

## 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، صندوق پستی: ۱۳۵
- مجتبی علیشاهی: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق پستی: ۱۳۵
- تکاور محمدیان\*: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق پستی: ۱۳۵
- حسین معتمدی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق پستی: ۱۳۵

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴

### چکیده

جایگزینی پروتئین حیوانی با پروتئین گیاهی از راهکارهای اصلی کاهش قیمت خوراک در آبزیان است. ۷۰ درصد فسفر در گیاهان به صورت 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 به وسیله تولید آنزیم فیتاز هستند. بدین منظور ۵ باکتری با توان بالای تولید آنزیم فیتاز شامل: ۱- *Citrobacter farmeri* (phas۳۲)، ۲- *Klebsiella oxytoca* (fish۱۲)، ۳- *Enterobacter* - *Raoultella terrigena* (Rsh۲۱) - ۴، *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae* (Fish۲۲) و ۵- *cloacae* (Fish۱۱) که از منابع مختلف کشاورزی و آبرزی پروری جداسازی شده بودند، انتخاب شدند. سپس این باکتری‌ها بر اساس شاخص‌های پروبیوتیکی شامل: مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی، خاصیت آنتاگونیستی، توان آب‌گریزی و عدم بیماری‌زایی برای ماهی مقایسه و ارزیابی گردیدند. باکتری لاکتوباسیلوس کازنی که یک پروبیوتیک پذیرفته شده آبزیان می‌باشد نیز به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. تمام ۵ جدایه مورد بررسی توان تحمل اسیددیده بهتری نسبت لاکتوباسیلوس کازنی داشتند و بیشترین توان تحمل اسیددیده را Phas۳۲ و Fish۱۲ داشتند. هم‌چنین غلظت‌های ۰/۵ تا ۳ درصد نمک‌های صفراوی تأثیری بر رشد باکتری‌های مورد بررسی نداشت ( $p > 0/05$ ). در مورد فعالیت آنتاگونیستی، هیچ‌کدام از جدایه‌های فیتاز مثبت فعالیت آنتاگونیستی در برابر دو باکتری بیماری‌زای *Yersinia ruckeri* و *Aeromonas hydrophila* نداشتند، هرچند لاکتوباسیلوس کازنی فعالیت آنتاگونیستی مناسبی در برابر این دو باکتری نشان داد ( $p > 0/05$ ). جدایه Fish۱۱ در تست آنتی بیوگرام بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک نشان داشت. در خصوص فعالیت آب‌گریزی تمام باکتری‌های مورد مطالعه، به جز Fish۱۱ بقیه باکتری‌ها توان آب‌گریزی قابل رقابت با لاکتوباسیلوس کازنی داشتند. در این مطالعه باکتری‌های تولیدکننده فیتاز دارای برخی شاخص‌های پروبیوتیکی قابل رقابت با لاکتوباسیلوس کازنی 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، به صورت مکمل پروبیوتیکی به غذای آبزیان اضافه گردند.

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

## مقدمه

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 به میزان ۵۰ درصد در موجودات شود (Mittal و همکاران، ۲۰۱۱). در طی دو دهه اخیر استفاده از فیتازهای میکروبی در رژیم‌های غذایی خوک و ماکیان به منظور افزایش استفاده از غذاهای گیاهی، بیش‌تر شده است، هم‌چنین در آبی‌پروری با افزایش فسفات قابل دسترس در دستگاه گوارش آبزبان می‌تواند مفید واقع شود. فیتازها در باکتری‌هایی مثل *Aerobacter aerogenes*، *Enterobacter sp.*، *Bacillus sp.*، *E. coli*، *Pseudomonas sp.* تولید می‌شود (Kim و همکاران، ۱۹۹۸). آنزیم‌های خوراکی فیتاز در تغذیه ماهی به صورت پودر، گرانوله و یا مایع استفاده می‌شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان باکتری‌هایی که با تغییر فلور روده باعث اثرات تحریک رشد، ایمنی و سلامت موجود می‌شوند ایده نسبتاً جدیدی است که در آبی‌پروری 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). تا به حال باکتری‌های بسیار متنوع که دارای اثرات پروبیوتیکی در ماهی‌ها هستند گزارش شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به *Lactobacillus*، *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 به منظور 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 آبزبان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. به منظور جداسازی باکتری‌های با توان تولید فیتاز، از منابع مختلف شامل:

