

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ترکیبی از باکتریهای جداسازی شده از میگوهای پرورشی سفید غربی در فازهای برون تنی و درون تنی

سعیده سرحدی^۱، ایمان سوری نژاد^{۱*}، محسن گذری^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- بخش میکروبیولوژی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۴۰۳/۰۶/۳۰

*نویسنده مسئول:

sourinejad@hormozgan.ac.ir

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتریهای موجود در اکوسیستم آبی پروری نخستین مرحله از مطالعات غربالگری باکتریهای پروبیوتیک است. هدف از مطالعه حاضر دستیابی به باکتریهای روده میگوی پرورشی سفید غربی دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتریهای بیماریزا در شرایط برون تنی و درون تنی بود. نمونه برداری از سایت های پرورش میگوی تیاب جنوبی و تیاب شمالی در ۳ مرحله انجام شد. نتایج شمارش باکتریهای قابل کشت نشان داد در سایت تیاب جنوبی میانگین فراوانی تعداد باکتریها در نمونه های روده میگو از $10^6 \times 3/66$ CFU/gr در مرحله نخست نمونه برداری به $10^6 \times 4/63$ CFU/gr در مرحله سوم رسید. با روند مشابهی، تغییرات این میزان در سایت تیاب شمالی از $10^6 \times 4/16$ CFU/gr تا $10^6 \times 6/16$ CFU/gr نوسان داشت. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتری های جداسازی شده (جدایه) با استفاده از روش انتشار از چاهک نشان داد بترتیب ۹، ۴ و ۳ جدایه در مقابل بترتیب *V. alginolyticus*، *V. harveyi*، *P. aeruginosa* و *V. parahaemolyticus* فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. نتایج ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده عصاره متابولیت های استخراج شده با استفاده از روش میکرودایلوشن نشان داد این میزان از $312 \mu\text{g/ml}$ تا $1250 \mu\text{g/ml}$ متغیر بود. حداقل غلظت کشنده باکتریایی عصاره های مذکور در محدوده $1250 \mu\text{g/ml}$ تا $312 \mu\text{g/ml}$ ثبت شد. ترکیب عصاره جدایه های (6 INT 44+ IST)، (IST 34+ IST 6)، (IST 22+ IST 15) و (IST 22+ INT 66) فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به عصاره منفرد نشان داد. نتایج ارزیابی تأثیرات متقابل آنتاگونیستی یا سینرژیستی جدایه های توانمند بر رشد یکدیگر در محیط جامد نشان داد جدایه IST 6 با جدایه های INT 44 و IST 34 دارای رابطه سینرژیستی بود. همچنین جدایه IST 22 بر رشد جدایه INT 66 تأثیر سینرژیستی داشت. نتایج شناسایی ژنتیکی بر اساس آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA نشان داد جدایه های IST 6 و IST 34 بیشترین تشابه را بترتیب با سویه های *Bacillus pumilus* strain NCTC10337 و *Bacillus safensis* subsp. *safensis* strain FO-36b به میزان ۱۰۰ درصد نشان دادند. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد دو سویه IST 6 و IST 34 به عنوان سویه های دارای روابط سینرژیستی در تولید ترکیبات ضد میکروبی در آزمون های برون تنی و بازدارندگی از بیماری در فاز درون تنی در میگوی سفید غربی بودند و می توانند به عنوان کاندیدای بالقوه در مطالعات آینده باکتریهای پروبیوتیک مورد بررسی قرار گیرند.

کلید واژه ها: باکتری روده، شناسایی ژنتیکی، آزمون مواجهه میکروبی، میگوی سفید غربی

مقدمه

در دهه اخیر با توجه به افزایش چشمگیر جمعیت جهان، توسعه آبی پروری به عنوان مهم ترین منبع تامین غذا و راهی برای رسیدن به امنیت غذایی پایدار، مورد تقاضای فراوان بوده است. پرورش سخت پوستان حدود ۹/۲ درصد از کل تولیدات آبی پروری جهانی معادل ۱۱/۲۳ میلیون تن را شامل می شود. در میان سخت پوستان، بیش از ۵۰ درصد تولیدات میگو، مربوط به میگوی سفید غربی *Penaeus vannamei* می باشد [۱]. در ایران نیز در حال حاضر میگوی سفید غربی به عنوان تنها گونه پرورشی میگو در کشور پرورش داده می شود.

در طی سال های اخیر با رشد سریع صنعت پرورش میگوی سفید غربی در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری، مشکلات مربوط به بیماری ها و شرایط محیطی به طور جدی مورد توجه قرار گرفته است. عموماً بیماری های ویروسی و باکتریایی از مهم ترین عوامل محدود کننده پرورش میگو می باشند. در چند دهه اخیر استفاده از آنتی بیوتیک ها، آفت کش ها و سایر مواد شیمیایی، راهبردی رایج برای جلوگیری و کنترل شیوع بیماری بود که این عمل به صورت بی رویه انجام می شد و با وجود استانداردهای پیشگیرانه در برخی از کشورها همچنان ادامه دارد. از آن جا که آنتی بیوتیک ها سبب بروز مقاومت باکتریایی نیز می گردند و از طرف دیگر، مصرف مقدار کم آنتی بیوتیک ها و یا استفاده مکرر از آنتی بیوتیک های متفاوت در درمان بیماری ها، باعث ایجاد مقاومت چند گانه در باکتری ها شده و باعث می شود که باکتری های گوناگون، در مقابل مصرف مجدد آنتی بیوتیک از خود مقاومت نشان دهند و همچنین به دلیل اثرات منفی بر محیط زیست، انسان و میزبان، استفاده از آنها روز به روز محدود و حتی در اکثر کشورها ممنوع شده است. در جانور میزبان، آنتی بیوتیک ها موجب از بین بردن فلور سودمند میکروبی، کاهش رشد و بروز مقاومت های باکتریایی می شوند.

