1017-AMIWR2019

بررسی تولید آنزیم گوارشی خارج سلولی در جدایه‌های باکتریایی روده، آب و رسوبات محیط پرورش میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در شرایط برون‌تنی

زهرا محمدی مکوندی*[۱۰]، مهرزاد مصباح[۲]، داریوش غریبی[۳]، مجتبی علیشاهی[۲]، مسعود قربانپور [۳]

۱- دکتری بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
*نویسنده مسئول: z.makvandi@yahoo.com

چکیده

در آبزی پروری، پرورش میگو یک فعالیت اقتصادی بسار مهم است. از طرفی در سال‌های اخیر، استفاده از مکمل‌های غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک در صنعت پرورش میگوی دریایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. توانایی تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی در باکتری‌های پروبیوتیک یکی از معیارهای سنجش آنها است. در این بررسی ۱۸۰ نمونه روده میگو، ۲۷ نمونه آب و ۲۷ نمونه رسوب محیط پرورش میگوی وانامی در منطقه چوئبده در زمان‌های مختلف پرورش جهت بررسی باکتریایی گرفته شد. کشت نمونه‌ها در محیط‌های کشت اختصاصی ام آر اس آگار، ام وای پی آگار و کانامایسین اسکولین آزاید آگار انجام و در نهایت ۴۳ جدایه باکتریایی به دست آمد. توانایی تولید آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز، پروتئاز و فیتاز در جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده بیشتر جدایه‌های *باسیلوس* توانایی تولید آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز را داشتند در حالی‌که جدایه‌های *انتروکوکوس* و باکتری‌های اسیدلاکتیک فاقد توانایی تولید این آنزیم‌ها بودند. هیچ‌کدام از جدایه‌های مورد بررسی قابلیت تولید آنزیم فیتاز را نداشتند. بر اساس نتایج این بررسی، از جدایه‌های *باسیلوس*، می‌توان پس از بررسی‌های برون تنی و درون تنی بیشتر جهت اهداف تغذیه‌ای و استفاده از پروبیوتیک‌های بومی در پرورش آبزیان مخصوصاً میگوی وانامی در منطقه مورد مطالعه استفاده نمود.

واژه های کلیدی: آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی، میگوی وانامی، *باسیلوس*، پروبیوتیک، چوئبده.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها موجودات زنده‌ای هستند که هضم و جذب مواد غذایی را در دستگاه گوارش میزبان بهبود می‌بخشند و شرایط استقرار و زیست باکتری‌های بیماری‌زا را دشوار ساخته و در نهایت سبب بهره‌برداری بیشتر میزبان از مواد غذایی خورده شده، می‌شوند. با استفاده از پروبیوتیک‌ها نه تنها رشد و ضریب تبدیل غذایی در دام، طیور و آبزیان بهبود می‌یابد، بلکه اثرات زیان آور میکروارگانیسم‌های مضر و بروز بیماری‌ها نیز کاهش می‌یابد (کریم زاده و همکاران، ۱۳۹۴). باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند با بهینه سازی سوخت و ساز مواد غذایی و ایجاد شرایط اکولوژیکی مطلوب در سیستم‌های پرورشی سبب بهبود عملکرد رشد

شوند (Balcazar و همکاران، ۲۰۰۶). این باکتری‌ها فعالیت هضم را به واسطه تولید ویتامین‌ها و کوفاکتورها یا از طریق بهبود فعالیت‌های آنزیمی ارتقا می‌دهند (Gatesoupe، ۱۹۹۹). آنزیم‌های مترشحه از *باسیلوس*‌ها قابلیت زیادی جهت شکستن انواع مختلف کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها داشته (Sonneshein و همکاران، ۱۹۹۳) و با تبدیل آن‌ها به واحدهای کوچکتر سبب بهبود وضعیت تغذیه‌ای می‌شوند (Ochoa-Solano و Olmos- Soto، ۲۰۰۶). در مطالعات مختلفی به بررسی قابلیت تولید آنزیم توسط باکتری‌های پروبیوتیکی پرداخته شده است (ضیایی نژاد و همکاران، ۱۳۸۸؛ Suzer و همکاران، ۲۰۰۸، Nimrat و Vuthiphandchai، ۲۰۱۱). میگوی وانامی با نام علمی *Litopenaeus vannamei* و نام انگیسی White leg shrimp یا میگوی پا سفید غربی، بومی سواحل شرقی اقیانوس آرام می‌باشد و مهم‌ترین گونه میگوی خانواده پنائیده است (Alcivar-Warren و همکاران، ۲۰۰۷) که به نیمکره شرقی کره زمین نیز انتقال یافته و امروزه در کشورهای آسیای جنوب شرقی همچنین در ایران تبدیل به گونه اصلی پرورشی شده است. با توجه به لزوم بومی‌سازی صنعت پروبیوتیک به دلیل سازگاری و مزایای باکتری‌های بومی، در ایران مخصوصاً در استان خوزستان، این بررسی به منظور جداسازی باکتری‌های با قابلیت تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی از روده، آب و رسوبات محیط پرورش میگوی وانامی در منطقه چوئبده آبادان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

