

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

- **سعید ضیایی‌نژاد:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، صندوق پستی: 151-63615
- **مریم ابوعلی‌درویش‌طاهری*:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، صندوق پستی: ۸۴۵۱۵-۱۵۵
- **نقیسه سادات نقوی:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، صندوق پستی: ۸۴۵۱۵-۱۵۵

تاریخ پذیرش: اسفند 1393

تاریخ دریافت: آذر 1393

چکیده

این پژوهش با هدف مقایسه جدایه‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس به دست آمده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) از لحاظ میزان فعالیت‌های آنزیمی انجام پذیرفت. بنابراین در شرایط استریل از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی نمونه‌برداری شد. پس از کشت در محیط‌های اختصاصی و انجام تست‌های بیوشیمیایی و خالص‌سازی جدایه‌های باکتریایی مختلف، فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز با استفاده از سوپستراهای اختصاصی در شش جدایه از جنس باسیلوس و دو جدایه از جنس لاکتوباسیلوس مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت ویژه هر سه آنزیم در جدایه‌های جنس باسیلوس بیش از جدایه‌های جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد. از لحاظ فعالیت پروتئاز، جدایه B9 با میانگین 6/50 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) بیش‌ترین فعالیت را داشت که دارای تفاوت معنی‌داری (در سطح 0/05) با سایر جدایه‌ها بود. بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آمیلاز به ترتیب در جدایه B9 از باسیلوس (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین 3/30) و جدایه L4 از لاکتوباسیلوس (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین 0/43) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌داری (در سطح 0/05) با هم بودند. بیش‌ترین فعالیت لیپاز نیز در جدایه‌های B9 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین 1/80) و B3 (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین 1/66) از باسیلوس مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی‌داری (در سطح 0/05) با سایر جدایه‌ها بود.

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

مقدمه

از مطالعات انتخاب باکتری‌های پروبیوتیکی براساس توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی استوار است (Gibson، 1999؛ Gatesoupe و Lesel، 1998؛ Rengpipat و همکاران، 1998؛ Rico-Mora و همکاران، 1998). به نظر می‌رسد که تولید ترکیبات مفید نیز باید هنگام انتخاب پروبیوتیک‌ها مدنظر قرار گیرد. این ترکیبات که می‌توانند برای میزبان مفید باشند شامل رنگدانه‌ها (Holmstorm و همکاران، 2002)، پروتئین‌ها (Klein و همکاران، 1998)،

در آبی‌پروری در سال 1980 برای اولین بار پیش‌بینی شد که باکتری‌هایی یافت خواهند شد که نه تنها به عنوان غذا، بلکه به عنوان کنترل‌کننده‌های بیولوژیک بیماری ماهیان و فعال‌کننده‌های چرخه مواد غذایی مفید می‌باشند (Yasuda و Taga، 1980). استفاده از باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک در آبی‌پروری در چند سال گذشته گسترش زیادی یافته است (Ziaei Nejad و همکاران، 2006)، اما به طور عمده در بسیاری



دقیقه به وسیله بنزالکونیوم کلراید (0/1 درصد) شسته شدند. در شرایط استریل قطعاتی از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش بریده شد و نمونه‌ها به‌طور جداگانه در آب شور استریل هموزن شدند و بعد فیلتر گردیدند. سپس به نمونه‌ها شوک حرارتی داده (نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای 80 درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند) و بعد به‌طور سریالی رقیق‌سازی شدند. سپس 100 میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های رقیق شده به روش کشت سطحی به‌طور جداگانه در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت پخش گردید که در این مرحله از دو محیط کشت انتخابی جهت جداسازی جدایه‌های باکتریایی استفاده شد که عبارت بودند از: محیط کشت *باسیلوس سرئوس* آگار (کیولاب، کانادا) برای انتخاب جنس *باسیلوس* و محیط کشت MRS آگار (کیولاب، کانادا) برای انتخاب جنس *لاکتوباسیلوس*.