استفاده از جایگزین های دیگری مانند پروبیوتیک ها برای کنترل بیماری های عفونی و باکتریایی نه تنها در آبی پروری میگو بلکه در سایر گونه های آبی پروری پیشنهاد شده است [۲]. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های مکملی نظیر باکتری ها، قارچ ها و مخمرها می باشند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده با جایگزین شدن در جایگاه اتصال باکتری های مضر و استفاده از مواد غذایی مورد نیاز آنها، اثرات سودمندی روی میزبان می گذارند و باعث افزایش مقاومت میزبان، بهبود ضریب تبدیل غذایی، افزایش نرخ رشد ویژه و بازماندگی بهتر و افزایش وزن نهایی می شوند [۳]. پروبیوتیک ها با اثر بر آنزیم های گوارشی سبب هضم و جذب پذیری بیشتر مواد غذایی از جمله ویتامین ها و پروتئین ها می شوند که می توانند در دستیابی به رشد نهایی موثر باشند. استفاده از پروبیوتیک ها همچنین باعث افزایش بقای میگوها از طریق حذف رقابتی عوامل بیماری زا در شرایط پرورش می شود. پروبیوتیک ها می توانند از طریق محدود کردن باکتری های مضر با تولید ترکیباتی مانند باکتریوسین ها، سیدروفورها، لیزوزیم ها، پروتئازها، هیدروژن پراکسیداز و جلوگیری از اتصال و کلونی سازی باکتری های مضر در روده، رقابت جهت مصرف مواد مغذی و ارتقای سیستم ایمنی آبی به وسیله تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی و فعالیت ضد ویروسی، افزایش بقای آبزیان را موجب گردند. آنها همچنین در متعادل کردن فلور میکروبی میزبان نقش مهم و تأثیرگذاری را ایفا می کنند [۴].

تولید پروبیوتیک های بومی یکی از حلقه های تکمیلی برنامه راهبردی میگو می باشد و معرفی پروبیوتیک های بومی و کارآمد به صنعت تکثیر و پرورش میگو سبب افزایش و بهبود روند تولید می شود. پروبیوتیک های تجاری وارداتی، با شرایط جغرافیایی خلیج فارس و دریای عمان و سویه های باکتریایی بومی در این اکوسیستم ها (دمای بالای آب و شوری بالا) سازگاری ندارند و ورود آن ها به اکوسیستم معادل ورود سویه های غیر بومی به محیط زیست بوده و باعث برهم خوردن تعادل میکروبی اکوسیستم می گردد. علیرغم عدم کارایی محصولات خارجی، پرورش دهندگان به ناچار با هزینه های گزاف این محصولات را وارد کشور می کنند که نه تنها سبب خروج ارز از کشور می شود بلکه ورود گونه های میکروبی ناشناخته غیر بومی خود سبب بروز بیماری های نوظهور در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو گشته و خسارات جبران ناپذیری را به طور ناخواسته به اقتصاد کشور وارد می کنند. در یکی از مطالعات مرتبط گذشته، گذری و همکاران با جداسازی ۱۰۰ جدایه اکتینوباکتری از رسوبات استخرهای پرورش میگو منطقه تیاب بیان نمودند ۲۷ درصد اکتینوباکتری های جدا شده در مقابل گونه های بیماریزای ویبریو فعالیت آنتاگونیستی نشان دادند. مطالعه فعالیت آنزیمی جدایه های آنتاگونیست بیانگر تولید آنزیم های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز توسط بترتیب ۴۴، ۲۶ و ۳۷ درصد جدایه

ها بود [۵]. هدف اصلی از انجام مطالعه حاضر، بررسی امکان دستیابی به فرمولاسیونی مشتمل بر ترکیبی از باکتری های دستگاه گوارش میگوی پرورشی سفید غربی با فعالیت ضد میکروبی در مقابل میکروارگانیسم های بیمارزا در شرایط برون تنی و درون تنی می باشد.

مواد و روش ها

ابتدا نمونه های میگو و آب استخرهای پرورش میگو در سایت های تیاب جنوبی و تیاب شمالی در استان هرمزگان به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل گردید. نمونه های میگو کالبد شکافی شد و باکتری های جداسازی شده بر اساس آزمون های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک شناسایی شدند. سپس با استفاده از دو روش چاهک گذاری و دیسک گذاری فعالیت ضد باکتریایی آن ها در برابر ۳ باکتری و ۲ قارچ بیماری زا ارزیابی شد. سایت های نمونه برداری از میان مزارعی انتخاب شد که فاقد سابقه استفاده از محصولات پروبیوتیک باشند تا از جداسازی سویه های پروبیوتیک تجاری پیشگیری شود. در هر مزرعه از ۳ استخر هر ماه یک بار نمونه برداری شد.

جداسازی و خالص سازی باکتری ها

پس از ضدعفونی کردن سطح بدن میگوها و شستشو با آب مقطر، برای برداشتن قسمت های گوارشی، میگوها کالبد شکافی شدند و از همه محتویات روده نمونه برداری شد. اندام های مشابه با آب مقطر استریل رقیق سازی گردیدند. میگوهای جمع آوری شده با استفاده از سرنگ و سوپ استریل نمونه گیری شدند و روی پلیت های محیط کشت پخش شدند. از محیط کشت تریپتیک سویا آگار ساخته شده با آب دریا استفاده گردید. تمامی پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرما گذاری شدند. رشد باکتری با کدر نمودن محیط مایع و ظهور پرگنه بر روی محیط کشت جامد مشخص گردید. سپس ۱۰ درصد نمونه های باکتریایی رشد یافته بر روی هر پلیت خالص سازی شدند [۶]. بعد از آن خالص سازی میکروبی انجام گرفت.

شناسایی میکروبی

باکتریهای جداسازی شده پس از خالص سازی به منظور شناسایی میکروارگانیسم های منتخب بر اساس ویژگی های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک استفاده شدند [۷]. آزمون های تشخیصی نیز بر اساس نتایج شناسایی ژنتیکی صورت پذیرفت به طوریکه آزمون های متمایز کننده میکروارگانیسم از سویه های نزدیک انتخاب و اجرا گردید. تا حد امکان نسبت به شناسایی بیوشیمیایی و طبقه بندی باکتری ها در سطح گونه اقدام گردید. میکرو فلورای جداسازی شده از دستگاه گوارش میگو که در TSB^۱ کشت داده شده بودند برای یافتن کاندیدای پروبیوتیک غربالگری شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری های جداسازی شده در شرایط برون تنی