از آن‌جا که حدود ۷۰ درصد هزینه آبی‌پروری متعلق به هزینه‌های تأمین خوراک می‌باشد (FAO، ۲۰۰۸)، توسعه آبی‌پروری منوط به استفاده از روش‌های مناسب برای افزایش کیفیت خوراک به‌ویژه در سیستم‌های کشت متراکم ماهی می‌باشد. در صنعت آبی‌پروری حدود ۸۸٪ پروتئین خوراک توسط منابع با منشأ آبزبان 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 آبزبانی که بر پایه پروتئین‌های گیاهی هستند (مانند سویا) غنی از فسفر می‌باشند (cheng و همکاران، ۲۰۰۳). اما ۷۰ درصد فسفر در گیاهان به صورت فیتات است که برای ماهیان قابل جذب نیست (Dorsch و همکاران، ۲۰۰۳). فیتیک اسید (میوااینوزیتول ۵،۴،۲،۱ و ۶-هگزاکسیس 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 افزایش بیش از حد باکتری‌ها، قارچ‌ها و پلانکتون‌ها در آب می‌شود. علاوه بر آن فیتات به پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی 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 (Viema و 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 (Papatryphon و همکاران، ۱۹۹۹). حتی برخی آنزیم‌ها از جمله پپسین، آمیلوپسین و آمیلاز

داده شده و تعداد باکتری پس از زمان فوق، با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد نمک‌های صفاوی) 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 به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون و منطقه مهار رشد (بین باکتری‌های تولیدکننده فیتاز و *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری*) با خط کش 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 از جمله استرپتومایسین، فلورفنیکل، تتراسایکلین، اریترومایسین، لینکوسپکتین 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 به مدت تقریبی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و پس از این مدت با سانتریفیوژ کردن 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 ۳-۵ دقیقه که سطح محیط خشک شد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله مناسب به‌وسیله پنس استریل بر روی سطح محیط به طوری که 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 به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در پایان، نتایج با اندازه‌گیری قطر محدوده عدم رشد و مقایسه آن‌ها با لاکتو باسیلوس کازئی به‌عنوان نمونه استاندارد پروبیوتیکی، اعلام شد.

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 داده شدند (Mukesh و همکاران، ۲۰۰۴). جدایه‌های دارای هاله شفاف به محیط PSM broth تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان فعالیت فیتاز تولید شده توسط باکتری در محلول رویی به‌روش رنگ‌سنجی مولیدات 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 تأیید 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 (fish۱۱، fish۲۲، Rsh۲۱، fish۱۲، phas۳۲) برای بررسی از نظر توان پروبیوتیکی در این تحقیق انتخاب شدند.

#### تحمل باکتری‌ها نسبت به pH:

نسبت به شرایط مختلف pH، سوسپانسیون باکتریایی از هر یک از ۵ باکتری تولیدکننده فیتاز تهیه شده و به مدت 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 به مدت ۲۴ ساعت، باکتری‌ها شمارش و میزان زنده‌مانی باکتری‌ها در شرایط مختلف اسیدی مشخص گردید (Balcazar و همکاران، ۲۰۰۸).

#### تحمل نسبت به نمک‌های صفر:

جدایه‌های به‌دست آمده نسبت به صفر از روش Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳ و ۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده شد. به‌طور خلاصه سوسپانسیون باکتری به مدت ۱ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف نمک‌های صفاوی (سدیم دئوکسی کولات و دئوکسی کولات به نسبت مساوی) (۰/۵، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱) در سه تکرار قرار



از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده گردید.  $p < 0.05$  مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید. نتایج به صورت  $\text{Means} \pm \text{STDV}$  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* و *Raoultella terrigena pneumoniae* subsp. *Ozaenae* و *Enterobacter cloacae* که به ترتیب از مزرعه لوبیا، بستر مزرعه پرورش کپور ماهیان، ریزوسفر مزرعه شبدر و دستگاه گوارش کپور معمولی جداسازی شده بودند، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