پتری‌دیش‌ها در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت انکوبه شدند و سپس کلونی‌های باکتریایی تشکیل شده براساس واحد تشکیل-دهنده کلونی شمارش و کلونی‌ها براساس ویژگی‌های ظاهریشان شامل رنگ، فرم و اندازه در محیط‌های کشت انتخابی (Vine و همکاران، 2004) و همچنین براساس انجام تست‌های بیوشیمیایی رایج (Adams و Moss، 2002؛ Brooks و همکاران، 1998؛ Holt، 1994)، جداسازی، خالص‌سازی و کدگذاری گردیدند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی مربوط به *باسیلوس‌ها* شامل: رنگ-آمیزی گرم، تشکیل اسپور، آزمایش کاتالاز و آزمایش بی‌هوازی مطلق می‌باشد که در آزمایش بی‌هوازی مطلق جهت تمایز *باسیلوس‌ها* از کلسترییدیوم‌ها از جاربی‌هوازی استفاده شد (Brooks و همکاران، 1998؛ Holt، 1994). آزمایش‌های بیوشیمیایی مربوط به لاکتوباسیلوس‌ها شامل: رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسیدفست، آزمایش کاتالاز و آزمایش هیدرولیز آرژنین می‌باشد (Adams و Moss، 2002؛ Holt، 1994). در واقع جهت تمایز *لاکتوباسیلوس‌ها*

اسیدهای چرب (Yazawa، 1996؛ Shirasaka و همکاران، 1995)، ویتامین‌ها (Sugita و همکاران، 1991) و آنزیم‌های گوارشی (Ramirez و Dixon، 2003؛ Hansen و Olafsen، 1999) می‌باشند. آنزیم‌ها ترکیبات مفیدی هستند که برخی از باکتری‌ها قادر به تولید آن‌ها می‌باشند. این آنزیم‌های گوارشی تجزیه شیمیایی درشت مغذی‌های غذایی از قبیل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها را در دستگاه گوارش تسریع می‌کنند (Mathews و Van Holde، 1990) و باکتری‌های پروبیوتیکی که دارای چنین ویژگی باشند، می‌توانند هم در بعد بهبود کیفیت تغذیه‌ای و افزایش رشد (اگر در جیره غذایی مصرف شوند) نقش داشته باشند و هم اثرات مفیدی بر کیفیت آب داشته باشند (اگر به‌عنوان پروبیوتیک آب مصرف شوند) (ضیایی‌نژاد و همکاران، 1388). اگر عملکرد رشد و کیفیت تغذیه در آبی پروری تجاری افزایش یابد، احتمالاً هزینه‌های تولید نیز کاهش می‌یابند. بنابراین اگر ماهی‌ها بتوانند بیشتر در برابر بیماری‌ها مقاومت کنند و زنده بمانند، از نظر اندازه، مرغوب و بهتر قابل فروش می‌شوند و متعاقباً هزینه دارو و نهایتاً هزینه‌های تولید شدیداً کاهش خواهد یافت (Burr و Gatlin، 2005). از این‌رو پژوهش حاضر به‌منظور سنجش فعالیت ویژه آنزیمی در باکتری‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به‌عنوان یک معیار اولیه جهت انتخاب جدایه‌های پروبیوتیکی اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در بهار 1392 و بر روی 15 قطعه ماهی هامور معمولی جوان و سالم حاصل از صید در بندردیلم از استان بوشهر انجام شد. محل انجام تحقیق، آزمایشگاه بیولوژی دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان بود. جهت استریل نمودن سطح خارجی بدن، ماهیان به مدت یک



از اسپکتروفوتومتر (شیماتزو مدل UV-160) و پس از رسم منحنی استاندارد در مد *quantitative* در طول موج 595 نانومتر تعیین گردید.

فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش *Bernfeld* (1955) و با استفاده از سوبسترای نشاسته تعیین گردید. برای این منظور ابتدا معرف *DNS* از طریق حل نمودن 1 گرم پودر 2-هیدروکسی 3،5-دی نیترو بنزوئیک اسید در 50 میلی‌لیتر آب مقطر و اضافه نمودن 30 گرم سدیم پتاسیم تارتارات و 20 میلی‌لیتر سود 2 مولار و رساندن حجم محلول به 100 میلی‌لیتر تهیه گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم، 10 میکرولیتر از عصاره آنزیمی و 290 میکرولیتر بافر استات 0/05 مولار و 1/5 میلی-لیتر محلول نشاسته 2 درصد (حجم/وزن) در بافر استات افزوده شد. این مخلوط به مدت 10 دقیقه در حمام آب 40 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس 1 میلی‌لیتر از این مخلوط به 1 میلی‌لیتر معرف *DNS* افزوده شده و به مدت 10 دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعد جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 520 نانومتر به عنوان فعالیت آمیلاز قرائت گردید. فعالیت ویژه آمیلاز کل با تقسیم کردن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول هر نمونه بر حسب میلی‌گرم بر واحد بین‌المللی پروتئین به دست آمد.

