

بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه باکتریایی *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NABRII66 جداسازی شده از روده ماهی قزل آلابی رنگین کمان

- **فائزه مرتضائی:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
- **مریم رویان*:** مدیریت شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
- **آریا باباخانی:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
- **رامین صیقلانی:** مدیریت شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه باکتریایی اسیدلاکتیک *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NABRII66 علیه عوامل باکتریایی بیماریزای شایع در آبی پروری و انسان توسط آزمایش‌های *in vitro* انجام شد. *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 از روده ماهی قزل آلابی رنگین کمان جداسازی شده بود. به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه باکتریایی منتخب علیه عوامل بیماریزای باکتریایی تاثیر گذار بر آزاد ماهیان و سایر گونه‌های ماهیان شامل *Aeromonas salmonicida*، *L. garvieae* و دو عامل بیماریزای دیگر شامل *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* به عنوان دو منبع شایع عفونت انسانی، از دو روش آگار دولایه و میکروتیتر پلیت استفاده شد. نتایج روش آگار دولایه، فعالیت ضد میکروبی سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 را علیه تمامی عوامل بیماریزا نشان داد و بیشترین اثر معنی دار بازدارندگی بر مهار رشد باکتری‌های بیماریزای *S. aureus* و *A. salmonicida* مشاهده گردید ($p < 0/05$). همچنین، نتایج تست میکروتیتر پلیت نشان داد که سوپرناتانت فاقد سلول سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 به طور معنی داری قادر به مهار رشد باکتری *A. salmonicida* بود ($p < 0/05$). این مطالعه نشان داد که سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 جداسازی شده از روده ماهی قزل آلابی رنگین کمان، دارای پتانسیل ضد میکروبی علیه چهار عامل باکتریایی بیماریزای شایع توسط تولید برخی ترکیبات برون سلولی بوده که باید در مطالعات بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آبی پروری، باکتری‌های اسیدلاکتیک، عوامل بیماریزای باکتریایی، فعالیت ضد میکروبی، قزل آلابی رنگین کمان



مقدمه

پروبیوتیکی، باکتری *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 دارای مقاومت بالا نسبت به شرایط دستگاه گوارش، مهار رشد باکتری بیماریزای *Streptococcus iniae* و حساسیت نسبت به ۷ آنتی بیوتیک های تجاری مهم بود. از این رو، مطالعه حاضر به بررسی اثرات ضد میکروبی سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 بر چهار عامل باکتریایی بیماریزای مختلف و شایع در آبزی پروری (*L. garvieae* و *Aeromonas salmonicida*) و مخاطره آمیز در سلامت انسان (*Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*) می پردازد.

مواد و روش ها

کشت اولیه سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66
 در مطالعه پیشین سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 در مطالعه پیشین سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* (*Oncorhynchus mykiss*) جداسازی و برخی ویژگی های پروبیوتیکی آن مورد ارزیابی قرار گرفت و چکیده ای از این نتایج در جدول ۱ موجود است (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷). به منظور شناسایی ژنوتیپی این سویه از آنالیز توالی ژنی ۱۶S rRNA بهره گرفته شد و کد دسترسی آن در سایت NCBI تحت عنوان MH620382 ثبت گردید. تمامی آزمایش های *in vitro* در آزمایشگاه بیوتکنولوژی جانوری پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، واقع در شمال کشور انجام پذیرفت. به منظور کشت اولیه، ۱ درصد از سویه باکتریایی به محیط کشت MRS broth (Merck، آلمان) تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد.

جدول ۱: ویژگی های پروبیوتیکی بررسی شده در سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷)

ویژگی های پروبیوتیکی	نتایج گزارش شده در آزمایش ها
	pH = ۲/۵ -
	pH = ۳ +
مقاومت به شرایط اسیدی	pH = ۳/۵ +
	pH = ۴ +
	pH = ۷/۵ +
مقاومت به عصاره صفراوی ماهی ۱۰٪	+
توانایی مهار رشد باکتری بیماریزای <i>S. iniae</i>	+
فعالیت همولیتیک	-
بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به ۸ آنتی بیوتیک تجاری مختلف	مقاومت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین

* علامت + نشان دهنده رشد و اثرگذاری سویه باکتریایی منتخب در هر آزمایش است.