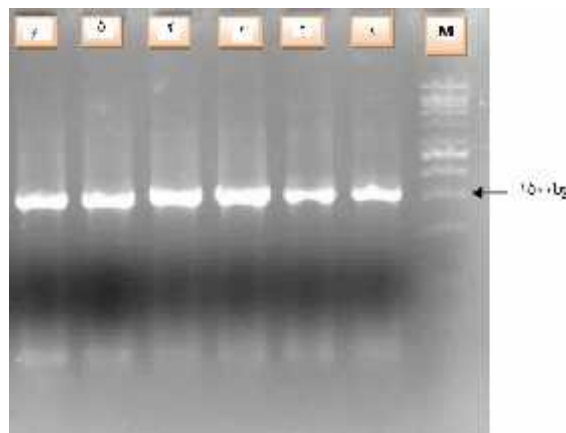
**شناسایی باکتری‌های مولد فیتاز:** با توجه به نتایج مربوط به بررسی خصوصیات فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده فیتاز، ۳۲ Phas مربوط به جنس *Citrobacter* و ۱۲ fish مربوط به جنس *Klebsiella* می‌شد. هم‌چنین ۲۱ Rsh در جنس *Raoultella* و ۱۱ fish در جنس *Entrobacter* و ۲۲ fish در جنس *Klebsiella* قرار گرفتند.

**شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های ۳۲ Phas، ۲۱ Rsh و ۱۲ fish:** به منظور بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده، محصول استخراج ژنوم مربوط به هر ۵ سویه الکتروفورز گردید. نتیجه حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است.

**توان آب‌گریزی:** درصد آب‌گریزی باکتری‌های مورد بررسی با ارزیابی میزان چسبندگی با هیدروکربن‌ها با استفاده از روش Golberg و همکاران (۱۹۹۰) انجام گرفت. به طور 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 به مدت دو دقیقه مخلوط گردید و پس از آن به مدت 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:

$100 \times \left\{ \frac{\text{جذب نوری اولیه}}{\text{جذب نوری ثانویه} - \text{جذب نوری اولیه}} \right\} = \text{درصد آب‌گریزی}$   
**عدم بیماری‌زایی برای ماهی:** اثرات مضر احتمالی باکتری‌های مورد بررسی به روش Brunt و Austin (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. برای این کار پس از کشت و شستشوی باکتری‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی  $3 \times 10^8$  واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر (CFU/ml) به صورت داخل صفاقی در ۵ گروه مجزا (در هر گروه تعداد ۲۰ قطعه ماهی به وزن  $20 \pm 5$  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 نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) به طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. به منظور مقایسه شاخص‌های تیمارهای تحت بررسی



شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. ۱ (FISH۱۲)، ۲ (FISH۱۱)، ۳ (FISH۲۲)، ۴ (RSH۲۱)، ۵ (PHA۳۲)، ۶ (کنترل مثبت)، M (مارکر ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز). باند مشخص شده با پیکان ۱۵۰۰ جفت باز است.

بالاتری نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی در تمامی pH های مورد آزمایش بودند.

کمترین توان تحمل در برابر اسیدیته‌های مختلف را *L.casei* داشت به طوری که در pH های مختلف اختلاف معنی داری با دیگر باکتری‌ها دارد ( $p < 0.05$ ) و در مجموع بیشترین توان تحمل را *Phas32* و *Fish12* داشتند.

**تحمل نسبت به pH:** در بررسی تحمل باکتری‌ها نسبت به pH، *fish12* و *Phas32* به صورت جزئی در pH=2 رشد نموده و دارای بیشترین توان تحمل در pH=5 بودند. در pH=3 نیز باکتری‌های *Phas32*، *Fish22* و *Rsh21* دارای بیشترین توان تحمل بودند در حالی که در این pH، *L.Casei* رشد نکرد. در نهایت تمامی باکتری‌های جداسازی شده دارای توان زیستی

**جدول ۱:** تحمل pH های مختلف جدایه‌های فیتاز مثبت (CFU/ml) به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در طول یک ساعت (میانگین‌ها بر اساس تعداد  $\times 10^9$  می‌باشد)