فعالیت پروتئاز کل نیز براساس روش *Anson* (1938) تعیین گردید. به این صورت که 1 میلی‌لیتر از محلول 1/5 درصد کازئین با $\text{pH}=7$ به عنوان سوبسترا در حمام آب گرم در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس 1 میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه گردید. واکنش حاصله به مدت 15 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و سپس جهت متوقف نمودن آن 2 میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (0/4 مولار) به مخلوط افزوده شد. مخلوط حاصله

از *لوکونوستوک‌ها*، آزمایش هیدرولیز آرژنین انجام شد. باکتری‌های *باسیلوس با کد B* و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس با کد L* مشخص شدند. بعد از جداسازی باکتری‌ها، ذخایر خالص‌سازی شده این باکتری‌ها هم بر روی آگار با سطح شیب‌دار و هم در دمای 80- درجه سانتی‌گراد (با استفاده از گلیسرول استریل) نگهداری گردید (*Vine* و همکاران، 2002).

برای آماده‌سازی جدایه‌ها جهت سنجش آنزیمی، ذخیره‌ای از هر یک از باکتری‌ها در محیط کشت مارین براث (اسکارلا، اسپانیا) با تراکم 10^8 (تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه اصلی) تهیه گردید. برای این منظور یک کلونی خالص از ذخیره باکتری روی آگار با سطح شیب‌دار برداشته شد و در 500 میلی‌لیتر محیط مارین براث تلقیح و به مدت 24 ساعت در 30 درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور نگهداری گردید. براساس رابطه میزان تراکم باکتری و جذب نوری در طول موج 640 نانومتر که از پروفیل رشد باکتری به دست آمد (*Vine* و همکاران، 2002)، تراکم فوق برای هر جدایه حاصل گردید. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت 10 دقیقه در 2000g سانتریفیوژ (پارس‌آزما، ایران) شد و محلول رویی برای سنجش آنزیمی برداشت گردید.

به منظور تعیین فعالیت ویژه آنزیم ابتدا باید میزان پروتئین محلول در نمونه‌ها مشخص می‌گردید. تا با تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین، فعالیت ویژه آنزیم به دست آید.

میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به روش *Bradford* (1976)، با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد سنجیده شد. نمونه‌های آزمایشی با افزودن 90 میکرولیتر بافر 0/05 مول *Tris* ($\text{pH}=7/8$) به همراه 1 میلی‌لیتر معرف برادفورد به 10 میکرولیتر عصاره آنزیمی به دست آمد. به این صورت میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به وسیله دستگاه



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

نتایج

در این پژوهش شش جدایه مربوط به جنس *باسیلوس* (با کدهای B₂، B₃، B₅، B₇، B₈ و B₉) و دو جدایه مربوط به جنس *لاکتوباسیلوس* (با کدهای L₃ و L₄) از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی جداسازی و خالص‌سازی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که هر 8 جدایه باکتریایی به‌دست آمده از هامور معمولی دارای توانایی تولید هر سه نوع آنزیم گوارشی یا حداقل یکی از آن‌ها می- باشند. اما بین فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در جدایه‌های مختلف تفاوت چشمگیری مشاهده شد. در کل، باکتری‌های جنس *باسیلوس* از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در مقایسه با باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس*، در وضعیت بالاتر و بهتری قرار داشتند (شکل‌های 1، 2 و 3). همچنین از لحاظ فعالیت ویژه هر سه آنزیم در تمام حالات جدایه‌های B₉ و B₃ باکتری‌های بسیار فعالی بودند. از لحاظ فعالیت‌های پروتئازی، به‌طور کلی جدایه‌های B₉، B₈ و B₃ باکتری‌های فعالی بودند. ولی بالاترین میزان فعالیت پروتئازی به جدایه B₉ با میانگین 6/50 (میلی- گرم/واحد بین‌المللی پروتئین) تعلق گرفت که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها بود (شکل 1). از بین جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* نیز جدایه L₄ فعالیت بیشتری را نشان داد.