الف-جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

مراحل اجرایی پروژه از خرداد تا دی ماه ۱۳۹۶ جهت ارزیابی قابلیت تولید آنزیم لیپاز، آمیلاز، پروتئاز و فیتاز در جدایه‌های باکتریایی *باسیلوس*، *انتروکوکوس* و باکتری‌های اسیدلاکتیک انجام گرفت. به این منظور نمونه آب (از سه کانال آب‌رسان فعال در مجتمع پرورش میگوی چوئبده آبادان در سه زمان ابتدا، میانه و انتهای دوره پرورش) و رسوبات (از مزارع فعال ابتدایی، میانی و انتهایی سه کانال آب‌رسان در سه زمان ابتدا، میانه و انتهای دوره پرورش) تهیه گردید. نمونه‌های آب و رسوب در کنار یخ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شدند. در آزمایشگاه با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل از نمونه‌ها رقت‌های متوالی تهیه شد (Shakibazadeh و همکاران، ۲۰۱۲) و سپس ۵۰ میکرولیتر از رقت 10^{-2} رسوب و آب به محیط کشت‌های ام آر اس آگار (MRS agar) (برای جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک)، کانامایسین اسکولین آزایدآگار (KAA agar) (برای جداسازی باکتری‌های جنس *انتروکوکوس*) و محیط ام وای پی آگار (MYP agar) (برای جداسازی باکتری‌های جنس *باسیلوس*) افزوده و در سطح محیط تلقیح شد، سپس گرم‌خانه گذاری پلیت‌ها به مدت حداقل ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی برای باکتری‌های اسید لاکتیک و گرم‌خانه گذاری در اتمسفر معمولی جهت سایر باکتری‌ها انجام شد.

همچنین ۱۸۰ قطعه میگوی وانامی نیز در محدوده وزنی ۱۰-۳ گرم (از ۹ مزرعه واقع در سه کانال مجتمع و از هر مزرعه ۲۰ قطعه میگو) به صورت تصادفی صید و به صورت زنده با رعایت اصول انتقال استاندارد و هوادهی آب طی مسیر به آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. در آزمایشگاه روده میگو خارج و هموژن گردید. از رقت 10^{-1} روده هموژن شده، ۵۰ میکرولیتر روی محیط‌های ام آر اس آگار، کانامایسین اسکولین آزایدآگار و ام وای پی آگار کشت داده شد. پس از گرم‌خانه گذاری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت (جهت باکتری‌های اسید لاکتیک محیط‌های ام آر اس در جار بی-هوازی قرار داده شدند) از باکتری‌های مشکوک در محیط‌های ذکر شده، کشت مجدد تهیه شد. مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) و بررسی مورفولوژی و خصوصیات پرگنه‌ها در جدایه‌های بدست آمده از نمونه‌ها و محیط‌های کشت مختلف انجام گرفت.