پس از اطمینان از خلوص جدایه های بدست آمده، فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها در مقابل طیفی از گونه های بیمارزا در دو مرحله مورد بررسی قرار گرفت. از باکتریهای *Pseudomonas aeruginosa*, *V. harvey*, *Vibrio parahaemolyticus* به عنوان باکتری های بیمارزا و از قارچ های *Fusarium oxysporum* و *Lagenidium sp* که از کلکسیون میکروارگانیسم های بومی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان تهیه شده بود به عنوان سویه های هدف استفاده گردید. فعالیت ضد میکروبی جدایه های بدست آمده در مرحله اول با استفاده از روش انتشار از چاهک مورد غربالگری قرار گرفت. به منظور کمی سازی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی از روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده استفاده شد. حداقل غلظت های بازدارنده و کشنده متابولیت های استخراج شده از جدایه های مولد ترکیبات بازدارنده در مقابل سویه های بیماری زای مورد آزمون بر اساس روش استاندارد مایکرو دایلوژن براث تعیین شد. از آنتی بیوتیک های ضد باکتریایی استرپتومایسین و ضد قارچی کتوکونازول به عنوان کنترل مثبت در جهت تضمین کیفیت و اعتبار بخشی به نتایج استفاده شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشنده MBC^۲ از چاهک های فاقد رشد در محیط کشت MHA^۳ تلقیح گردید. کمترین غلظت بدون رشد به عنوان میزان MBC ثبت شد.

¹ Tryptic Soy Broth

² Minimum bactericidal concentration

³ Mueller Hinton Agar

برای بررسی فعالیت ضد باکتری نمونه ها به روش چاهک گذاری، یک کشت از باکتری های بیماری زا روی محیط جامد TSA^۴ تهیه گردید. پلیت ها در انکوباتور ۳۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرارداده شدند. سپس در پلیت ها چاهک هایی ایجاد شد. مقداری از نمونه های جداسازی شده در TSB را در چاهک ها پیپت کرده و پلیت ها برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه پرورش داده شدند. قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک ها به عنوان فعالیت ضدباکتریایی مشاهده و ثبت گردید.

شناسایی ژنتیکی باکتری های دارای فعالیت ضد میکروبی در شرایط درون تنی و برون تنی

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریها (شرکت سیناکلون) صورت گرفت. پس از حصول اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز و بیوفوتومتر، نسبت به تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از واکنش PCR اقدام شد [۸]. پس از تکثیر ژن مربوطه و تایید کیفیت آن توسط الکتروفورز، محصول PCR به منظور تعیین توالی به آزمایشگاه ارسال گردید. میزان تشابه سویه های تعیین توالی شده با استفاده از نرم افزار Megablast انجام گرفت. مطالعات فیلوژنتیک در مورد توالی های تعیین شده با استفاده از نرم افزار MEGA 7 انجام شده و درخت فیلوژنی ترسیم گردید.

بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتریهای جداسازی شده در شرایط درون تنی

برای انجام آزمون مواجهه میکروبی در حدود ۳۰۰۰ قطعه پست لارو میگوی سفید غربی در مرحله پست لارو ۱۵ تهیه و پس از طی دوره آدپتاسیون و زیست سنجی اولیه، به مخازن رهاسازی شدند. آزمایش در ۱۵ مخزن فایبرگلاس ۵۰ لیتری پر شده با آب دریا حاوی ۵۰ قطعه میگو انجام گرفت. هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. غذای مورد استفاده از شرکت هووراش تهیه گردید. میگوها با یکی از جیره های غذایی به شرح جدول ۱ تغذیه شدند. مشابه طراحی انجام شده برای محصول پروبیوتیک تجاری به موازات انجام آزمون ها صورت گرفت. در هر آزمون میزان باکتری بیماریزا با توجه به LD₅₀ تعیین گردید. در طراحی آزمون از ترکیب باکتریهای دارای فعالیت ضد میکروبی با عنوان ترکیب پروبیوتیک نام برده می شود.

جدول ۱. جیره های غذایی مورد استفاده در مطالعه حاضر برای تغذیه میگوی سفید غربی

C+1	جیره پایه + مواجهه با <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
T1	جیره پایه + دریافت ترکیب پروبیوتیک + مواجهه با <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
C+2	جیره پایه + مواجهه با <i>V. harveyi</i>
T2	جیره پایه + دریافت ترکیب پروبیوتیک + مواجهه با باکتری <i>V. harveyi</i>
C+3	جیره پایه + مواجهه با قارچ <i>Lagenidium sp.</i>
T3	جیره پایه + دریافت ترکیب پروبیوتیک + مواجهه با قارچ <i>Lagenidium sp.</i>
C+4	جیره پایه + مواجهه با قارچ <i>Fusarium oxysporum</i>
T4	جیره پایه + دریافت ترکیب پروبیوتیک + مواجهه با قارچ <i>Fusarium oxysporum</i>
C-	جیره پایه (کنترل منفی)

برای شمارش تعداد باکتریها و قارچ های بیماریزا، از محیط های کشت اختصاصی هر جنس استفاده شد. از محیط کشت TCBS^۵ برای شمارش تعداد باکتری های ویبریو و از محیط کشت Potato dextrose Agar برای شمارش قارچ ها استفاده شد. فراوانی میکروارگانیسم ها بر اساس واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU^۶) تعیین گردید. میزان بازماندگی میگوها در مواجهه با میکروارگانیسم های بیماریزا نیز تعیین شد.