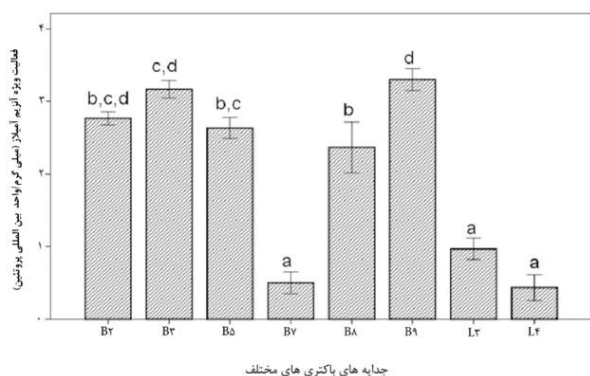
فیلتر گردید و 2/5 میلی‌لیتر کربنات‌سدیم 0/4 مولار به 0/5 میلی- لیتر از عصاره فیلتر شده افزوده شد و سپس 0/5 میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه گردید. سپس جذب مخلوط حاصله توسط اسپکتروفتومتر به‌عنوان فعالیت پروتئاز کل در طول موج 660 نانومتر قرائت گردید. فعالیت ویژه پروتئاز کل نیز با تقسیم کردن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول هر نمونه بر حسب میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین به‌دست آمد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم لیپاز، 300 میکرولیتر سوبسترای p- نیتروفنیل‌میرستات به 200 میکرولیتر از نمونه افزوده شد و با بافر بی‌کربنات آمونیوم (25 میلی‌مولار) حاوی 0/5 درصد Triton X-100 به حجم 1000 میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به‌مدت 30 دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس به‌مدت 10 دقیقه با دور 8000g سانتریفیوژ گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم لیپاز در طول موج 405 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت ویژه لیپاز کل با تقسیم نمودن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول حاصل از هر نمونه بر حسب میلی- گرم/واحد بین‌المللی پروتئین حاصل گردید (Albro و همکاران، 1985).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها: جهت تجزیه و تحلیل داده- ها، میانگین داده‌های به‌دست آمده از فعالیت ویژه هر آنزیم با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون چند دامنه دانکن در سطح 5 درصد با هم مقایسه گردید. با توجه به این که آزمون دانکن به مقایسه میانگین‌های یک شاخص در دو یا چند گروه می‌پردازد، به کمک این آزمون میانگین داده‌های به‌دست آمده از فعالیت ویژه هر کدام از آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در جدایه‌های باکتریایی مختلف در دو یا چند گروه مورد مقایسه قرار گرفت.

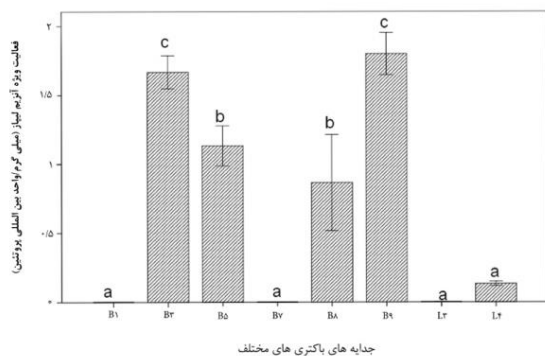




شکل 2: نمودار فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین)

بین المللی پروتئین) در جدایه های مختلف برای هر جدایه میانگین داده \pm خطای استاندارد نشان داده شده است. B نماد جدایه های باسیلوس و L نماد جدایه های لاکتوباسیلوس می باشد. جدایه هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی دار ندارند ($P < 0/05$).

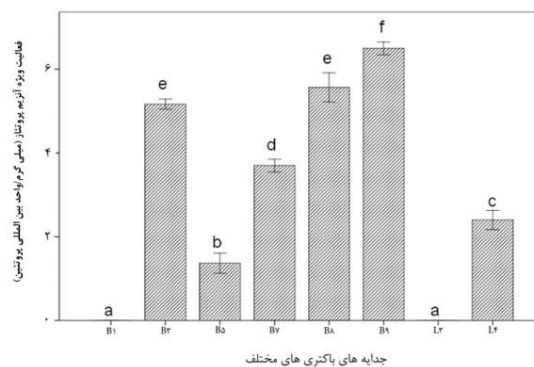
در تمام جدایه های مورد مطالعه، میزان فعالیت لیپازی کمتر از میزان فعالیت آمیلازی و پروتئنازی بود. بیشترین فعالیت ویژه آنزیم لیپاز نیز در جدایه های B9 (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین 1/80) و B3 (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین 1/66) از باسیلوس مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی داری (در سطح 0/05) با سایر جدایه ها بود (شکل 3).