ب- ارزیابی باکتری‌های تجزیه کننده اسید فیتیک

جهت ارزیابی فعالیت آنزیم فیتاز در باکتری‌های جداسازی شده، ابتدا محیط کشت اختصاصی حاوی گلوکز ۱/۵ درصد، فیتات سدیم ۰/۱ درصد، نیترات آمونیوم، ۰/۲ درصد، کلرید پتاسیم ۰/۰۵ درصد، نمک اپسوم (سولفات منیزیوم ۷ آبه) ۰/۰۵ درصد،

سولفات منگنز ۰/۰۳ درصد، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۳ درصد، کلرید کلسیم ۰/۰۱ درصد و آگار ۲ درصد تهیه شد (Mittal و همکاران، ۲۰۱۱) . سپس از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتری در محیط جامد، یک پرگنه برداشته شد و در محیط اختصاصی تهیه شده و در سه تکرار به صورت یک خط صاف کشت داده شدند. پس از آن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵-۴ روز گرم‌خانه گذاری شدند. ایجاد هاله در اطراف پرگنه‌های باکتری نشان دهنده این بود که باکتری فیتاز مثبت بوده و در غیر این صورت جدایه باکتریایی بررسی شده، فیتاز منفی گزارش گردید. باکتری PHA (*Citrobacter farmeri*) به عنوان باکتری دارای آنزیم فیتاز (کنترل مثبت) استفاده شد.

ج-ارزیابی کیفی آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی جدایه‌های باکتریایی

جهت سنجش آنزیم‌های خارج سلولی، از محیط کشت اسکیم میلک آگار برای بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز، آگار حاوی نشاسته جهت بررسی فعالیت آنزیم آمیلاز و از نوترینت آگار حاوی زرده تخم مرغ برای بررسی فعالیت آنزیم لیپاز در جدایه‌های باکتریایی استفاده گردید. پس از کشت جدایه‌های باکتریایی و سپری شدن دوره گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در محیط نوترینت آگار حاوی زرده تخم مرغ و اسکیم میلک آگار، تشکیل هاله شفاف در اطراف پرگنه‌های باکتریایی به ترتیب نشان دهنده فعالیت آنزیم لیپاز و پروتئاز بود. جهت بررسی فعالیت آنزیم آمیلاز به محیط کشت مربوطه پس از طی دوره گرم‌خانه گذاری و رشد باکتری، محلول لوگول اضافه شد و در صورت روئیت هاله شفاف در اطراف خط کشت باکتری، باکتری مورد نظر آمیلاز مثبت گزارش گردید (Ochoa-Solano و Olmos-Soto، ۲۰۰۶).

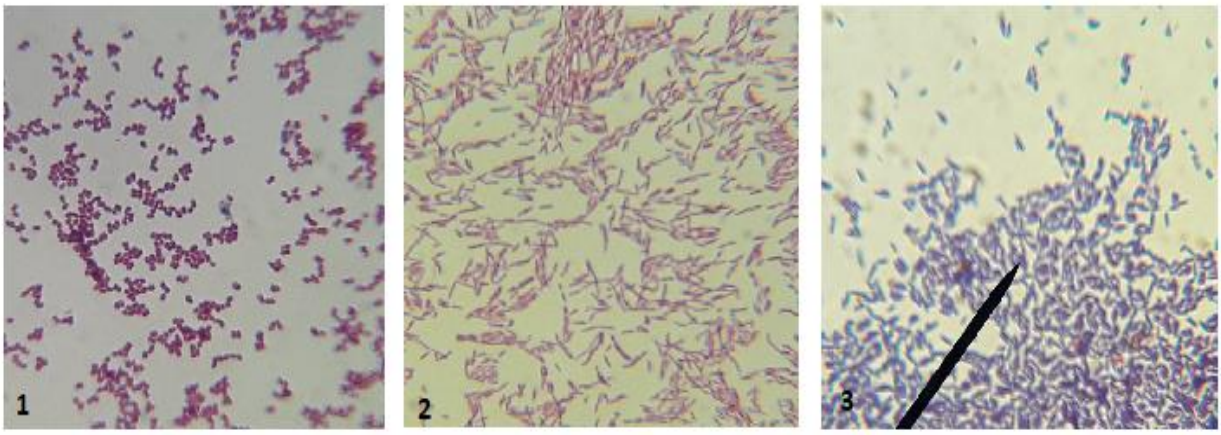
نتایج

پس از گرم‌خانه گذاری پلیت‌های ام وای پی آگار، کانامایسن اسکولین آزاید آگار و ام آر اس آگار ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از پرگنه‌های رشد یافته کشت مجدد تهیه شد و آزمایشات کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم جدایه‌ها انجام شد، سپس باکتری‌ها جهت سنجش فعالیت‌های آنزیمی انتخاب شدند (جدول شماره ۱).