⁴ Tryptone Soy Agar

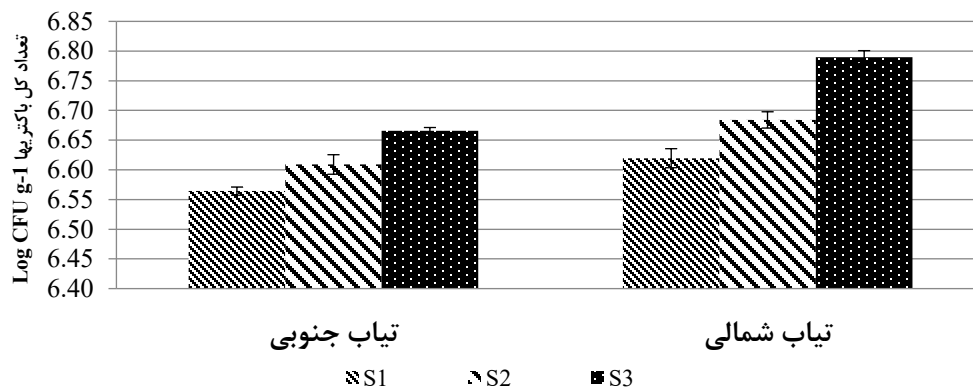
⁵ Thiosulfate-Citrate-Bile-Salt Sucrose

⁶ Colony-forming unit

نتایج

ارزیابی فراوانی باکتریها در روده میگو در طی دوره پرورش

نتایج شمارش باکتریهای قابل کشت در نمونه های روده میگوی جمع آوری شده از مزارع پرورش میگو تیب جنوبی و شمالی بیانگر تفاوت معنادار فراوانی باکتریها بود. این نتایج نشان داد فراوانی باکتریهای قابل کشت در طی دوره پرورش بطور معناداری افزایش یافت. بطوری در سایت تیب جنوبی میانگین فراوانی تعداد باکتریها در نمونه های روده میگو از $10^6 \text{ CFU/gr} \times 3/66$ در مرحله نخست نمونه برداری به $10^6 \text{ CFU/gr} \times 4/63$ رسید. با روند مشابهی، تغییرات این میزان در سایت تیب شمالی از $10^6 \text{ CFU/gr} \times 4/16$ تا $10^6 \text{ CFU/gr} \times 6/16$ نوسان داشت (شکل ۱).



شکل ۱. فراوانی باکتریها در روده میگو در مزارع پرورش میگو

حداقل غلظت های بازدارندگی و کشندگی متابولیت های استخراج شده از جدایه ها

نتایج غربالگری فعالیت ضد میکروبی ۷۱ جدایه متمایز نشان داد ۹ جدایه دارای فعالیت ضد میکروبی بودند. جدایه های مورد بررسی در مقابل حداقل یکی از باکتریهای بیماریزای مورد آزمون فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. بیشترین فعالیت ضد میکروبی جدایه های مورد بررسی در مقابل *V. alginolyticus* ثبت شد. نتایج نشان داد بترتیب ۹، ۴ و ۳ جدایه در مقابل بترتیب *V. parahaemolyticus*، *V. harveyi* و *P. aeruginosa* فعالیت ضد میکروبی نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی جدایه های دارای فعالیت ضد میکروبی

قطر هاله ممانعت از رشد (mm) در مقابل				جدایه
<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	
۱۰ ± ۱	۱۳ ± ۰	۱۵/۶۶ ± ۰/۵۷	۱۵/۳۳ ± ۰/۵۷	IST 6
-	-	-	۱۱/۶۶ ± ۰/۵۷	IST 11
-	۱۴/۳۳ ± ۰/۵۷	۱۶/۱۶ ± ۱/۱۵	۱۷/۶۶ ± ۰/۵۷	IST 15
۱۳/۶۶ ± ۱/۱۵	۱۷/۳۳ ± ۱/۱۵	۱۹/۳۳ ± ۰/۵۷	۲۰ ± ۱	IST 22
-	-	-	۱۲/۳۳ ± ۰/۵۷	IST 23
-	-	۱۲/۶۶ ± ۰/۵۷	۱۳/۶۶ ± ۰/۵۷	IST 34
-	-	-	۱۱/۳۳ ± ۰/۵۷	INT 7
-	-	۱۴/۱۶ ± ۰/۵۷	۱۵ ± ۱	INT 44
۱۸ ± ۱	۱۲/۶۶ ± ۰/۵۷	۱۷/۳۳ ± ۰/۵۷	۱۸/۶۶ ± ۰/۵۷	INT 66

نتایج ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده ($MIC^{(۷)}$) و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره متابولیت های استخراج شده از جدایه های توانمند کمیت میزان فعالیت ضد میکروبی آنها را تعیین نمود. این نتایج نشان داد از ۹ جدایه منتخب از مرحله غربالگری ۶ جدایه مولد متابولیت های دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل علیه حداقل یکی از باکتری های بیماریزا بودند. مقایسه میزان MIC متابولیت های استخراج شده نشان داد ۶ جدایه با میزان MIC متغیر از ۳۱۲ $\mu g/ml$ تا ۱۲۵۰ $\mu g/ml$ رشد حداقل یکی از ۴ باکتری بیماریزا ممانعت نمودند (جدول ۳). میزان MBC متابولیت های استخراج شده از این سویه ها در محدوده ۳۱۲ $\mu g/ml$ تا ۱۲۵۰ $\mu g/ml$ متغیر ثبت شد (جدول ۴). این نتایج نشان داد عصاره متابولیت های استخراج شده از ۳ جدایه IST 11، IST 23 و INT 7 دارای فعالیت ضد میکروبی نبودند در حالی که متابولیت های استخراج شده از IST 6، IST 22 و INT 66 اثر کشندگی بر هر ۴ جدایه بیماریزا داشتند.

جدول ۳. حداقل غلظت بازدارندگی متابولیت های استخراج شده از جدایه های باکتری

کمترین غلظت بازدارنده (MIC) ($\mu g/ml$)				جدایه ها
<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	
۱۲۵۰	۶۲۵	۶۲۵	۳۱۲	IST 6
-	-	-	-	IST 11
-	۶۲۵	۳۱۲	۳۱۲	IST 15
۳۱۲	۳۱۲	۳۱۲	۱۵۶	IST 22
-	-	-	-	IST 23
-	-	۱۲۵۰	۶۲۵	IST 34
-	-	-	-	INT 7
-	-	۶۲۵	۳۱۲	INT 44
۶۲۵	۶۲۵	۳۱۲	۱۵۶	INT 66
۱۶	۸	۸	۸	<i>Streptomycin</i>

⁷ Minimum inhibitory concentration

جدول ۴. حداقل غلظت کشندگی متابولیت های استخراج شده از جدایه های باکتری

کمترین غلظت کشنده (MBC) (µg/ml)				جدایه ها
<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	
۱۲۵۰	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۶۲۵	IST 6
-	-	-	-	IST 11
-	۱۲۵۰	۶۲۵	۶۲۵	IST 15
۳۱۲	۶۲۵	۶۲۵	۳۱۲	IST 22
-	-	-	-	IST 23
-	-	-	۱۲۵۰	IST 34
-	-	-	-	INT 7
-	-	۶۲۵	۶۲۵	INT 44
۶۲۵	۱۲۵۰	۶۲۵	۶۲۵	INT 66
۱۶	۱۶	۸	۸	Streptomycin

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی مخلوط متابولیت های باکتریایی تولید شده

نتایج سنجش فعالیت ضد میکروبی ترکیب متابولیت های تولید شده در مایع تخمیری جدایه ها در مقابل باکتری *V. harveyi* به عنوان مدل سنجش نشان داد ترکیب متابولیت های (IST 22+ IST 15)، (IST 34+ IST 6)، (INT 44+ IST 6) و (IST 22+ INT 66) فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به کاربرد منفرد آنها نشان داد (جدول ۵).