شکل 3: نمودار فعالیت ویژه آنزیم لیپاز (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین) در جدایه های مختلف

برای هر جدایه میانگین داده \pm خطای استاندارد نشان داده شده است. B نماد

در همه باکتری های جداسازی شده فعالیت آمیلازی وجود داشت. به طوری که بیشترین و کمترین فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز به ترتیب در جدایه B9 از باسیلوس ها (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین 3/30) و جدایه L4 از لاکتوباسیلوس ها (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین 0/43) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی داری (در سطح 0/05) با هم بودند. البته در بین جدایه های باسیلوس جدایه های B3 (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین 3/16) و B2 (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین 2/76) فعالیت آمیلازی قابل توجهی از خود نشان دادند و از بین جدایه های لاکتوباسیلوس نیز جدایه L3 فعالیت بیشتری داشت (شکل 2).



شکل 1: نمودار فعالیت ویژه آنزیم پروتئناز (میلی گرم/واحد بین المللی پروتئین) در جدایه های مختلف

برای هر جدایه میانگین داده \pm خطای استاندارد نشان داده شده است. B نماد جدایه های باسیلوس و L نماد جدایه های لاکتوباسیلوس می باشد. جدایه هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی دار ندارند ($P < 0/05$).



جدایه‌های باسیلوس و L نماد جدایه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد. جدایه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌دار ندارند ($P < 0/05$).

بحث

همان‌طورکه پیش‌تر نیز اشاره شد، از جمله مراحل که جهت ارزیابی توان پروبیوتیکی جدایه‌های به‌دست آمده در نظر گرفته می‌شود، بررسی تولید ترکیبات مفیدی همچون آنزیم‌های گوارشی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. اگرچه فعالیت آنزیمی در طیف وسیعی از ارگانیزم‌ها از جمله گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارد (رسولی و همکاران، 1388)، ولی فعالیت آنزیمی با منشاء میکروبی مصارف صنعتی داشته و به‌علاوه کشت، غربالگری و مهندسی ژنتیک باکتری‌های مولد آنزیم، آسان‌تر از سایر موجودات می‌باشد (حسینی و رضوی‌پور، 1388). در این میان نیز جنس باسیلوس طیف وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی شامل پروتئاز و آمیلاز را تولید می‌کند. می‌توان بیان نمود که ممکن است باکتری‌های تولیدکننده آنزیم نقش مهمی را در شکستن اجزاء غذا و جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش آبزیان به‌ویژه در دوران لاروی داشته باشند.

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

در همین راستا گزارش شده است که افزایش آنزیم‌ها با منشاء خارجی فاکتور رشد را در لارو ماهی شانک بهبود بخشیده است (Kolkovski و همکاران، 1993). همچنین نتیجه مشابهی نیز در مورد آزاد ماهی آتلانتیک به‌دست آمده است (Carter و همکاران، 1994). به‌علاوه ثابت شده

است که افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی باسیلوس به سیستم پرورشی لارو میگوی سفید هندی، می‌تواند با افزایش دادن آنزیم‌های گوارشی میگو، رشد و شاخص‌های تغذیه‌ای را افزایش دهد (Ziaei Nejad و همکاران، 2006). با توجه به این که مشکل بسیاری از گونه‌ها در آبی-پروری، هضم و جذب جیره‌های غذایی مصنوعی در طول دوران اولیه لاروی می‌باشد و بیان شده است که این امر به‌دلیل کمبود سطح آنزیم‌های گوارشی مسئول هضم غذا می‌باشد (Kolkovski و همکاران، 1997)، بنابراین افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی که قادر به تولید آنزیم‌های مفید هستند، امکان دارد در هضم غذاهای مصنوعی مؤثر بوده و دوره غذادهی با غذاهای زنده و نیز هزینه‌های بالای آن را کاهش دهد (ضیایی‌نژاد و همکاران، 1388).

تحقیقات گسترده در مورد استفاده از آنزیم‌ها در حیوانات و انسان‌ها، یک موقعیت اجباری را برای افزودن آنزیم‌های گوارشی به جیره‌های غذایی فراهم می‌کند. اضافه کردن این آنزیم‌ها به رژیم غذایی نه تنها به هضم غذا کمک می‌نماید بلکه ممکن است به ذخیره شدن آنزیم‌های درونی برای انجام اعمال متابولیکی مهم در بدن کمک کند. به‌علاوه تحقیقات بیش از نیم قرن گذشته در حیوانات و انسان‌ها تأیید می‌کند که آنزیم‌های مکمل می‌توانند دسترسی زیستی درشتمغذی‌ها و ریزمغذی‌ها را افزایش دهند و بروز و شدت علائم گوارشی مرتبط با هضم ضعیف یا ناقص را کاهش دهند (Wolfson و همکاران، 2008).