پرگنه باکتری‌های لاکتیک اسید رشد یافته در محیط کشت ام آر اس آگار سفید مایل به کرم با اندازه متوسط بودند، که پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده لام با میکروسکوپ نوری به شکل میله‌ای یا کروی و گرم مثبت دیده شدند. این باکتری‌ها کاتالاز منفی، اکسیداز منفی و بدون حرکت بودند و در محیط کشت مک کانکی رشدی نشان ندادند. *باسیلوس*‌ها در محیط کشت ام وای پی آگار دارای پرگنه‌ای با اندازه متوسط تا بزرگ، مسطح، با حاشیه و سطح نامنظم و به رنگ صورتی یا زرد بودند. این باکتری‌ها پس از مشاهده در زیر میکروسکوپ به شکل میله‌ای دیده شدند و کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند. پرگنه‌های *انتروکوکووس*‌ها نیز در محیط کانامایسین اسکولین آزاید آگار، کوچک و به رنگ قهوه‌ای تا سیاه بودند و پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ به شکل کوکسی و گرم مثبت دیده شدند. این باکتری‌ها کاتالاز منفی و اکسیداز منفی بودند (شکل ۱).

جدول ۱: تعداد و نسبت باکتری‌های جدا شده از روده میگو، آب و رسوبات

کل باکتری‌های جدا شده	باکتری‌های اسید لاکتیک		*انتروکوکوس*		*باسیلوس*	
تعداد کل (جدایه)*	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد	تعداد (جدایه)	درصد
۴۳	۲۳	۵۳/۴۸	۶	۱۳/۹۵	۱۴	۳۲/۵۵



شکل ۱: رنگ آمیزی گرم، نمای میکروسکوپی جدایه‌های باکتریایی *انتروکوکوس* (۱)، *باسیلوس* (۲) و باکتری‌های اسید لاکتیک (۳) (بزرگنمایی ۱۰۰۰)

الف- ارزیابی توان تجزیه کنندگی اسیدفیتیک در جدایه‌های باکتریایی

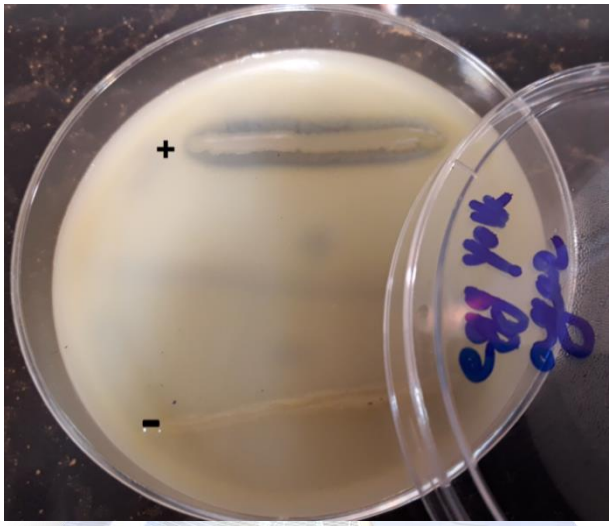
نتایج بدست آمده در انتهای دوره گرمخانه گذاری پلیت‌های حاوی محیط اختصاصی آنزیم فیتاز نشان داد که هر چند جدایه‌های مورد آزمایش در محیط کشت غربال‌گری آنزیم فیتاز رشد کردند ولی هیچ‌کدام توانایی تجزیه فیتات را نداشتند و همگی فیتاز منفی گزارش شدند.