<i>L.Casei</i>	<i>Rsh21</i>	<i>Fish11</i>	<i>Fish22</i>	<i>Phas32</i>	<i>Fish12</i>	باکتری pH
فاقد کلنی	فاقد کلنی	فاقد کلنی	فاقد کلنی	$3/45 \times 10^5 \pm 0.03$	$1/75 \times 10^5 \pm 0.05$	۲
فاقد کلنی	$11/3 \pm 0.1$	$6/5 \pm 0.1$	$11/5 \pm 0.14$	$12 \pm 1$	$7/15 \pm 0.1$	۳
$0.21 \pm 0.1$	$15/82 \pm 0.02$	$11/45 \pm 0.1$	$19/13 \pm 0.75$	$19/5 \pm 0.2$	$23/65 \pm 0.02$	۴
$11/9 \pm 1/27$	$214/9 \pm 346/2$	$12/83 \pm 0.07$	$0.1 \pm 18/45$	$19/24 \pm 0.11$	$20/2 \pm 0.7$	۵
$1/87 \pm 0.02$	$13/05 \pm 0.1$	$10/43 \pm 0.13$	$19/3 \pm 0.11$	$17/85 \pm 0.03$	$20/51 \pm 0.09$	۶
$2/09 \pm 1/01$	$18/2 \pm 0.12$	$13/08 \pm 0.99$	$15/54 \pm 0.11$	$14/66 \pm 0.15$	$17/5 \pm 0.11$	۷
$25 \pm 1$	$14/4 \pm 0.26$	$9/62 \pm 0.01$	$17/95 \pm 0.03$	$16/45 \pm 0.05$	$17/1 \pm 0.01$	۸
$0/93 \pm 0.3$	$11/6 \pm 0.08$	$6/23 \pm 0.08$	$12/46 \pm 0.01$	$11/1 \pm 0.02$	$10/45 \pm 0.02$	۹

باکتری شمارش شده از نظر آماری معنی دار نبود ( $p > 0.05$ )، به طوری که غلظت‌های ۵، ۷ و ۹ درصد نمک‌های فوق اثر بازدارنده‌ای بر رشد باکتری‌های فیتاز مثبت نداشتند، البته در مورد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، کاهش معنی دار رشد باکتری با افزایش غلظت نمک‌های صفراوی (از ۰/۵ تا ۹ درصد) مشاهده گردید.

**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) هر چند در مورد لاکتوباسیلوس کازئی کاهش تعداد باکتری شمارش شده در این غلظت‌ها مشاهده گردید. در بقیه غلظت‌های نمک‌های صفراوی تغییرات تعداد

**جدول ۲:** تحمل جدایه‌های فیتاز مثبت (واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی لیتر) به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در غلظت‌های متفاوت صفرا در طول یک ساعت (میانگین‌ها بر اساس تعداد  $\times 10^9$  می‌باشد)

<i>L.Casei</i>	<i>Rsh21</i>	<i>Fish22</i>	<i>Fish22</i>	<i>Phas32</i>	<i>Fish12</i>	باکتری غلظت نمک
$0/44 \pm 0/05$	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۰/۵
$0/33 \pm 0/015$	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	۳
$0/25 \pm 0/04$	$0/54 \pm 0/02$	$1/08 \pm 0/004$	$0/65 \pm 0/04$	$0/39 \pm 0/04$	$0/62 \pm 0/003$	۵
$0/16 \pm 0/03$	$0/63 \pm 0/07$	$0/92 \pm 0/023$	$0/77 \pm 0/06$	$0/44 \pm 0/03$	$0/63 \pm 0/05$	۷
فاقد کلنی	$0/62 \pm 0/22$	$0/98 \pm 0/1$	$0/56 \pm 0/11$	$0/43 \pm 0/1$	$0/39 \pm 0/07$	۹
$0/99 \pm 0/11$	$0/82 \pm 0/16$	$1/26 \pm 0/17$	$0/85 \pm 0/11$	$0/47 \pm 0/08$	$0/75 \pm 0/11$	شاهد

\* تعداد کلونی‌ها بیش از ۵۰۰ بودند.

آنتاگونیستی خود را بر علیه دو باکتری بیماری‌زای یرسینیا راکری و آتروموناس هیدروفیلا نشان داد.

**ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی:** در ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی مشخص شد که همه جدایه‌های فیتاز مثبت فاقد فعالیت آنتاگونیستی بودند اما لاکتوباسیلوس کازئی فعالیت