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

در مورد تولید آنزیم توسط باکتری‌ها تحقیقات زیادی صورت گرفته است. در این راستا گزارش شده است که باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس جداسازی شده از



کشت و مانند آن بر فعالیت آنزیم-ها تأثیرگذار می‌باشند و از طرف دیگر فعالیت آنزیمی براساس واحدهای متفاوتی بیان شده است، بنابراین مقایسه چندان بی‌نتیجه است. نتایج به دست آمده نمی‌توان انجام داد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جنس *باسیلوس* از لحاظ فعالیت های آمیلازی، پروتئازی و لیپازی در مقایسه با جنس *لاکتوباسیلوس*، در وضعیت بالاتر و بهتری قرار داشت و در کل، جدایه‌های فعال از نظر فعالیت‌های آمیلازی، پروتئازی و لیپازی، جدایه‌های B9 و B3 تشخیص داده شدند و در تمام جدایه‌های مورد مطالعه، فعالیت‌های آمیلازی وجود داشت و میزان فعالیت لیپازی کمتر از میزان فعالیت آمیلازی و پروتئازی بود. بنابراین بررسی فعالیت آنزیم‌ها به‌عنوان ترکیبات مفید در باکتری‌های جداسازی شده را می‌توان به‌عنوان یک مرحله غربالگری در انتخاب باکتری‌های پروبیوتیکی قرار داد. هر چند سنجش‌های آنزیمی در جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، این پدیده را که جدایه‌های مورد نظر حتماً در شرایط بدن آبی نیز همین مقدار فعالیت آنزیمی را از خود نشان دهند، تضمین نمی‌کند، چرا که شرایط محیط دستگاه گوارش آبیان با شرایط محیط کشت متفاوت است. همچنین در دستگاه گوارش آبیان ممکن است شرایطی حاکم باشد که باکتری قادر به استقرار و کلونی‌سازی نباشد و یا حتی ممکن است به تعدادی که در پژوهش حاضر جهت سنجش آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی به‌کار برده شد یعنی به تعداد 10^8 (تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه اصلی) نرسد. البته این امکان هم وجود دارد که دلیل عدم استقرار و یا استقرار به تعداد ناکافی باکتری‌ها، به‌خاطر نامساعد بودن شرایط دستگاه گوارش و یا بیشتر بودن سرعت شستشوی این باکتری‌ها از دستگاه گوارش نسبت به سرعت رشد آن‌ها باشد (Vine و همکاران، 2004)، ولی مسلماً

دستگاه گوارش ماهی شانک، دارای توانایی تولید آنزیم می‌باشند. به طوری که جدایه *باسیلوس* BP5 با میانگین 3/13 (میلی‌گرم/واحد بین-المللی پروتئین) بیشترین فعالیت پروتئازی را داشت. بیشترین فعالیت آمیلازی مشاهده شده (میلی-گرم/واحد بین‌المللی پروتئین 3/00) و بیشترین فعالیت لیپازی مشاهده شده (میلی‌گرم/واحد بین‌المللی پروتئین 1/40) نیز به جدایه *باسیلوس* BP6 تعلق داشت (ضیایی‌نژاد و همکاران، 1388). در مطالعات متعددی نیز فعالیت آنزیم‌های مختلف در باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* به اثبات رسیده است (Lindgren و Refai، 1984). همچنین *باسیلوس‌های* تولیدکننده آمیلاز از ماهیانی مانند کپور و تیلاپیا جداسازی شده‌اند و فعالیت آنزیمی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفته است (Sugita و همکاران، 1997). به‌علاوه مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی تولیدکننده آمیلاز، لیپاز، سلولاز و پروتئاز نیز از دستگاه گوارش ماهیان کپور هندی و چینی جداسازی شده است (Bairagi و همکاران، 2002). همچنین فعالیت آنزیم‌های مختلف در باکتری‌های جنس *باسیلوس* به اثبات رسیده است (Esakkiraj و همکاران، 2009). به‌علاوه گزارش شده است که *باسیلوس‌های* تولیدکننده آنزیم‌های آمیلاز، سلولاز و پروتئاز در مناطق جلو روده و پشت روده از مجاری معده‌ای روده‌ای ماهی لیبو بتا جداسازی شده‌اند (Mondal و همکاران، 2010). در مطالعه‌ای نیز باکتری‌های بومی تولیدکننده پروتئاز و آمیلاز از روده کپور ماهیان بزرگ هندی جداسازی شدند و نتایج حاکی از این بود که پنج تا از ده سویه شناسایی شده به جنس *باسیلوس* تعلق داشت (Ray و همکاران، 2010). در مطالعه دیگری وجود باکتری *باسیلوس* *سوبتیلیس* تولیدکننده آلکالین پروتئاز در مایع روده‌ای ماهی کپور هندی به اثبات رسیده است (Geethanjali و Subash، 2011)، ولی به دلیل این که فاکتورهای زیادی از جمله ترکیب و شرایط محیط