امروزه روش های متعددی در زمینه مقابله با عوامل بیماریزای میکروبی به کار گرفته می شوند که یکی از پرکاربرد و ایمن ترین روش ها، استفاده از ترکیبات طبیعی و تولید شده از منابع طبیعی مختلف است (Cleveland و همکاران، ۲۰۰۱). این ترکیبات شامل پپتیدهای زیست فعال، سموم طبیعی، اسیدهای آلی و ترکیبات آنزیمی متعدد بوده که در مواردی قادر به عدم رشد عوامل مهاجم محیطی خواهند شد (Gildberg و همکاران، ۱۹۹۷؛ Vázquez و همکاران، ۲۰۰۴). یکی از منابع بالقوه دربرگیرنده این ترکیبات طبیعی، ارگانسیم های مفید باکتریایی هستند که تشکیل دهنده بخش عمده ای از میکروبیوم موجودات مختلف می باشند (Rodiles و Merrifield، ۲۰۱۵). دستگاه گوارش ماهیان یکی از حاملین این اکوسیستم های مفید باکتریایی است و از این نظر، هدف مورد بررسی در پژوهش های مختلف بوده است (Llewellyn و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ghanbari و همکاران، ۲۰۱۵). این جوامع باکتریایی مفید تشکیل دهنده فلور میکروبی موجودات آبزی که از دیرباز با نام پروبیوتیک شناخته می شوند، دارای کاربرد فراوانی در بهبود عملکردهای رشد، تغذیه و ایمنی ماهیان می باشند (Didinen و همکاران، ۲۰۱۸؛ Kumar و همکاران، ۲۰۱۸). *Lactococcus lactis* یکی از سویه های باکتریایی مفید تولیدکننده اسیدلاکتیک بوده که به دلیل تطبیق پذیری با شرایط مختلف محیطی از منابع متنوعی اعم از گیاهان، موجودات خشکیزی و حیوانات و لبنیات جداسازی شده است (Itoi و همکاران، ۲۰۰۹). این سویه باکتریایی مفید دارای چهار زیرگونه شامل: *L. lactis spp. L. lactis spp. hordniae*، *L. lactis spp. cremoris*، *L. lactis spp. tractae* بوده که از این میان، زیرگونه های *L. lactis spp. lactis* و *cremoris* به دلیل عملکرد مطلوب در جهت تولید ترکیبات بازدارنده طبیعی مانند باکتریوسین ها، آنزیم ها، سیدروفور و اسیدهای آلی مورد توجه محققین واقع شده اند (Rodriguez و همکاران، ۱۹۹۵؛ Moreno و همکاران، ۲۰۰۰؛ Pérez و همکاران، ۲۰۱۱). در راستای تمامی خصوصیات مفید این ارگانسیم های میکروبی، پی بردن به ساختار و شرایط تولید ترکیبات مترشحه توسط آن ها، بررسی برهم کنش های جوامع باکتریایی و اثرات متقابل این ارگانسیم های میکروبی بر یکدیگر، افق های نوینی را در جهت تولید ترکیبات درمانی طبیعی و ایمن فراهم می سازد (Vázquez و همکاران، ۲۰۰۴). در مطالعه پیشین، با بررسی ۱۴۸ سویه باکتریایی، ۵ سویه باکتریایی دارای ویژگی های پروبیوتیکی متنوعی بوده و پس از توالی یابی ژنی به عنوان زیر گونه هایی از *L. lactis* شناسایی و معرفی شدند (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷). از میان سویه های باکتریایی دارای پتانسیل