ب- ارزیابی کیفی آنزیم‌های خارج سلولی جدایه‌های باکتریایی

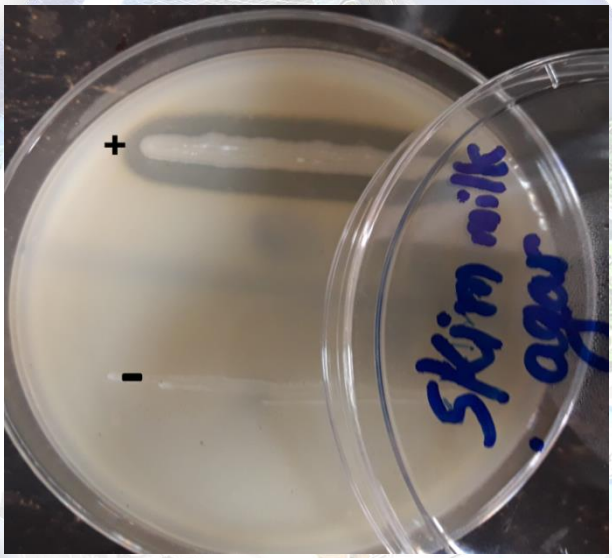
پس از کشت باکتری‌های جدا شده در محیط‌های آگار حاوی زرده تخم مرغ، نشاسته آگار و اسکیم میلک آگار و طی دوره گرم-خانه گذاری به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت جدایه‌هایی که در محیط کشت مربوطه تشکیل هاله شفاف داده بودند (اشکال ۲ تا ۴) و حداقل یکی از آزمایشات آنزیمی آن‌ها مثبت شد مثبت گزارش گردید. جدول شماره ۲ جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی و نوع آنزیم مربوطه را نشان می دهد. جدایه شماره ۷۱ و یک جدایه از باکتری‌های اسیدلاکتیک (جدایه شماره ۶) توانایی بسیار ضعیفی در تولید آنزیم آمیلاز داشت و کلیه جدایه‌های دیگر که آزمایشات آنزیمی‌شان مثبت واقع شده بود *باسیلوس*هایی بودند که در محیط ام وای پی آگار جداسازی شده بودند. مابقی جدایه‌ها فاقد فعالیت آنزیمی در محیط کشت متناسب با آنزیم بودند.

جدول ۲: جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی و نوع آنزیم مربوطه

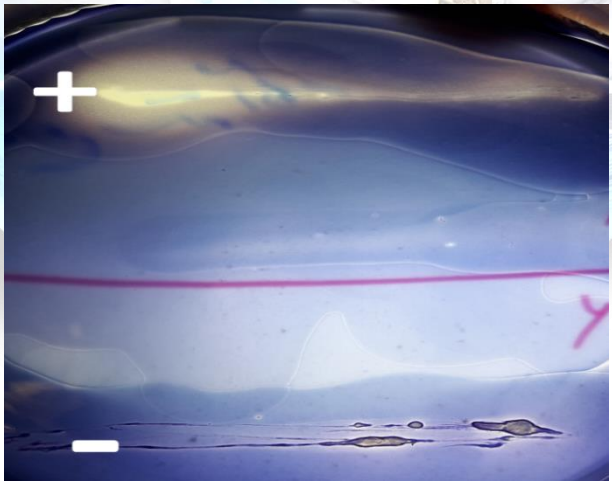
شماره جدایه باکتری	پروتئاز	لیپاز	آمیلاز	شماره جدایه باکتری	پروتئاز	لیپاز	آمیلاز
۲	+	-	-	۵۷	-	+	-
۶	-	-	+ ضعیف	۵۸	+	+	-
۲۹	+	-	-	۷۱	-	-	+
۳۳	+	-	-	۷۲	+	+	-
۳۴	+	-	-	۷۹	+	+	-
۳۶	-	+	-	۸۰	+	+	
۳۷	+	+	-	-	-	-	-



شکل۲: تشکیل هاله شفاف اطراف جدایه لیپاز مثبت (+) و عدم آن در جدایه لیپاز منفی (-)



شکل ۳: تشکیل هاله شفاف اطراف جدایه پروتئاز مثبت (+) و عدم تشکیل آن در جدایه پروتئاز منفی (-)



شکل ۴: تشکیل هاله شفاف اطراف جدایه آمیلاز مثبت (+) و عدم تشکیل آن در جدایه آمیلاز منفی (-)

نتیجه‌گیری و بحث

اغلب پروبیوتیک‌های تجاری مورد استفاده در آبزی‌پروری از دستگاه گوارش موجودات خشکی‌زی جداسازی شده‌اند (Nayak، ۲۰۱۰). به همین علت صنعت آبزی‌پروری بدون آگاهی از پیامدهای مضر احتمالی (لزوم حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی بومی، لزوم سازگار بودن باکتری پروبیوتیکی با میکروبیوتای بومی، تحمیل هزینه‌های اقتصادی فراوان به کشور جهت باکتری پروبیوتیک غیر بومی و ...) موجب ورود گونه‌های باکتریایی غیر بومی به محیط زیست آبزیان می‌شود (Balcazar، ۲۰۰۶؛ قبادی دانا و همکاران، ۱۳۹۱؛ کلیائی و همکاران، ۱۳۹۵)، بنابراین در مدیریت نوین میکروبی، جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بومی جدا شده از دستگاه گوارش، محیط پرورش آبزیان و معرفی قابلیت‌های آنزیمی آنها، نقش بسیار مهمی را جهت نیل به اهداف آبزی‌پروری پایدار ایفا می‌نماید.

آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل لیپاز، سلولاز، آمیلاز، پروتئاز، لاکتاز و کاتالاز تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها می‌توانند هضم مواد غذایی و سلامت عمومی میزبان را بهبود بخشند. آنزیم‌ها موادی هستند که در سلول‌های‌زنده وجود دارند و می‌توانند بدون اینکه دچار تغییر شوند سبب سرعت بخشیدن به واکنش‌های شیمیایی گردند (Oyeleke و Oduwole، ۲۰۰۹).

در مطالعه حاضر ۱۰ جدایه توانایی تولید آنزیم پروتئاز و ۷ جدایه توانایی تولید آنزیم لیپاز را داشتند که همگی به گروه *باسیلوس*ها تعلق داشتند و جدایه شماره ۶ (باکتری اسید لاکتیک) و جدایه شماره ۷۱ (*باسیلوس*) توانایی ضعیفی در تولید آنزیم آمیلاز از خود نشان دادند. *باسیلوس*ها به چند دلیل به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند: آنها در میگو و محیط زیست آن وجود دارند (Sharmila و همکاران، ۱۹۹۶؛ Nimrat و همکاران، ۲۰۰۵) و توانایی تولید محدوده وسیعی از آنزیم‌های خارجی از قبیل پروتئاز، آمیلاز و لیپاز را دارند (Moriarty، ۱۹۹۸؛ Ghasemi و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعات نقش مثبت آنزیم‌هایی از قبیل پروتئاز و آمیلاز در استفاده بیشتر از مواد غذایی در جیره غذایی آبزیان ثابت شده است (Deshimaru، ۱۹۸۱). مطالعه Ochoa-Solano و Olmos-Soto (۲۰۰۶) نشان داد که *B. subtilis* و *B. megaterium* آنزیم‌های خارج سلولی قابل قبولی را تولید می‌کنند. در همین راستا نتایج حاصل از بررسی حسینی و رضوی پور (۱۳۸۸) نشان داد که سویه باکتریایی *Bacillus coagulance* توانایی تولید آنزیم لیپاز را دارد که با نتایج بررسی حاضر که *باسیلوس*ها توانایی تولید آنزیم لیپاز، آمیلاز و پروتئاز را داشتند در تطابق است. در واقع قابلیت بالای تولید و ترشح مقادیر آنزیم توسط سویه‌های مختلف *باسیلوس* ناشی از فعالیت فیزیولوژیک این سویه‌ها می‌باشد (Asokan و Jayanthi، ۲۰۱۰) که سبب استفاده فراوان از این سویه‌ها در پرورش میگو و به عنوان مکمل پروبیوتیکی شده است که در پی مصرف آن‌ها، رشد، بازماندگی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگو و قابلیت هضم مواد غذایی بالا می‌رود (Rengpipat و همکاران، ۱۹۹۸؛ Lin و همکاران، ۲۰۰۴؛ Ziaei Nejad و همکاران، ۲۰۰۶). Suzer و همکاران (۲۰۰۸) نیز بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و لیپاز را از طریق استفاده از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به عنوان پروبیوتیک در لارو ماهی شانک سرطلایی گزارش نمودند. در حالی‌که در مطالعات زیادی تولید آنزیم توسط *لاکتوباسیلوس*ها را تایید می‌نمایند ولی هیچ‌کدام از باکتری‌های اسیدلاکتیک آزمایش شده در بررسی حاضر توانایی تولید آنزیم آمیلاز و لیپاز را نداشتند که شاید به دلیل تفاوت در سویه‌های مورد بررسی می‌باشد.