3. ضیایی‌نژاد، س.؛ رفیعی، غ.؛ غفله-مرمزی، ج.؛ میرواقفی، ع. و فرحمنند، ح.، 1388. بررسی تولید آنزیم توسط باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*) در شرایط *in vitro* با هدف انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی. مجله علوم و فنون دریایی. دوره 8، شماره‌های 1 و 2، صفحات 1 تا 10.
4. Adams, M.R. and Moss, MO., 2002. Food Microbiology. Second edition. Mashhad, Ferdowsi University of Mashhad Publication. 611 p.
5. Albro, P.W.; Hall, R.D.; Corbett, J.T. and Schroeder, J., 1985. Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 835, pp: 477-490.
6. Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol*. Vol. 22, pp: 79-89.
7. Bairagi, A.; Ghosh, K.S.; Kumar, S.; Sen, S.K. and Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tract. *Aquaculture International*. Vol. 10, pp: 109-121.
8. Bernfeld, P., 1955. Amylase, α and β . *Methods in Enzymology*. Vol. 1, pp: 149-158.
9. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*. Vol. 72, pp: 248-254.
10. Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A., 1998. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Twenty-first editions. Appleton and Lange Stamford, Connecticut. 740 p.
11. Burr, G. and Gatlin, D., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the world Aquaculture Society*. Vol. 36, No. 4, pp: 425-436.
12. Carter, C.G.; Houlihan, D.F.; Buchanan, B. and McCarthy, I.A., 1994. Growth and feed utilisation efficiencies of seawater *Salmo salar* L. fed a diet containing supplementary enzymes. *Aquacult Fish Manage*. Vol. 25, pp: 37-46.
13. Esakkiraj, P.; Immanuel, G.; Sowmya, S.M.; Iyapparaj, P. and Palavesam, A., 2009. Evaluations of protease producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. *Food and Bioprocess Technology*. Vol. 2, No. 4, pp: 383-390.
14. Gatesoupe, F.J. and Lesel, R., 1998. An environmental approach to intestinal microflora in fish. *Cahiers Agricult*. Vol. 7, pp: 29-35.
15. Geethanjali, S. and Subash, A., 2011. Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish *Labeo rohita*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. Vol. 3, pp: 88-95.
16. Gibson, L.F., 1999. Bacteriocin activity and probiotic activity of *Aeromonas media*. *Symp. Ser. Soc. Appl. Bacteriol*. Vol. 28, pp: 243S-248S.
17. Hansen, G.H. and Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecol*. Vol. 38, pp: 1-26.
18. Holmstorm, C.; Egan, S.; Franks, A.; McCloy, S. and Kjelleberg, S., 2002. Antifouling activities expressed

سنجش آنزیم‌ها یا هر ترکیب مفید دیگر مانند ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، اسیدهای چرب و مانند آن به-عنوان شاخصی در مراحل انتخاب پروبیوتیک‌ها مفید و دارای ارزش خواهد بود (Vine و همکاران، 2006). بنابراین با توجه به مشکلات موجود در هضم و جذب جیره‌های غذایی مصنوعی طی دوران اولیه لاروی به-دلیل کمبود سطح آنزیم‌های گوارشی مسئول هضم غذاها، امید است که افزودن جدایه‌های باکتریایی پروبیوتیکی بالقوه به‌دست آمده از این پژوهش که قادر به تولید آنزیم‌های مفید می‌باشند، بتوانند در هضم غذاهای مصنوعی مؤثر بوده و بنابراین دوره غذایی با غذاهای زنده و نیز هزینه‌های بالای آن را کاهش دهند.