جدول ۵. سنجش فعالیت ضد میکروبی مخلوط متابولیت های تولید شده در مقابل *V. harveyi*

سویه های توانمند	INT 66	INT 44	IST 34	IST 22	IST 15	IST 6
IST 6		S	S	N	A	●
IST 15	A	A	A	A	●	●
IST 22	S	N	N	●	●	●
IST 34	N	N	●	●	●	●
INT 44	N	●	●	●	●	●
INT 66	●	●	●	●	●	●

مقادیر ارائه شده در جدول، قطر

باشد.

هاله ممانعت از رشد (mm) می

ارزیابی تاثیرات متقابل جدایه های توانمند

نتایج ارزیابی تأثیرات متقابل آنتاگونیستی یا سینرژیستی جدایه های توانمند بر رشد یکدیگر در محیط جامد نشان داد جدایه IST 6 با جدایه های INT 44 و IST 34 دارای رابطه سینرژیستی بود. همچنین جدایه IST 22 بر رشد جدایه INT 66 تأثیر سینرژیستی داشت در حالیکه جدایه IST 15 با سایر جدایه ها دارای رابطه آنتاگونیستی بود (جدول ۶).

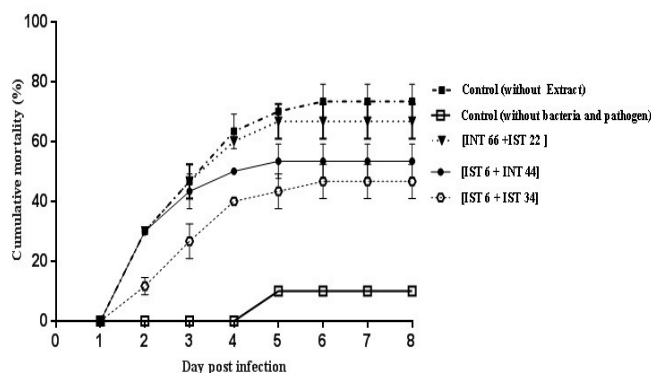
جدول ۶. تأثیرات متقابل جدایه های توانمند

سویه های توانمند	منفرد	INT 66	INT 44	IST 34	IST 22	IST 15	IST 6
IST 6	15	12	16	17	12	14	●
IST 15	16	14	16	15	17	●	●
IST 22	19	21	19	18	●	●	●
IST 34	12	10	●	●	●	●	●
INT 44	14	14	●	●	●	●	●
INT 66	17	●	●	●	●	●	●

N: فاقد تأثیر متقابل ، A: دارای تأثیر آنتاگونیستی، S: دارای تأثیر سینرژیستی

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتریهای جداسازی شده در شرایط درون تنی

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ترکیب های مختلف باکتریها در مواجهه با *V. parahaemolyticus* نشان داد در تیمار دریافت کننده جیره تکمیل شده با فرمولاسیون ۳ حاوی ترکیب [IST 34 + IST 6] کمترین تلفات با میانگین مرگ و میر تجمعی ۴۶/۶۶ درصد ثبت شد. در این تیمار میزان بازماندگی میگو به میزان ۲۶/۶۷ درصد افزایش یافت. در حالی که میانگین مرگ و میر تجمعی در نمونه کنترل مواجه شده با باکتری بیماریزا که با جدایه های دارای فعالیت ضد میکروبی تغذیه نشده بود معادل ۷۳/۳۳ درصد ثبت شد (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر بازدارنده ترکیب جدایه ها بر کاهش تلفات ناشی از مواجهه با *V. parahaemolyticus*. مقادیر ثبت شده حاصل میانگین $\pm$ خطای استاندارد می باشد.

شناسایی ژنتیکی جدایه های توانمند در ترکیب

بر اساس نتایج آزمون های درون تنی و برون تنی فعالیت ضد میکروبی، جدایه های IST 6 و IST 34 مورد شناسایی ژنتیکی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بیانگر حفظ تمامیت ساختار و کیفیت مناسب DNA استخراج شده بود. سنجش اندازه DNA ژنومی استخراج شده از جدایه های IST 6 و IST 34 نشان داد اندازه ژنوم استخراج شده بیش از ۱۰ kbp بود. ارزیابی خلوص و کمیت DNA استخراج شده از دو جدایه با روش اسپکتروفتومتری خلوص و غلظت مناسب برای مراحل بعدی را تایید نمود.

تکثیر ژن 16S rRNA جدایه های توانمند

نتایج بیانگر تکثیر ژن 16S rRNA در جدایه های توانمند مورد بررسی بود. الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده روی ژل آگارز نشان داد اندازه ژن مورد بررسی ۱۵۰۰ bp بود. نتایج الکتروفورز تکثیر اختصاصی ژن 16S rRNA را در نتیجه فرایند واکنش زنجیره ای پلیمرز تایید نمود.

آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه IST 6

نتایج آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه IST 6 با سویه های موجود در بانک ژن بیانگر تشابه ۱۰۰ درصدی بین این جدایه با سویه های ثبت شده بود (جدول ۷). نتایج نشان داد جدایه IST 6 بیشترین تشابه را با سویه *Bacillus pumilus* strain NCTC10337 به میزان ۱۰۰ درصد نشان داد. پس از آن سویه دیگری از همین گونه *Bacillus pumilus* strain NBRC-12092 تشابه ۱۰۰ درصد را ارائه نمود. *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 سویه دیگری از همین گونه به عنوان سومین سویه با تشابه ۱۰۰ درصدی با جدایه IST 6 بود. پس از آن سویه های *Peribacillus acanthi* strain L28، *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 و *Bacillus zhangzhouensis* strain MCCC 1A08372 در مراحل بعدی تشابه قرار گرفتند. تمام سویه های مورد بررسی پوشش ۱۰۰ درصدی با توالی جدایه IST 6 نشان دادند و E-value آزمون مقایسه صفر محاسبه شد.

