباکتریایی (آنتاگونیست) بر علیه باکتری‌های بیماری‌زاست (Estefanía و همکاران، ۲۰۱۴) و اغلب باکتری‌های دارای اثرات پروبیوتیکی این قدرت را دارند، ولی از اثرات پروبیوتیکی مناسب برخی باکتری‌ها، علیرغم نداشتن اثرات ضدباکتریایی مناسب در برابر عوامل بیماری‌زای گزارشاتی وجود دارد (Singh و همکاران، ۲۰۱۳؛ محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳). یکی از عوامل محدودکننده فعالیت پروبیوتیکی باکتری‌ها، صفرای ترشح شده به ابتدای روده می‌باشد، پروبیوتیک‌ها باید توان مقابله در برابر صفرا را داشته باشند تا در روده مستقر شده و اثرات خود را اعمال کنند (Perez و همکاران، ۲۰۰۱). صفرا نقشی اساسی در مکانیسم دفاعی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به‌وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارش مهره‌داران میانگین غلظت نمک‌های صفراوی در ابتدای روده ۰/۳ تا ۱/۵ درصد است، اما در این مطالعه چون تمامی جدایه‌ها قدرت تحمل غلظت‌های بالای صفرا را داشتند، غلظت‌های ۰/۵، ۳، ۵ و ۷ درصد نمک‌های صفراوی برای ارزیابی قابلیت رشد در حضور نمک‌های صفراوی انتخاب گردید و باکتری‌ها توان مقاومت در برابر این غلظت‌های نمک‌های صفراوی را نیز داشتند. در مطالعه‌ای Chateau و همکاران (۱۹۹۴)، تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد ۳۸ جدایه لاکتوباسیل بررسی گردید، رشد نیمی از جدایه‌های مورد آزمایش تحت تأثیر منفی نمک‌های صفراوی ۳ درصد قرار گرفتند. در مطالعه حاضر مقاومت باکتری‌های فیتاز مثبت در برابر نمک‌های صفراوی بالاتر از *لاکتوباسیلوس کازئی* بود لذا از لحاظ این شاخص باکتری‌های مورد بررسی توان پروبیوتیکی مناسبی را نشان دادند. احتمالاً بالا بودن مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی در بین گونه‌های مورد بررسی، ناشی از توانایی باکتری‌های اینتروکوک در کاهش اثرات دترجنتی نمک‌های صفراوی و هیدرولیز آنزیمی نمک‌های صفراوی می‌باشد (Maragkoudakis و همکاران، ۲۰۰۶). این آنزیم‌ها حلالیت صفرا را کاهش داده و اثر دترجنتی آن را ضعیف می‌کنند. با این‌حال در مورد غلظت دقیق صفرا جهت ارزیابی تحمل باکتری‌های پروبیوتیکی توافق کلی وجود ندارد (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸).

توان چسبیدن باکتری به مخاط روده یکی از ویژگی‌های پروبیوتیک‌هاست، باکتری‌های پروبیوتیکی اگر به مخاط روده نچسبند همراه مدفوع خارج شده و اثرات آن‌ها امتداد نمی‌یابد. از طرفی چسبیدن باکتری به مخاط، باعث بلاک نمودن محل چسبیدن عوامل بیماری‌زای روده‌ای می‌گردد (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pfaffl، ۲۰۰۱). توان چسبیدن باکتری به مخاط روده با خاصیت آب‌گریزی آن قابل بررسی است. هرچه خاصیت آب‌گریزی بیش‌تر باشد امکان ایجاد پیوند غیرکووالانسی بین باکتری و مخاط بالا می‌رود. در این تحقیق میزان آب گریزی باکتری‌های مورد بررسی (به‌جز جدایه Fish۱۱) توان آب‌گریزی مشابه *لاکتوباسیلوس کازئی* (شاهد مثبت) داشتند که نشان‌دهنده توان مناسب این باکتری‌ها در تثبیت در روده می‌باشد. Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) دریافتند که باکتری‌های دارای اثرات پروبیوتیکی در انسان که دارای توان آب گریزی بالایی می‌باشند، توان چسبیدن به روده انواعی از ماهی‌ها به‌ویژه توربوت و قزل‌آلا را دارند. هم‌چنین Estefanía و همکاران (۲۰۱۴) اثرات محدود آب‌گریزی دو لاکتوباسیل جدا شده از محیط آبی که دارای خاصیت پروبیوتیکی در ماهی توربوت هستند را گزارش نمودند. آن‌ها خاصیت آب‌گریزی را در امتداد اثرات پروبیوتیک موثر دانستند، به‌طوری‌که در باکتری‌های دارای خاصیت آب‌گریزی بالا، بعد از قطع تجویز پروبیوتیک به‌صورت خوراکی، اثر آن تا زمان بیش‌تری ادامه می‌یابد.