از طرفی در صنعت آبزی‌پروری قسمت اعظم پروتئین غذا توسط پودر ماهی تأمین می‌گردد که با توجه به گران قیمت بودن آن و همچنین کاهش صید ماهی از دریا، باید جایگزینی مناسب و ارزان‌تر برای آن یافت. لذا جایگزین نمودن منابع پروتئین حیوانی با پروتئین گیاهی می‌تواند به عنوان راه حل مناسبی پیشنهاد گردد ولی از عوامل محدود کننده استفاده از پروتئین گیاهی می‌توان به وجود نمک‌های فیتات اشاره نمود. آنزیم فیتاز با تجزیه املاح فیتات علاوه بر بالابردن دسترسی زیستی فسفر، مانع اثرات منفی آن‌ها می‌گردد (Choi و همکاران، ۲۰۰۱؛ Kim و همکاران، ۱۹۹۸). در بررسی‌های پیشین، باکتری‌های تولید کننده فیتاز را از زیستگاه‌های مختلفی از قبیل مدفوع مرغ، خاک محل زیست و پرورش ماکیان و گاوداری‌ها، مزرعه حبوبات، میوه‌ها،

گیاهان فاسد و ریزوسفرها جداسازی نموده‌اند (Mittal و همکاران، ۲۰۱۲). Roy و همکاران (۲۰۰۹) جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده فیتاز از روده ماهی کاتلا (*Catla catla*)، مریگال (*Cirrhinus mrigala*)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) در زیستگاه‌های مختلف غذایی را انجام دادند.

در مطالعه ابراهیمیان (۱۳۹۲) سه جدایه *Citrobacter farmeri* جدا شده از مزرعه لوبیا، *Klebsiella oxytoca* جدا شده از بستر استخر پرورش کپور ماهیان و *Raoultella terrigena* جدا شده از ریزوسفر مزرعه شبدر، توانایی خوبی نسبت به بقیه باکتری‌ها جهت سنتز فیتاز داشتند. ولی در بررسی حاضر هیچ‌کدام از جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم فیتاز را نداشتند احتمالاً به علت نوع تغذیه میگوی نمونه‌برداری شده (عدم تغذیه از منابع پروتئین گیاهی در جیره) یا نوع زیستگاه آن (عدم حضور گیاهان آبزی یا دبریدهای گیاهی در بستر منابع آبی مورد مطالعه) است که چنین باکتری‌هایی در نمونه‌برداری‌های انجام شده وجود نداشتند، زیرا در مطالعات قبلی این سویه‌ها از حیواناتی جداسازی شده‌اند که یا دارای تغذیه گیاه‌خواری هستند یا در زیستگاه‌های غنی از گیاهان زندگی می‌نمایند، ولی در بررسی حاضر سویه‌های اسیدلاکتیک، *انتروکوکوس* و *باسیلوس* جداسازی شده فاقد این آنزیم بوده و همگی فیتاز منفی گزارش شدند.

در کل می‌توان نتیجه گرفت از مجموع ۴۳ جدایه باکتری‌های اسید لاکتیک، *انتروکوکوس* و *باسیلوس* که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفته بودند؛ جدایه‌های *باسیلوس* به علت تولید آنزیم‌های مناسب، پس از بررسی‌های تکمیلی می‌توانند به عنوان مکمل پروبیوتیکی جهت بهبود وضعیت تغذیه‌ای آبزیان مخصوصاً در پرورش میگوی وانامی پیشنهاد شوند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان نامه و با استفاده از امکانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید، در این خصوص از اعطای پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

ابراهیمیان، م. ۱۳۹۲. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز از منابع محیطی. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی- میکروبیولوژی از دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۳۴ صفحه.

ضیایی نژاد، س.، رفیعی، غ.، غفله مرمضی، ج.، میرواقفی، ع. و فرحمند، ح. ۱۳۸۸. بررسی تولید آنزیم توسط باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*) در شرایط in vitro با هدف انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی. *مجله علوم و فنون دریایی*. شماره ۱ و ۲، ۱۰-۱.

حسینی، ف. و رضوی پور، ر. ۱۳۸۸. بهینه سازی تولید لیپاز توسط سویه‌های *باسیلوس* جدا شده از لجن فعال. *فصلنامه دانش میکروب شناسی*، شماره ۳، ۵-۱.