جدول ۷. میزان تشابه توالی ژن 16S rRNA جدایه IST 6 با نزدیک ترین سویه های شاخص

closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
<i>Bacillus pumilus</i> strain NCTC10337	2159	17265	100%	0.0	100%	LT906438.1
<i>Bacillus pumilus</i> strain NBRC-12092	2159	2159	100%	0.0	100%	KX261622.1
<i>Bacillus pumilus</i> strain ATCC 7061	2159	2159	100%	0.0	100%	OQ921696.1
<i>Peribacillus acanthi</i> strain L28	2159	2159	100%	0.0	100%	NR_179899.1
<i>Bacillus pumilus</i> strain ATCC 7061	2159	2159	100%	0.0	100.0	NR_043242.1
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> strain MCCC 1A08372	2154	2154	100%	0.0	99.91 %	NR_148786.1

آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه IST 34

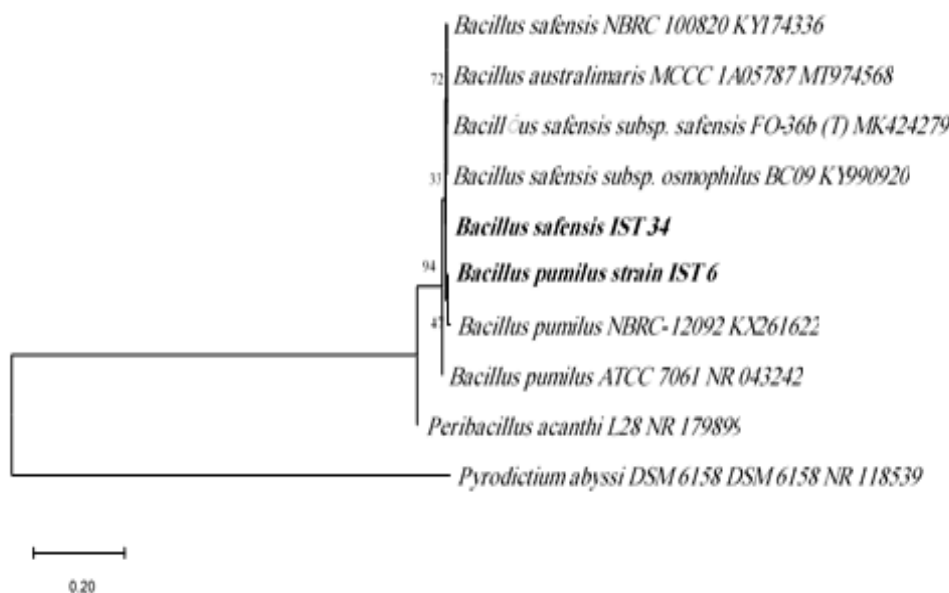
بررسی نتایج آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه توانمند IST 34 با سویه های شاخص موجود در بانک ژن NCBI بیانگر تشابه ۱۰۰ درصدی بین این جدایه با ۶ سویه شاخص موجود در NCBI بود (جدول ۸). این نتایج نشان داد جدایه IST 34 بیشترین تشابه را با سویه *Bacillus safensis* subsp. *safensis* strain FO-36b به میزان ۱۰۰ درصد نشان داد. پس از آن سویه های دیگر این گونه شامل *Bacillus safensis* strain NBRC 100820، *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* strain BC09 و *Peribacillus acanthi* strain L28 به میزان ۹۹/۸۴ درصد در رده بعدی تشابه قرار گرفت. تمام سویه های مورد مقایسه پوشش ۱۰۰ درصدی با توالی جدایه IST 34 نشان دادند و E-value آزمون مقایسه صفر محاسبه شد.

جدول ۸. مقایسه میزان تشابه توالی ژن 16S rRNA جدایه IST 34 با نزدیک ترین سویه های شاخص

closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i> strain FO-36b	2270	2270	100%	0.0	100.00%	MK424279.1
<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i> strain BC09	2270	2270	100%	0.0	100.00%	KY990920.1
<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820	2270	2270	100%	0.0	100.00%	KY174336.1
<i>Bacillus australimaris</i> strain MCCC_1A05787	2270	2270	100%	0.0	100.00%	MT974568.1
<i>Peribacillus acanthi</i> strain L28	2259	2259	100%	0.0	99.84%	MG719555.1

آنالیز فیلوژنتیک جدایه های توانمند

نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک میان ۲ سویه باسیلوس توانمند و نزدیکترین سویه های شاخص بر اساس توالی ژن 16S rRNA و یا استفاده از الگوی Neighbour joining نشان داد سویه های موجود در درخت فیلوژنتیکی رسم شده در دو خوشه مجزا قرار گرفته اند. جدایه های IST 34 و IST 6 در دو شاخه متفاوت از یک خوشه قرار گرفتند. بررسی تکاملی درخت فیلوژنتیک نشان داد هر دو خوشه از یک جد مشترک اشتقاق یافته اند (شکل ۳).



شکل ۳. درخت فیلوژنتیک سویه های منتخب و نزدیکترین سویه های موجود بر اساس روش Neighbour joining. اعداد نشان داده شده در کنار گره ها بیانگر میزان Bootstrap است. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۲۰۰ نوکلئوتید می باشد. *Pyrodictium abyssi* DSM 6158 به عنوان Out group در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری

آبزی پروری یک صنعت در حال پیشرفت بوده و نقش اساسی در تضمین امنیت غذایی جوامع ایفا می نماید. با توجه به کاهش منابع طبیعی آبزیان دریایی، توسعه صنعت آبزی پروری در دستور کار قرار گرفته است. چالش های این صنعت از قبیل شیوع بیماریهای عفونی مانع تولید بهینه این صنعت شده است. لازمه افزایش تولید میگو توسعه روش های مقابله و پیشگیری از بیماریهای عفونی با استفاده از فراورده هایی مانند پروبیوتیک

ها می باشد. در این راستا در مطالعه حاضر غربالگری باکتریهای بومی دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل برخی از عوامل شاخص بیماریزای میگو در فازهای برون تنی و بروتنی هدف گذاری گردید. همچنین اثرات متقابل سویه ها در اعمال فعالیت ضد میکروبی و بازدارندگی از ایجاد تلفات در میگو مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج شمارش باکتریهای قابل کشت بیانگر تفاوت معنادار فراوانی باکتریها در نمونه های روده میگوهای پرورش یافته در مزارع پرورش میگو تیاب جنوبی و شمالی بود. این نتایج همچنین تفاوت فراوانی باکتریها در مراحل مختلف پرورش میگو را نشان داد. عوامل متفاوتی موجب اختلاف فراوانی باکتریها در روده میگو می باشد. کیفیت مدیریت مزارع می تواند به عنوان دلیل اصلی این اختلاف فراوانی باشد. تعداد دفعات و حجم تعویض آب، کیفیت غذادهی، ترکیب فلور میکروبی استخرها، شرایط فیزیکوشیمیایی مانند شوری، اکسیژن، بار آلی استخر و بسیاری از عوامل می توانند در این زمینه نقش داشته باشند [۹ و ۱۰].