برای سوپرناتانت فاقد سلول خنثی شده نیز اعمال شد. خوانش پلیت در OD₆₃₀ در لحظات صفر و ۲۴ ساعت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (BioTek ELX808، آمریکا) انجام و نتایج براساس عملکرد بازدارندگی ارزیابی شد. براساس فرمول ارائه شده زیر (فرمول ۱)، مقادیر عملکرد بازدارندگی کم تر از یک به معنی مهار رشد عامل بیماریزا، مقادیر عملکرد بازدارندگی بیش تر از یک به معنی رشد عامل بیماریزا و عملکرد بازدارندگی برابر با یک، به معنی عدم مهار عامل بیماریزا توسط سوپرناتانت باکتریایی می باشد (Mukherjee و همکاران، ۲۰۱۷).
فرمول ۱: عملکرد بازدارندگی = OD مثبت شده سوپرناتانت باکتریایی یا سوپرناتانت خنثی شده باکتریایی (طی لحظات صفر تا ۲۴ ساعت) / OD مثبت شده سوسپانسیون باکتریایی عوامل بیماریزا (طی لحظات صفر تا ۲۴ ساعت)

آنالیز آماری: مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از تست دانکن و روش آماری One way ANOVA، در سطح معنی داری ۵ درصد از طریق نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

نتایج

فعالیت ضد میکروبی سویه باکتریایی منتخب براساس تست

آگار دولایه: نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 علیه چهار باکتری بیماریزا براساس روش آگار دولایه در شکل ۱ و ۲ گردآوری شده است. بر این اساس، سویه باکتریایی منتخب به طور معنی داری از رشد تمامی عوامل بیماریزا مورد مطالعه جلوگیری کرده و براساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، بیش ترین اثر بازدارندگی به ترتیب بر رشد عامل باکتریایی بیماریزا *A. salmonicida* و *S. aureus* ($p < 0.05$) و کم ترین اثر را در ممانعت از رشد *L. garvieae* و *E. coli* نشان داد.

فعالیت ضد میکروبی سویه باکتریایی منتخب براساس روش

میکرو تیترو پلیت: براساس نتایج تست میکرو تیترو پلیت، سوپرناتانت سویه باکتری *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 توانست از رشد تمامی باکتری‌ها به جز *L. garvieae* و *E. coli* به طور معنی داری جلوگیری کند ($p < 0.05$). نتایج این تست در جدول ۲ گردآوری شده است. pH سوپرناتانت باکتری پیش از خنثی شدن، برابر با ۴/۶۹ بود که نشان دهنده کاهش میزان pH نسبت به حالت نرمال و اولیه محیط کشت MRS broth (۶/۵) بود. از طرفی، عملکرد بازدارندگی سوپرناتانت خنثی در مهار رشد عوامل بیماریزا بیانگر کاهش معنی دار رشد عامل بیماریزا *A. salmonicida* در مواجهه با آن بود ($p < 0.05$) و اثر معنی داری در کاهش رشد سایر عوامل بیماریزا نشان نداد ($p > 0.05$).

کشت باکتری‌های بیماریزا: عوامل باکتریایی بیماری‌زای مورد

بررسی در این آزمایش شامل *L. garvieae* و *A. salmonicida* از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، *E. coli* ATCC-25922 و *S. aureus* ATCC-25923 از آزمایشگاه پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری تهیه شدند. باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* در محیط کشت (QUELAB، کانادا) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه شیکردارو هم‌چنین باکتری *L. garvieae* و *A. salmonicida* در محیط کشت TSB تحت دمای ۲۵ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب) در شرایط بی‌هوازی (۵ درصد دی‌اکسید کربن) به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

بررسی مهار رشد عوامل بیماریزا توسط روش آگار دولایه:

این بررسی براساس روش Schillinger و Lücke (۱۹۸۹) انجام پذیرفت. به طور خلاصه، ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت شده سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 به مرکز پلیت حاوی MRS agar (Merck، آلمان) تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت (کشت یک شبه) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس، از باکتری‌های بیماریزا کشت شده سوسپانسیونی با غلظت نیم مک‌فارلند تهیه و به محیط کشت آگار نرم ((Merck، آلمان) TSB+ Agar دارای دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تلقیح شدند. محیط کشت آگار نرم حاوی باکتری‌های بیماریزا به پلیت‌های حاوی سویه باکتریایی منتخب انتقال و هر پلیت در شرایط اختصاصی رشد باکتریایی بیماریزا گرمخانه‌گذاری شدند. تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار و ارزیابی نهایی توسط اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی‌متر انجام گرفت.