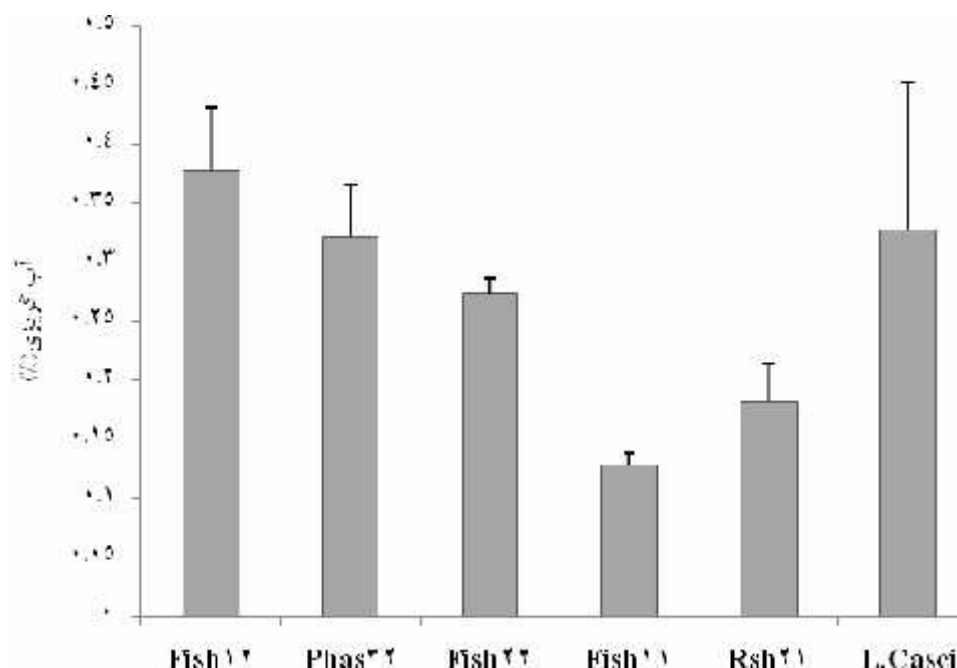
نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام: نتایج مربوط به آنتی‌بیوگرام باکتری‌های تولیدکننده فیتاز مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که در جدول مشخص است اکثر باکتری‌ها دارای مقاومت مشابه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشند، البته جدایه Fish۱۲ تقریباً نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان داد.

جدول ۳: آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌های فیتاز مثبت (واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر) بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج

آنتی‌بیوتیک	استرپتومايسين	فلورفنیکل	تتراسایکلین	اریترومایسین	لینکومايسين	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
<i>L. Casei</i>	۱±۰	۳۷±۲/۵	۲۵±۵	۲۷/۶±۲/۵	۲۵±۱	۲۷/۶±۲/۵

تفاوت معنی‌داری بین توان آب‌گریزی بقیه باکتری‌ها مشاهده نگردید ( $p > 0/05$ ) و بیش‌ترین توان آب‌گریزی را Fish۱۲ داشت.

توان آب‌گریزی: توان آب‌گریزی باکتری‌های فیتاز مثبت مورد بررسی در شکل ۱ آورده شده است. به‌جز گونه Fish۱۱



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

هیچ‌گونه تلفات و ضایعه بافتی مشخص در ماهی کپور معمولی ایجاد نمودند.

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



## بحث

کاهش هزینه خوراک از عمده‌ترین روش‌های توسعه آبی 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 (Konietzny و Greiner، ۲۰۰۶). لذا در این تحقیق توان پروبیوتیکی باکتری‌هایی که در مطالعه ابراهیمیان (۱۳۹۳) از بین ده‌ها باکتری جدا شده از منابع کشاورزی و آبی‌پروری دارای بیش‌ترین توان تولید فیتاز بودند، بررسی گردید. ۵ جدایه باکتری که بیش‌ترین تولید آنزیم فیتاز را نشان دادند شامل *Citrobacter farmeri* strain، *Raoultella Klebsiella*، *Klebsiella oxytoca* strain، *terrigena* strain، *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)، باکتری‌های 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 (Somasundaram و Vijavabaskar، 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 کپور معمولی بیماری‌زایی نداشته و در تزریق داخل صفاقی با غلظت  $10^{10}$  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 تأکید 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 اهمیت 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 به مدت یک‌ساعت داشتند. همه جدایه‌ها تحمل اسیدی مشابه یا بالاتری نسبت به شاهد مثبت (لاکتوباسیلوس کازئی) داشتند که با نتایج Succu و همکاران (۲۰۰۵) در مورد لاکتوباسیلوس رامنوسوس جدا شده از پنیر و محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) در مورد لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی هم‌خوانی دارد. البته گزارشاتی از تحمل pH=۱ به مدت 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 ( $p < 0.05$ ). 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. اولین بار 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 ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها به تولید آنتی‌بیوتیک، باکتروسین، سیدروفور، لیزوزیم و پروتئازهای ضد میکروبی مربوط می‌شود (Verrth و همکاران، ۲۰۰۶؛ Sugita و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه جاری باکتری‌های تولیدکننده فیتاز مورد بررسی اثر ضدباکتریایی (آنتاگونیستی) چندانی در