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی جدایه های متمایز نشان داد ۱۲/۶۷ درصد از جدایه ها دارای فعالیت ضد میکروبی بودند. بیشترین فعالیت ضد میکروبی جدایه ها در مقابل *V. alginolyticus* و کمترین فعالیت در مقابل *P. aeruginosa* ثبت شد. تولید ترکیبات ضد میکروبی به عنوان یکی از شاخصه های اصلی در زمینه غربالگری اولیه باکتریهای پروبیوتیک می باشد. اولین مرحله از ارزیابی این شاخصه اثبات قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی در شرایط برون تنی است [۱۱]. مطالعات گذشته نیز فعالیت باکتریهای جداسازی شده از اکوسیستم آبی پروری را بر باکتریهای شاخص بیماریزا نشان داده اند. برای مثال گونه های مختلف *Bacillus* از جمله *B. pumilus* [۱۲ و ۱۳]، *B. amyloliquefaciens* [۱۴] و *B. subtilis* [۱۵] فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه ای در برابر گونه های بیماریزای *Vibrio* شامل *V. alginolyticus*، *V. harveyi* و *V. parahaemolyticus* نشان داده اند [۱۶ و ۱۷]. در مطالعه دیگری فعالیت ضد میکروبی سویه های جداسازی شده از مزارع پرورش میگوی استان هرمزگان در مقابل گونه های بیماریزای میگو گزارش شد و نشان دادند ۲ سویه *Pseudomonas aeruginosa* MR 21 و *Pseudomonas* *aeruginosa* MR 35 جداسازی شده از میگوی سفید غربی فعالیت ضد میکروبی علیه گونه های *Vibrio* شامل *Vibrio* *aeruginosa* MR 35 و *V. alginolyticus*، *V. anguillarum*، *V. harveyi*، *parahaemolyticus* نشان دادند [۱۸].

تعیین میزان MIC و MBC عصاره متابولیت های استخراج شده از باکتریهای جداسازی شده نتایج کمی را از توانمندی آنها نشان داد. در این مطالعه تعیین حداقل غلظت بازدارنده و حداقل غلظت کشنده باکتریایی معیارهای مناسبی را برای ترسیم پروفایل ویژگی های ضد میکروبی متابولیت های استخراج شده از جدایه ها به منظور انتخاب سویه های توانمند فراهم نمود. نتایج بدست آمده همچنین میزان اختصاصیت عملکرد و طیف اثر این متابولیت های استخراج شده را نشان داد. نتایج میزان MIC متابولیت های استخراج شده در این مطالعه نشان داد ۶ جدایه با میزان MIC متغیر از ۳۱۲ $\mu\text{g/ml}$ تا ۱۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ رشد حداقل یکی از ۴ باکتری بیماریزا را ممانعت نمودند. همچنین میزان MBC متابولیت های استخراج شده از این جدایه ها در محدوده ۳۱۲ $\mu\text{g/ml}$ تا ۱۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ متغیر ثبت شد. بحث در مورد دلایل اختلاف فعالیت ضد میکروبی جدایه های مورد بررسی وابستگی مستقیمی به غلظت ترکیبات موثره در عصاره استخراج شده از هر جدایه دارد. با توجه به نیازمندی های تغذیه ای هر جدایه امکان تغییر غلظت ترکیبات موثر در عصاره نیز می باشد. همچنین روش استخراج متابولیت های باکتریایی و حلال مورد استفاده نیز از دیگر متغیر های تاثیر گذار در این زمینه می باشد. از اینرو در مطالعه حاضر از روش استخراج مایع مایع با استفاده از حلال نیمه قطبی اتیل استات استفاده شد تا اکثر ترکیبات ضد میکروبی را پوشش داده و عمومیت نتایج مطالعه تاکید گردد. با در نظر گرفتن تمام جوانب، مقادیر تعیین شده توانست معیار کمی نسبی مناسبی را برای مقایسه توانمندی ضد میکروبی جدایه ها فراهم نماید.

از جنبه های منحصر به فرد مطالعه حاضر ارزیابی تاثیرات متقابل جدایه ها در ارائه فعالیت ضد میکروبی بود. بدین منظور ترکیب متابولیت های تولید شده در مایع تخمیری جدایه ها در مقابل باکتری *V. harveyi* به عنوان مدل سنجش مورد بررسی قرار گرفت. این نتایج نشان داد ترکیب متابولیت های (IST 22+ IST 15)، (IST 34+ IST 6)، (INT 44+ IST 6) و (IST 22+ INT 66) فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به کاربرد منفرد آنها نشان داد. دلایل این نتیجه را می توان به وجود رابطه سینرژیستی میان متابولیت های موثر تولید شده توسط

این جدایه ها مرتبط دانست. بر همین اساس کاهش فعالیت ضد میکروبی ترکیب متابولیت های سایر جدایه ها را می توان با وجود رابطه آنتاگونیستی میان اجزای متشکله آنها مرتبط دانست. بحث در ارتباط با ماهیت و مکانیسم این رابطه سینرژیستی نیازمند تعیین ترکیب شیمیایی متابولیت در مطالعات آینده می باشد.