تهیه سوپرناتانت فاقد سلول سویه باکتریایی: پس از کشت

یک شبه باکتری، تیوب‌های حاوی سوسپانسیون تحت شرایط ۵۰۰۰ دور در دقیقه و طی مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، فاز شناور یا سوپرناتانت فاقد سلول باکتریایی جداسازی شده و به تیوب استریل انتقال یافت. پس از اندازه‌گیری pH، به دو بخش تقسیم شد که نیمی از آن، در راستای جلوگیری از اثرات بازدارندگی اسیدهای آلی تولید شده توسط سویه باکتریایی منتخب، توسط NaOH یک نرمال خنثی‌سازی (pH = ۶/۵) و در نهایت، از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرومتر گذرانده و استریل شد (Amin و همکاران، ۲۰۱۷).

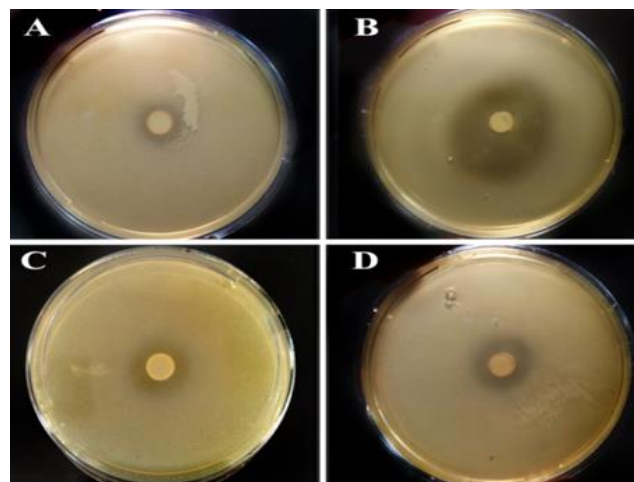
بررسی مهار رشد عوامل بیماریزا توسط روش میکرو تیترو

پلیت: این آزمایش براساس روش Ringø (۲۰۰۸) انجام شد. بر این اساس، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت فاقد سلول استریل سویه باکتریایی منتخب را به همراه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های بیماریزا به محیط کشت اختصاصی هر باکتری (TSB) به داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی در سه تکرار تلقیح گردید. تمامی موارد مذکور