ضعیف می‌کنند. با این حال در مورد غلظت دقیق صفرها 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 غیر کووالانسی بین باکتری و مخاط بالا می‌رود. در این تحقیق میزان آب‌گریزی باکتری‌های مورد بررسی (به جز جدایه ۱۱ Fish) 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 آب‌گریزی 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک است، اگر پروبیوتیک مقاومت کافی را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های 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 آنتی‌بیوتیک‌های رایج در آبزیان تفاوت زیادی نداشت و تقریباً تمام جدایه‌ها مقاومت مناسبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج نشان دادند، ولی کم‌ترین مقاومت را

برابر دو باکتری بیماری‌زای ماهی (*آتروموناس 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 پلانناروم 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، صفرهای ترشح شده به ابتدای روده می‌باشد، پروبیوتیک‌ها باید توان مقابله در برابر صفرها را داشته باشند تا در روده مستقر شده و اثرات خود را اعمال کنند (Perez و همکاران، ۲۰۰۱). صفرها نقشی اساسی در مکانیسم دفاعی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به‌وسیله غلظت نمک‌های صفرهای تعیین می‌شود. در دستگاه گوارش مهره‌داران میانگین غلظت نمک‌های صفرهای در ابتدای روده ۰/۳ تا ۱/۵ درصد است، اما در این مطالعه چون تمامی جدایه‌ها قدرت تحمل غلظت‌های بالای صفرها را داشتند، غلظت‌های ۰/۵، ۰/۳، ۰/۵ و ۷ درصد نمک‌های صفرهای برای ارزیابی قابلیت رشد در حضور نمک‌های صفرهای انتخاب گردید و باکتری‌ها توان مقاومت در برابر این غلظت‌های نمک‌های صفرهای را نیز داشتند. در مطالعه‌ای Chateau و همکاران (۱۹۹۴)، تأثیر نمک‌های صفرهای بر روی رشد ۳۸ جدایه لاکتوباسیل برسی گردید، رشد نیمی از جدایه‌های مورد آزمایش تحت تأثیر منفی نمک‌های صفرهای ۳ درصد قرار گرفتند. در مطالعه حاضر مقاومت باکتری‌های فیتان مثبت در برابر نمک‌های صفرهای 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 صفرهای در بین گونه‌های مورد بررسی، ناشی از توانایی باکتری‌های اینتروکوک در کاهش اثرات دترجنتی نمک‌های صفرهای و هیدرولیز آنزیمی نمک‌های صفرهای می‌باشد (Maragkoudakis و همکاران، ۲۰۰۶). این آنزیم‌ها حلالیت صفرها را کاهش داده و اثر دترجنتی آن را



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 a probiotic to control lactococcosis 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 (*Oncorhynchus 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. Engelbrekton, 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

لاکتوباسیلوس کازئی (شاهد مثبت) و بیشترین مقاومت را جدایه Fish ۱۱ نشان دادند. Engelbrekton و همکاران (۲۰۰۹) مقاومت پروبیوتیک بیفیدوباکتر را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی تجویز شده در انسان گزارش نمودند و از این شاخص به‌عنوان یک ویژگی مهم در پروبیوتیک‌ها به‌ویژه در هنگام استفاده در بیماران گوارشی یاد کردند. Tulini و همکاران (۲۰۱۳) پتانسیل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلنٹاروم را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (جلوگیری‌کننده از سنتز دیواره سلول‌ها)، تتراسایکلین (جلوگیری‌کننده از سنتز پروتئین) و ریفاکسیمین (جلوگیری‌کننده از سنتز اسید نوکلئیک) 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 به‌غذای 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 کارشناسی ارشد. 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.



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.; Brugnoli, L.L.; 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.
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. DSII. *Enzyme Microbial Technol.* Vol. 22, No. 1, pp: 2-7 .
24. **Kulikovskiy, Z.; Martin, F.J.B. and Yaron, Z., 1996.** Aomparison of two spawning inducing agent for common carp. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgheh.* 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 acidothermophilic 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 Lakshmi pathi, 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, A.C., 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 (*Lactobacillus 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.; Garcia, 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 .