باکتری‌های پروبیوتیکی هرچه به شرایط محیطی مقاوم‌تر باشند، امکان حضور و رقابت آن‌ها در شرایط روده بیش‌تر خواهد بود، لذا مقاومت باکتری پروبیوتیکی در برابر آنتی بیوتیک‌ها نیز می‌تواند به‌عنوان شاخصی در شرایط محیطی نامناسب ارزیابی گردد (Engelbrektson و همکاران، ۲۰۰۹). از آن‌جاکه در بهداشت آبزیان گاهی برای پیش‌گیری یا درمان اجبار به استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در خوراک است، اگر پروبیوتیک مقاومت کافی را در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج نداشته باشد، اثرات آن در این مواقع از بین خواهد رفت. پروبیوتیک‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک امکان امتداد فعالیت حتی در مجاورت آن آنتی‌بیوتیک را خواهند داشت. در تحقیق جاری مقاومت جدایه‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج در آبزیان تفاوت زیادی نداشت و تقریباً تمام جدایه‌ها مقاومت مناسبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج نشان دادند، ولی کم‌ترین مقاومت را

لاکتوباسیلوس کازئی (شاهد مثبت) و بیش‌ترین مقاومت را جدایه Fish۱۱ نشان دادند. Engelbrektson و همکاران (۲۰۰۹) مقاومت پروبیوتیک بیفیدوباکتر را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی تجویز شده در انسان گزارش نمودند و از این شاخصه به‌عنوان یک ویژگی مهم در پروبیوتیک‌ها به‌ویژه در هنگام استفاده در بیماران گوارشی یاد کردند. Tulini و همکاران (۲۰۱۳) پتانسیل پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* را در برابر آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (جلوگیری‌کننده از سنتز دیواره سلول‌ها)، تتراسایکلین (جلوگیری‌کننده از سنتز پروتئین) و ریفامپسین (جلوگیری کننده از سنتز اسیدنوکلئیک) مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاکی از عدم مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مذکور بود. Arici و همکاران (۲۰۰۴) و Xanthopoulos و همکاران (۲۰۰۰) دریافتند که لاکتوباسیل‌ها می‌توانند در برابر طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاومت داشته و به‌عنوان کاندیدای پروبیوتیکی مطرح شوند.

در این مطالعه تمامی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز دارای پتانسیل پروبیوتیکی مشابهی بودند و بایستی بررسی‌های درون‌تنی در مورد این جدایه‌ها انجام شود تا در صورت مناسب بودن، بتوان به‌صورت مکمل پروبیوتیکی به غذای آبزیان اضافه گردند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از همکاری مجدانه جناب آقای سعید غلیم‌پور کارشناس بخش باکتری‌شناسی و سرکار خانم شکوهمند کارشناس ارشد بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران که در اجرای این تحقیق یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

۱. **محمدیان، ت.؛ قربانپور، م.؛ علیشاهی، م.؛ تابنده، م. و غریبی، د.، ۱۳۹۳.** جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۰، صفحات ۸۸ تا ۹۷.

۲. **ابراهیمیان، م.، ۱۳۹۲.** جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز از منابع محیطی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه شهید چمران اهواز. ۸۷ صفحه.

3. **Adolfo, B.G., 2004.** *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplements for freshwater fish. PhD Thesis, the Netherlands with Summaries in English, Dutch and Spanish, Wageningen Universities, Wageningen the Netherlands ISBN. Vol. 90, pp: 5808-5943.

4. **Arici, M.; Bilgin, B.; Sagdic, O. and Ozdemir, C., 2004.** Some characteristics of Lactobacillus isolates from infant faeces. Food Microbiol. Vol. 21, pp: 19-24 .

5. **Balcázar, J.; Vendrell, D.; Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J. and Girones, O., 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. Vol. 278, pp: 188-191 .

6. **Brunt, J. and Austin, B., 2005.** Use of u probiotic to control laclococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Diseases. Vol. 28, pp: 693-701 .