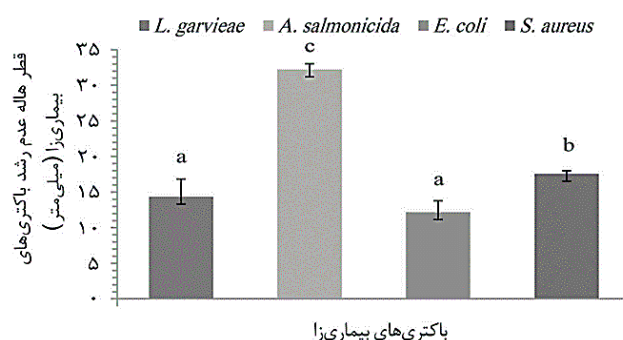


بحث

فلور میکروبی موجودات توان بالقوه‌ای در ارتقای فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی دارد. امروزه در بسیاری از مطالعات، وجود ویژگی‌های منحصر به فرد در جوامع میکروبی و اثرات متقابل آن‌ها بر ارتقای رشد و ایمنی موجودات آبی و خشکی‌زی به اثبات رسیده است (Rengpipat و همکاران، ۲۰۰۸؛ Merrifield و همکاران، ۲۰۱۱). پروبیوتیک‌ها یا جوامع میکروبی مفید موجود در دستگاه گوارش می‌توانند بر مهار رشد عوامل مهاجم محیطی اثر بگذارند و به عبارت دیگر، در صورت تایید عملکردشان به عنوان جایگزینی برای درمان‌های شیمیایی تلقی گردند (Gonçalves و Gallardo-Escárate، ۲۰۱۷؛ Rossland و همکاران، ۲۰۰۵). ویژگی بازدارندگی رشد یا آنتاگونیسم باکتریایی توسط مکانیسم‌های مختلف از جمله حذف رقابتی در اثر مصرف مواد مغذی، تولید متابولیت‌های ثانویه و تجمع‌پذیری سلول‌های باکتریایی انجام می‌پذیرد (Frick و همکاران، ۲۰۰۷؛ Balcázar و همکاران، ۲۰۰۸؛ Pérez-Sánchez و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از جمعیت‌های بومی میکروبی اثرات به مراتب بیش‌تری بر مهار رشد عوامل مهاجم با بیماری‌های موجودات داشته و این امر به دلیل جایگاه‌های چسبندگی اختصاصی در غشا و در پی آن استفاده حداکثر از منابع مغذی موجود در دستگاه گوارش است (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه اخیر مشاهده شد که کلنی‌های باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 قادر به مهار رشد عوامل شایع بیماری‌زا در روش آگار دولایه بودند. Balcázar و همکاران (۲۰۰۸) پس از بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از قزل‌آلای رنگین کمان علیه عوامل باکتریایی بیماری‌زا دریافتند که تمامی سویه‌های اسیدلاکتیک شامل سویه‌هایی از *L. lactis subsp. cremoris* قادر به مهار رشد باکتری‌هایی از قبیل *A. salmonicida*، *L. garvieae* بودند که نتایج مطالعه اخیر را تایید می‌کند. هم‌چنین، هیچ‌کدام از سویه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک علیه باکتری‌های *Renibacterium* و *Flavobacterium psychrophilum* *salmoninarum* فعالیت ضد میکروبی نشان ندادند. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مختلف *L. lactis subsp. cremoris* جداسازی شده از منابع مختلف علیه عوامل بیماری‌زا باکتریایی است. Akçelik و همکاران (۲۰۰۶)، با استفاده از روش آگار دولایه و چاهک، فعالیت ضد میکروبی دو سویه *L. lactis subsp. lactis* را به منظور استخراج و تعیین ویژگی‌های باکتروسین‌های نایسین و لاکتیسین بررسی کردند. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌ها قادر به مهار رشد انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا از قبیل *Listeria innocua* و *Enterococcus faecalis* بودند و



شکل ۱: هاله عدم رشد عوامل باکتریایی بیماری‌زا، ایجاد شده توسط سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 در تست آگار دولایه. بر اساس تصویر بالا عوامل بیماری‌زا مورد آزمایش در هر پلیت عبارتند از: A: *L. garvieae* B: *A. salmonicida* C: *E. coli* D: *S. aureus*



شکل ۲: نتایج مهار رشد چهار عامل بیماری‌زا توسط سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* NABRII66 در تست آگار دولایه. حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین هاله عدم رشد باکتریایی بر حسب میلی‌متر می‌باشد. داده‌ها بر حسب میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

جدول ۲: نتایج مهار رشد عوامل بیماری‌زا توسط سویه باکتریایی

L. lactis subsp. cremoris NABRII66 بر اساس تست میکروتیتر پلیت

عوامل بیماری‌زا	عملکرد بازدارندگی سوپرناتانت باکتریایی علیه عوامل بیماری‌زا	عملکرد بازدارندگی سوپرناتانت باکتریایی علیه عوامل بیماری‌زا
<i>L. garvieae</i>	۱/۳۷۲ \pm ۰/۰۳۷ ^{CF}	۱/۱۲۳ \pm ۰/۰۰۳ ^{CD*}
<i>A. salmonicida</i>	۰/۷۸۰ \pm ۰/۰۲۳ ^{aC}	۰/۰۴۲ \pm ۰/۰۰۱ ^{aA}
<i>E. coli</i>	۱/۳۶۶ \pm ۰/۰۳۲ ^{CF}	۱/۱۹۵ \pm ۰/۰۰۴ ^{DE}
<i>S. aureus</i>	۱/۱۱۴ \pm ۰/۰۴۹ ^{bD}	۰/۶۷۵ \pm ۰/۰۰۳ ^{eBB}

حروف کوچک لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بازدارندگی رشد هر عامل بیماری‌زا در دو تیمار سوپرناتانت باکتریایی به شکل مجزا بوده و حروف بزرگ لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار عملکرد بازدارندگی رشد سوپرناتانت اولیه و خنثی شده در مقایسه با یکدیگر می‌باشد ($p < 0.05$). داده‌ها بر حسب میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