در مجموع می‌توان گفت که از لحاظ فعالیت ویژه هر سه نوع آنزیم گوارشی جدایه B9 در همه حال فعال‌ترین جدایه بود. به‌دلیل طبیعت ماهی هامور معمولی که یک ماهی گوشت‌خوار می‌باشد، جدایه‌هایی که فعالیت پروتئازی بیشتری دارند جهت استفاده به‌عنوان پروبیوتیک در ماهی هامور، در اولویت می‌باشند. از این‌رو نتیجه اصلی این پژوهش براساس داده‌های موجود، این می-تواند باشد که جدایه‌های B8، B9 و B که همگی فعالیت‌های پروتئازی بالایی نشان دادند، توان تبدیل به پروبیوتیک تجاری را برای ماهی هامور معمولی دارند.

منابع

- حسینی، ف. و رضوی‌پور، ر.، 1388. بهینه‌سازی تولید لیپاز توسط سویه‌های باسیلوس جدا شده از لجن فعال. فصلنامه دانش میکروبی شناسی. سال 1، شماره 3، صفحات 1 تا 5.
- رسولی، ا.؛ موسوی‌گرگری، س.؛ سروری‌زنجانی، ر. و درویش-علیپورآستانه، ش.، 1388. تعیین خصوصیات سویه بومی گونه باسیلوس مولد آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به دما. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. دوره 8، شماره 4، صفحات 303 تا 316.



- fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters. Vol. 231, pp: 145-152.
34. Vine, N.G.; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. Vol. 30, pp: 404-427.
 35. Wolfson, D.; Olmstead, S.; Meiss, D. and Ralston, J., 2008. Making Sense of Digestive Enzymes. Klaire Labs. ProThera, Inc. 8p.
 36. Yasuda, K. and Taga, N., 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. Mer. Vol. 18, pp: 53-62.
 37. Yazawa, K., 1996. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. Lipids. Vol. 31, No. 1, pp: 297-300.
 38. Ziaei Nejad, S.; Habibi Rezaei, M.; Azari Takami, G.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A. and Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture. Vol. 252, No. 2-4, pp: 516-524.
 - by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiol Ecol. Vol. 41, pp: 47-58.
 19. Holt, J.G., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. LWW. 787 p.
 20. Klein, G.; Pack, A.; Bonaparte, C. and Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. international journal food microbiology. Vol. 41, No. 2, pp: 103-125.
 21. Kolkovski, S.; Tandler, A.; Kissil, G. and Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. Fish Physiology Biochemistry. Vol. 12, No. 3, pp: 203-209.
 22. Kolkovski, S.; Tandler, A. and Lzquierdo, M.S., 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. 148, No. 4, pp: 313-322.
 23. Lindgren, S. and Refai, O., 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. Journal of Appl. Bacterio. Vol. 51, pp: 221-228.
 24. Mathews, C.K. and van Holde, K.E., 1990. Biochemistry. Redwood City. California. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1129 p.
 25. Mondal, S.; Roy, T. and Ray, A.K., 2010. Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of Bata, *Labeo bata*. World Aquaculture Society. Vol. 41, No. 3, pp: 369-377.
 26. Ramirez, R.F. and Dixon, B.A., 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Aquaculture. Vol. 227, pp: 417-426.
 27. Ray, A.k.; Roy, T.; Mondal, S. and Ringo, E., 2010. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 1462-1469.
 28. Rengpipat, S.; Phianphak, W.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasveta, P.; Sirirat, R.; Wannipa, P.; Somkiat, P. and Piamsak, M., 1998. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. Vol. 167, No. 3-4, pp: 301-313.
 29. Rico-Mora, R.; Voltolina, D. and Villaescusa-Celaya, J.A., 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*) cultures. Aquacultural Engineering. Vol. 19, No. 1, pp: 1-6.
 30. Shirasaka, N.; Nishi, K. and Shimizu, S., 1995. Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism. Vol. 1258, No. 3-5, pp: 225-227.
 31. Sugita, H.; Miyajima, C. and Deguchi, Y., 1991. The vitamin B₁₂-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture. Vol. 92, No. 2, pp: 267-276.
 32. Sugita, H.; Kawasaki, J. and Deguchi, Y., 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. Letters Appl. Microbiol. Vol. 24, pp: 105-108.
 33. Vine, N.G.; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in