7. **Cao, L.; Wang, W.; Yang, C.; Yang, Y.; Diana, J.; Yakupitiyage, A.; Luo, Z. and Li, D., 2007.** Application of microbial phytase in fish feed. Enzyme Microbial Technol. Vol. 40, No. 4, pp: 497-507 .

8. **Chateau, N.; Deschamp, A.M. and Hadj-Sassi, A., 1994.** Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. Lett Appl Microbiol. Vol. 18, pp: 42-44 .

9. **Cheng, Z.J.J.; Hardy, R.W. and Usry, J.L., 2003.** Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. Aquaculture. Vol. 218, pp: 553-565 .

10. **Choi, Y.M.; Suh, H.J. and Kim, J.M., 2001.** Purification and properties of extracellular phytase from Bacillus sp. KHU-10. J Protein Chem. Vol. 20, No. 4, pp: 287-292 .

11. **Cosgrove, D.J., 1966.** The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. Rev Pure Appl Chem. Vol. 16, pp: 209-224 .

12. **Dorsch, J.A.; Cook, A.; Young, K.A.; Anderson, J.M.; Bauman, A.T.; Volkman, C.J.; Murthy, P.P.N. and Raboy, V., 2003.** Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. Phytochemistry. Vol. 62, No. 5, pp: 691-706 .

13. **Engelbrektson, A.L.; Korzenik, J.R.; Pittler, A.; Sanders, M.E.; Leyer, G. and Kitts, C.L., 2009.** Probiotics to minimize the disruption of faecal microbiota in healthy subjects undergoing antibiotic therapy. J. of Med. Microbiology. Vol. 58, pp: 663-670.

14. **Estefanía, M.A.; Carlos, A.; Susana. M. and Pablo, E.H., 2014.** In vitro and in vivo evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot farming. Fish Shellfish Immun. Vol. 30, pp: 1-10.

15. **FAO (Food and Agriculture Organization). 2008.** FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. Fishstat Plus: Universal software for fishery statistical time series. Aquaculture production: quantities 1950-2006, Aquaculture production: values 1984-2006; Capture production: 1950-2006; Commodities production and trade: 1950-2006; Vers. 2.30 .

16. **Garrity, G.M.; Brenner, D.J.; Krieg, N.R. and Staley, J.T., 2005.** Ergey s anual of systematic bacteriology. Second edition. Springer. Vol. 2, Part B. pp: 587-849 .

17. **Goldberg, S.; Doyle, R.J. and Rosenberg. M., 1990.** Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. J Bacteriol. Vol. 172, pp: 5650-5654 .

18. **Greiner, R. and Konietzny, U., 2006.** Phytase for Food Application. Food Tech. Biotech. Vol. 44, pp: 125-140.

19. **Grześkowiak, L.; Collado, M.C.; Vesterlund, S.; Mazurkiewicz, J. and Salminen, S., 2011.** Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus

20. **Hosseinkhani, B.; Emtiazi, G. and Nahvi, I., 2009.** Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. Afr J Biotech. Vol. 8, No.17, pp: 4229-4232

21. **Jayanth, K.; Jeyasekaran, G. and Jeya-Shakila, R., 2001.** Biocontrol of Fish Bacterial Pathogens by the Antagonistic Bacteria isolated from the Coslnl Waters of Gulf of Mannar, India. Bull Eur Assn Fish P. Vol. 21, pp: 12-18 .

22. **Khan, A.; Mandal, S.; samanta, D.; Chatterjee, S. and Ghosh, K., 2011.** Phytase-producing *Rhodococcus* sp. (MTCC 9508) from fish gut: A preliminary study. Proc Zool Soc. Vol. 64, No. 1, pp: 29-34 .

23. **Kim, Y.O.; Kim, H.K.; Bae, K.S.; Yu, J.H. and Oh, T.K., 1998.** Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DSll. Enzyme Microbial Technol. Vol. 22, No. 1, pp: 2-7 .

24. **Kulikovsky, Z.; Martin, F.J.B. and Yaron, Z., 1996.** Aomparison of two spawning inducing agent for common carp. The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh.Vol. 48, pp: 108-111 .

25. **Maragkoudakis, P.A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. and Tsakalidou, E., 2006.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. Vol. 16, pp: 189-199 .