قبادی دانا، م.، هاتف سلمانیان، ع. و یخچالی، ب. ۱۳۹۰. جداسازی و شناسایی مولکولی *لاکتوباسیل*‌های موجود در برخی از فرآورده‌های لبنی بومی. *نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی*، شماره ۲، ۱۱۶-۹۹.

کریم زاده، ص.، بهمنش، ش. و نادری، ع.ا. ۱۳۹۴. فواید و کاربرد پروبیوتیک‌ها در صنعت آبزی پروری. چاپ سوم، انتشارات پرتو واقعه، تهران، ۲۵-۱.

کلیانی، ز.، آبرومند، ع. و ضیایی نژاد، س. ۱۳۹۵. تاثیر باکتری زیست یار *Bacillus subtilis* مستخرج از روده ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) بر عملکرد رشد و بقاء آن. *نشریه توسعه آبزی پروری*، شماره ۲، ۱۰۸-۹۹.

Alcivar-Warren, A., Meehan-Meola, D., Park, SW., Xu, Z., Delaney, M. & Zuniga, G. 2007. Shrimp Map: a low-density, microsatellite-based linkage map of the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: identification of sex-linked markers in linkage group 4. *Journal of Shellfish Research*, 26 (4), 1259–1277.

Asokan, S. & Jayanthi, C. 2010. Alkaline protease production by Bacillus *licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *Journal of Cell and Tissue Research*, 10, 2119-2123.
Balcazar, JL., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Muzquiz, JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114 (3-4), 173-186.
Choi, YM., Suh, HJ. & Kim, JM. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from Bacillus sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20 (4), 287-292.
Deshimaru, O. 1981. Studies on nutrition and diet for prawn, *Penaeus japonicas*, *Journal ofish Experiment Station*, 12, 1-18.
Gatesoupe, FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147– 165.
Ghasemi, A., Khajeh, K. & Ranjbar, B. 2007. Stabilization of *Bacillus licheniformis* a-amylase by specific antibody which recognizes the Nterminal fragment of the enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 162-167.
Kim, YO., Kim, HK., Bae, KS., Yu, JH. & Oh, TK. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DSll. *Enzyme Microbial Technology*, 22 (1), 2-7.
Lin, HZ., Guo, ZX., Yang, YY., Zheng, WH. & Li, ZJ. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, *Aquaculture Research*, 35, 1441–1447.
Mittal, A., Singh, G., Goyal, V., Yadav, A., Aneja, KR., Gautam, SK. & Aggarwal, NK. 2011. Isolation and biochemical characterization of acido-thermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4 (4), 273-282.
Mittal, A., Singh, G., Goyal, V., Yadav, A. & Kumarn, N. 2012. Production of phytase by acidothermophilic strain of *Klebsiella sp. Db-* 3fj711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 18-27.
Moriarty, DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.
Nayak, SK. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553-1573.
Nimrat, S., Sangnawakij, T. & Vuthiphandchai, V. 2005. Preservation of black tiger shrimp *Penaeus monodon* spermatophores by chilled storage. *Journal of World Aquaculture Society*, 36, 76-86.
Nimrat, S., Vuthiphandchai, V. 2011. *In vitro* evaluation of commercial probiotic productsused for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology*, 10 (22), 4643-4650.
Ochoa-Solano, LJ. & Olmos-Soto, J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519-525.
Oyeleke, SB. & Oduwole, AA. 2009. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava dumpsite in minna, Nigerstate, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 3(4), 143-146.
Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. & Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167, 301–313
Roy, T., Mondal, S. & Ray, AK. 2009. Phytase-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. *Aquaculture Research*, 40 (3),344-353.
Shakibazadeh, S., Saad Che, R., Hafezieh, M., Christianus, A., Saleh Kamarudin, M. & Sijam, K. 2012. A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11 (4), 849-866.
Sharmila, R., Abraham, TJ. & Sundararaj, V. 1996. Bacterial flora of semiintensive pond-reared *Penaeus indicus* (*H. Milne* Edwards) and the environment. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 11, 193-203.
Sonnenschein, AL., Losick, R. & Hoch, JA. 1993. *Bacillus subtilis* and Others Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC, 987pp.
Suzer, C., Coban, D., Kamaci, HO., Saka, S., Firat, K., Otgucuoglu, O. & Kucuksari, H. 2008. *Lactobacillus spp*. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata, L.*) larvae: Effects on growth. *Aquaculture*, 280, 140-145.