جلوگیری کند. مطالعات دیگری مانند Zhou و همکاران (۲۰۱۰)، Balcázar و همکاران (۲۰۰۶) نتایج مشابه با مطالعه حاضر را ارائه دادند. با این حال، تایید اثرات ضد میکروبی این سویه در شرایط *in vivo* در مواجهه با عوامل بیماری‌زا نیازمند مطالعات بیشتر است. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه باکتریایی اسیدلاکتیک NABRII66 *Lactococcus lactis subsp. cremoris* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه عوامل بیماری‌زای مورد هدف در این مطالعه بود. چگونگی فعالیت ضد میکروبی، تایید وجود ترکیبات برون سلولی باکتریایی و شناسایی آن‌ها نیازمند مطالعات تکمیلی در آینده می‌باشند.

تشکر و قدردانی

کلیه فعالیت‌های علمی این تحقیق تحت حمایت مالی و پژوهشی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، واقع در شمال کشور و تحت عنوان پروژه مصوب با شناسه ۱۲۰۵۰۵۹۴۵۵۹۴۰۰۱ انجام گردید. از این‌رو، از تمامی کارشناسان و متخصصین در بخش بیوتکنولوژی جانوری به پاس مساعدت و راهنمایی‌های ارزنده سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. مرتضائی، ف.؛ رویان، م.؛ علاف نویریان، ح. و باباخانی، آ.، ۱۳۹۷. بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Streptococcus iniae* مجله علوم آبی‌پروری، دوره ۶، شماره ۳، صفحات ۴۳ تا ۵۴.
۲. Abee, T.; Krockel, L. and Hill, C., 1995. Bacteriocins: Mode of action and potentials in 266 food preservation and control of food poisoning. International Journal of Food Microbiology. Vol. 28, pp: 169-185.
۳. Akçelik, O.; Tükel, Ç.; Özcengiz, G. and Akçelik, M., 2006. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolates. Molecular Nutrition and Food Research. Vol. 50, No. 3, pp: 306-313.
۴. Amin, M.; Adams, M.; Bolch, C.J. and Burke, C.M., 2017. In vitro screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiotic candidates. Aquaculture International. Vol. 25, No. 1, pp: 485-498.
۵. Austin, B. and Austin, D.A., 2016. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, 6th edn. Springer, Dordrecht. 552 p.
۶. Balcázar, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzueta, I.; Vendrell, D.; Dolores Evora, M. and Luis Múzquiz, J., 2006. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microbial Ecology in Health and Disease. Vol. 18, No. 1, pp: 61-63.
۷. Balcázar, J. L.; Vendrell, D.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzueta, I.; Gironés, O. and Múzquiz, J. L., 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish

هیچ‌گونه اثری بر مهار رشد عامل *Bacillus cereus* نداشتند. Bromberg و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی ۸۰۰ جدایه باکتریایی جداسازی شده از محصولات گوشتی، مشاهده کردند که ۱۲۸ سویه باکتریایی اسیدلاکتیک قادر به مهار عوامل بیماری‌زای *S. aureus* CTC 033 و *B. cereus* L. innocua Lin 11 و CTC 001 بودند که از این میان تنها یک سویه باکتریایی *L. lactis subsp. cremoris* CTC 204 قادر به تولید باکتریوسین (نایسین) و مهار رشد عوامل بیماری‌زای مختلف بود. علاوه بر این، این سویه قادر به مهار رشد *E. coli* CTC 032، *Pseudomonas sp.* و *Salmonella typhimurium* ATCC 1402 نبود. نتایج مطالعات مذکور و مطالعه حاضر بیان‌گر اثر اختصاصی و وابسته به سویه در مواجهه با عوامل باکتریایی دیگر است و تفاوت در میزان مهار رشد هر عامل باکتریایی بیماری‌زا با دیگری را می‌توان به عواملی هم‌چون مواد مغذی در محیط و شرایطی از قبیل دمای رشد، pH و ارتباطات فیلوژنی مرتبط دانست (Tejero-Sariñena و همکاران ۲۰۱۲؛ Cosentino و همکاران، ۲۰۱۲). در این مطالعه، به‌منظور درک بیش‌تر از نوع مکانیسم عمل سویه باکتریایی منتخب در مواجهه با عوامل بیماری‌زای مورد نظر، اثرات ضد میکروبی سوپرناتانت تهیه شده باکتریایی و مقایسه آن با حالت خنثی (pH= ۶/۵) در روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که کاهش pH در اثر تخمیر قندی و در نهایت تولید اسیدهای آلی، نقش عمده‌ای در مهار رشد عامل بیماری‌زای *S. aureus* داشت. این درحالی است که اثر معنی‌داری بر بازدارندگی رشد *E. coli* و *L. garvieae* نداشت. هم‌چنین، سوپرناتانت باکتریایی و سوپرناتانت خنثی شده سویه باکتریایی NABRII66 *L. lactis subsp. cremoris* به‌طور معنی‌داری سبب مهار رشد عامل باکتریایی *A. salmonicida* شد. این مسئله، احتمالاً به‌وجود مکانیسم‌های دیگری نظیر تولید پپتیدهای ضد میکروبی زیست فعال علاوه بر تولید اسید آلی و اثر بالقوه آن در مهار رشد این عامل شایع بیماری‌زا اشاره دارد. ترکیباتی از قبیل پپتیدهای ضد میکروبی زیست فعال، امروزه مورد توجه بسیاری از محققین این امر قرار گرفته‌اند و بخشی از ترکیبات برون سلولی تولید شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک را تشکیل می‌دهند (Abee و همکاران، ۱۹۹۵؛ Choi و همکاران، ۲۰۰۰). اثبات حضور این ترکیبات پپتیدی و سایر متابولیت‌های ثانویه در سویه باکتریایی منتخب در این مطالعه، نیازمند مطالعات بیشتر است. عفونت ناشی از جنس *A. salmonicida* به‌عنوان عامل تیپیک بیماری فورونکولوز، سبب بروز بیماری قرچه در کیور ماهیان می‌شود و با افزایش استرس در ماهیان در ارتباط است (Austin و Austin، ۲۰۱۶). در این مطالعه، سویه باکتریایی NABRII66 *L. lactis subsp. cremoris* توانست به عنوان یک بازدارنده طبیعی، از رشد *A. salmonicida*