26. **Mittal, A.; Singh, G.; Goyal, V.; Yadav, A.; Aneja, K.R.; Gautam, S.K. and Aggarwal, N.K., 2011.** Isolation and biochemical characterization of acido-thermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. Jundishapur J Microbiol. Vol. 4, No. 4, pp: 273-282.

27. **Mukesh, P.; Suma, S.; Singaracharya, M.A. and Lakshmipathi, V., 2004.** Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. World J Microbiol Biotechnol. Vol. 20, No. 5, pp: 531-534 .

28. **Nikoskelainen, S.; Salminen, S.; Bylund, G. and Ouwehand, AC., 2001.** Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Appl Environ Microbiol. Vol. 67, pp: 2430-2435.

29. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential bacteria (*Lactobacilus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunol. Vol. 15, pp: 443-452 .

30. **Ochoa, S.J.L. and Olmos, S., 2006.** The functional property of Bacillus for shrimp feeds. Food Microbiol. Vol. 23, pp: 519-525.

31. **Papatryphon, E.; Howell, R.A. and Soares, J.H., 1999.** Growth and mineral absorption by striped bass Morone saxatilis fed a plant feedstuff based diet supplemented with phytase. J World Aqua. Soc. Vol. 30, pp: 161-173.

32. **Perez-Sanchez, T.; Balcazar, J.L.; García. Y.; Halaihel, N. and Vendrell. D., 2001.** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. J Fish Dis. Vol. 34, pp: 499-507 .

33. **Rao, D.E.C.S.; Rao, K.V.; Reddy, T.P. and Reddy, V.D., 2009.** Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. Crit. Rev. Biotech. Vol. 29, No. 2, pp: 182-198 .

model system: Quantitative analysis. Aquaculture. Vol. 318, pp: 33-36 .

34. **Ravindran, V.; Bryden, W.L. and Kornegay, E.T., 1995.** Phytates: Occurrence, bioavailability, and implications in poultry nutrition. Poult Avian Biol Rev. Vol. 6, pp: 125-143 .

35. **Ringo, E.; Løvmo, L.; Kristiansen, M.; Bakken, Y.; Salinas, I. and Myklebust, R., 2010.** Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. Aquac Res. Vol. 41, pp: 451-456.

36. **Roy, T.; Mondal, S. and Ray, A.K., 2009.** Phytase producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. Aquacult Res. Vol. 40, No. 3, pp: 344-353 .

37. **Shobirin, A.M.H.; Farouk, A. and Greiner, R., 2009.** Potential phytate-degrading enzyme producing bacteria isolated from Malaysian maize plantation. Afr J Biotechnol. Vol. 8, No. 15, pp: 3540-3546 .

38. **Sica, M.G.; Brugnoni, L.I.; Marucci, P.L. and Cubitto, M.A., 2012.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. A Van Leeuw. Vol. 101, pp: 869-879.

39. **Singh, N.K.; Joshi, D.K. and Gupta, R.K., 2013.** Isolation of Phytase Producing Bacteria of Phytase Production Parameters. Jundishapur J Microbiol. Vol. 6, No. 5, pp: e6419 .

40. **Succi, M.; Tremonte, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L.; Pacifico, S. and Coppola, R., 2005.** Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano. 318 p.

41. **Sugita, H.; Hirose, Y.; Matsuo, N. and Deguchi, Y., 1998.** Production of the antibacterial substance by Bacillus spp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture. Vol. 165, pp: 269-280 .

42. **Sugiura, S.H.; Gabaudan, J.; Dong, F.M. and Hardy, R.W., 2001.** Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed soybean meal-based diets. Aquacult Res. Vol. 32, pp: 583-592 .

43. **Tulini, F.L.; Winkelströter, L.K. and De Martinis, E., 2013.** Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. Anaerobe. Vol. 22, pp: 57-63

44. **Verreth, J.; Schrama, J.; Hartemink, R. and Bucio, A., 2006.** Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiol. Vol. 23, No. 5, pp: 476-482.

45. **Vielma, J.; Ruohonen, K.; Gabaudan, J. and Vogel K., 2004.** Top spraying soybean mealbased diets with phytase improves protein and mineral digestibilities but not lysine utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult Res.Vol. 35, pp: 955-964.

46. **Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S., 2008.** Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas*. Biotechnol. Vol. 7, No. 1, pp: 124-128.

47. **Xanthopoulos, V.; Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N., 2000.** Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiol. Vol. 17, pp: 205-215.