- intestinal histology and growth performance. Cell and Tissue Research. Vol. 344, pp: 135-146.
۲۲. Merrifield, D.L. and Rodiles, A., 2015. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In Mucosal health in aquaculture. Academic, Oxford, UK. pp: 273-295.
۲۳. Moreno, I.; Lerayer, A.L.; Baldini, V.L. and Leitão, M.F.D.F., 2000. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 31, No. 3, pp: 183-191.
۲۴. Mukherjee, A.; Dutta, D.; Banerjee, S.; Ringø, E.; Breines, E.M.; Hareide, E.; Chandra, G. and Ghosh, K., 2017. Culturable autochthonous gut bacteria in rohu, *Labeo rohita*. In vitro growth inhibition against pathogenic *Aeromonas* spp., stability in gut, bio-safety and identification by 16S rRNA gene sequencing. Symbiosis, Vol. 73, No. 3, pp: 165-177.
۲۵. 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. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, No. 6, pp: 2430-2435.
۲۶. Pérez, T.; Balcázar, J.L.; Peix, A.; Valverde, A.; Velázquez, E.; de Blas, I. and Ruiz-Zarzuela, I., 2011. *Lactococcus lactis* spp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 61, pp: 1894-1898.
۲۷. Pérez-Sánchez, T.; Ruiz-Zarzuela, I.; de Blas, I. and Balcázar, J.L., 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture. Vol. 6, pp: 133-146.
۲۸. Rengpipat, S.; Rueangrukikhit, T. and Piyatiratitivorakul, S., 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. Aquaculture Research. Vol. 39, pp: 134-143.
۲۹. Ringø, E., 2008. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. Aquaculture Resea. Vol. 39, pp: 171-180.
۳۰. Rodríguez, J.M.; Cintas, L.M.; Casaus, P.; Horn, N.; Dodd, H.M.; Hernandez, P.E. and Gasson, M.J., 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology. Vol. 78, pp: 109-115.
۳۱. Rosslund, E.; Langsrud, T.; Granum, P.E. and Sorhaug, T., 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. International Journal of Food Microbiology. Vol. 98, pp: 193-200.
۳۲. Schillinger, U., 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In Biotechnology and Food Safety. Edited by DD Bills and SD Kung. Butterworth-Heinemann, Boston, USA. pp: 55-74.
۳۳. Tejero-Sariñena, S.; Barlow, J.; Costabile, A.; Gibson, G.R. and Rowland, I., 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. Vol. 18, No. 5, pp: 530-538.
۳۴. Vázquez, J.A.; González, M.P. and Murado, M.A., 2004. Pediocin production by *Pediococcus acidilactici* in solid state culture on a waste medium: Process simulation and experimental results. Biotechnology & Bioengineering. Vol. 85, No. 6, pp: 676-682.
۳۵. Zhou, X.; Wang, Y.; Yao, J. and Li, W., 2010. Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia. International Journal of Engineering, Science and Technology. Vol. 2, No. 7, pp: 73-80.
۸. Balcázar, J.L.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J.L. and Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. Vol. 278, No. 4, pp: 188-191.
۹. Bromberg, R.; Moreno, I.; Delboni, R.R.; Cintra, H.C. and Oliveira, P.V., 2005. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 21, No. 3, pp: 351-358.
۱۰. Choi, H.J.; Cheigh, C.I.; Kim, S.B. and Pyun, Y.R., 2000. Production of a nisin-like 282 bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A isolated from kimchi. Journal of Applied Microbiology. Vol. 88, pp: 563-571.
۱۱. Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. Vol. 71, No. 1, pp: 1-20.
۱۲. Cosentino, S.; Fadda, M.E.; Deplano, M.; Melis, R.; Pomata, R. and Pisano, M.B., 2012. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. J of Biomedicine and Biotechnology. Vol. 10, pp: 1155-1163
۱۳. Didinen, B.I.; Onuk, E.E.; Metin, S. and Cayli, O., 2018. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. Aquaculture Nutrition. Vol. 24, No. 1, pp: 400-407.
۱۴. Frick, J.S.; Schenk, K.; Quitadamo, M.; Kahl, F.; Köberle, M.; Bohn, E.; Aepfelbacher, M. and Autenrieth, I.B., 2007. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. Inflammatory Bowel Diseases. Vol. 13, No. 1, pp: 83-90.
۱۵. Ghanbari, M.; Kneifel, W. and Domig, K.J., 2015. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. Aquaculture. Vol. 448, pp: 464-475.
۱۶. Gildberg, A.; Mikkelsen, H.; Sandaker, E. and Ringø, E., 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia. Vol. 352, pp: 279-285.
۱۷. Gonçalves, A.T. and Gallardo-Escárate, C., 2017. Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout. Journal of Applied Microbiology. Vol. 122, No. 5, pp: 1333-1347.
۱۸. Itoi, S.; Yuasa, K.; Washio, S.; Abe, T.; Ikuno, E. and Sugita, H., 2009. Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. Journal of Applied Microbiology. Vol. 107, No. 3, pp: 867-874.
۱۹. Kumar, P.; Jain, K.K.; Sardar, P.; Jayant, M. and Tok, N.C., 2018. Effect of dietary synbiotic on growth performance, body composition, digestive enzyme activity and gut microbiota in *Cirrhinus mrigala* finger lings. Aquaculture Nutrition. Vol. 24, No. 3, pp: 921-929.
۲۰. Llewellyn, M.S.; Boutin, S.; Hoseinifar, S.H. and Derome, N., 2014. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. Frontiers in Microbiology. Vol. 5, 207 p.
۲۱. Merrifield, D.L.; Harper, G.; Mustafa, S.; Carnevali, O.; Picchietti, S. and Davies, S.J., 2011. Effect of dietary alginate acid on juvenile tilapia intestinal microbial balance,