علاوه بر سنجش میانکنش های متقابل متابولیت های استخراج شده در این مطالعه، تاثیرات متقابل آنتاگونیستی و سینرژیستی جدایه های توانمند بر رشد یکدیگر در محیط جامد نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این نتایج نشان داد جدایه IST 6 با جدایه های INT 44 و IST 34 دارای رابطه سینرژیستی بود. همچنین جدایه IST 22 بر رشد جدایه INT 66 تاثیر سینرژیستی داشت در حالیکه جدایه IST 15 با سایر جدایه ها دارای رابطه آنتاگونیستی بود. این نتایج ضمن تایید نتایج میانکنش های متابولیک عصاره استخراج شده از این جدایه ها این فرضیه که منشاء روابط فیزیولوژیک بین دو جدایه بدلیل ماهیت متابولیت های آنهاست را تقویت می نماید. اگرچه توانمندی های مانند سرعت تکثیر بالاتر و قابلیت های متابولیک باکتریها مانند توانایی تولید آنزیم های تجزیه کننده منابع کربن و نیتروژن مانند آمیلاز و پروتئاز را نمی توان بطور کامل منتفی دانست.

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ترکیب های مختلف از جدایه های توانمند در مواجهه با *V. parahaemolyticus* نشان داد در فرمولاسیون ۳ حاوی ترکیب [IST 34 + IST 6] کمترین تلفات با میانگین مرگ و میر تجمعی ۴۶/۶۶ درصد ثبت شد. در این تیمار میزان بازماندگی میگو به میزان ۲۶/۶۷ درصد افزایش یافت. در سایر مطالعات نیز اثرات بازدارندگی باکتریها در فاز درون تنی مورد بررسی قرار گرفته است و در یکی از این مطالعات نشان داده شد مکمل پروبیوتیک با مخلوطی از لاکتوباسیلوس ها شامل *L. bulgaricus* *L. acidophilus* *L. casei subsp. tolerans* و *L. jensenii* در جیره برای ۱۰۰ روز با چالش غوطه وری با *V. harveyi* به طور قابل توجهی موجب افزایش نرخ بقای میگوی *P. monodon* در مقایسه با گروه کنترل گردید [۱۹]. در مطالعه دیگری مشخص شد لاروهای میگو که با رژیم غذایی حاوی دو سویه *Pseudomonas synxantha* و *Pseudomonas aeruginosa* به مدت ۲۸ روز تغذیه شدند بالاترین میزان بقا را پس از چالش با *V. harveyi* بیماریزا در مقایسه با لاروهای گروه کنترل (حاوی جیره غیر پروبیوتیک) نشان دادند [۲۰]. همچنین رژیم غذایی مکمل شده با سویه های *B. subtilis* L10 و *B. subtilis* به مدت ۸ هفته بیان ژنهای ایمنی و بقاء لاروهای میگو را به طور معنی داری افزایش داد [۲۱]. در یک روند مشابه استفاده از پروبیوتیک های متعدد متشکل از *B. subtilis* *B. amyloliquefaciens* *B. velezensis* *B. megaterium* و *Brevibacillus parabrevis* به مدت ۶۰ روز به طور قابل توجهی ایمنی و میزان بقا را در گونه میگوی سفید غربی در چالش با *V. harveyi* بیماریزا در مقایسه با گروه تغذیه شده با عوامل غیر پروبیوتیک افزایش داد [۲۲].

نتایج شناسایی ژنتیکی بر اساس آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA نشان داد جدایه IST 6 بیشترین تشابه را با سویه *Bacillus pumilus* strain NCTC10337 به میزان ۱۰۰ درصد نشان داد. بررسی نتایج آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه توانمند IST 34 با سویه های شاخص موجود در بانک ژن NCBI بیانگر تشابه ۱۰۰ درصدی این جدایه با سویه *Bacillus safensis subsp. safensis* strain FO-36b بود. فعالیت ضد میکروبی سویه های *Bacillus pumilus* و *Bacillus safensis* در مقابل باکتریهای بیماریزا *Vibrio* و *Pseudomonas* در مطالعات مختلف گزارش شده است. لیکن جداسازی باکتریهای بومی دارای میانکنش های متقابل اهمیت مطالعه حاضر را نشان می دهد. آنالیز درخت فیلوژنتیک این سویه نشان داد روند تکاملی سویه های بومی جداسازی شده با سویه های شاخص موجود متفاوت بود. این اختلاف اشتقاق تکاملی ناشی از وجود جهش های مختلف در ژن های تکاملی سویه های مورد مطالعه می باشد. از اینرو احتمال وقوع جهش در ژنهای متابولیک نیز افزایش یافته و می تواند قابلیت های جدیدی را به سویه های مورد مطالعه بخشیده و در جهت بهره برداری از سویه های جداساده نوید بخش باشد.

نتیجه گیری نهایی

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد دو سویه *Bacillus pumilus* strain IST 6 و *Bacillus safensis* strain IST 34 دارای روابط سینرژیستی در تولید ترکیبات ضد میکروبی در آزمون های برون تنی و بازدارندگی از بیماری در فاز درون تنی در میگوی سفید غربی بودند. از اینرو می توان این دو سویه را برای مطالعات آینده در زمینه ایمنی زیستی و سایر الزامات باکتریهای پروبیوتیک مطرح نمود.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- [1] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. 2022. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
- [2] Huerta-Rábago JA, Martinez-Porchas M, Miranda-Baeza A, Nieves-Soto ME, Martinez-Cordova LR, Addition of commercial probiotic in a biofocshrimp farm of *Litopenaeus Vannamei* during the Nursery phase: efecton bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*. (2019) 502: 391-399.
- [3] Hasani Azhdari M, Rezaei Tavabe K, Hoseini V, Bagherii D, Frinsko M, Ghesemi A, Azhdari A, Vazirzadeh A, Khalilpazir M, Evaluation of the effect of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* probiotics in tank water on growth factors and carcass quality of the western white leg shrimp (*Letopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries*. (2020) 73(3): 455-470 (in Persian).
- [4] Emerenciano MGC, Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, Miranda-Baeza A, Biofoc technology (BFT): a tool for Water quality management in aquaculture. In: Tutu H (ed.) *Water quality*, Intech, (2017) 91-109.
- [5] Gozari M, Mortazavi M, Bahador N, Jahromi S, Rabbaniha M, Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. (2016) 15:630-644.
- [6] Davis C, Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of microbiological methods*. (2014): 103:9-17.
- [7] Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, (2011) Vol. Vol. 3. Berlin: Springer Science & Business Media.
- [8] Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, Yip K, Fung AMY, Leung K, Tam DMW, Que T, Yuen K, Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. (2003) 41: 1996-2001.
- [9] Huang Z, Zeng S, Xiong J, Hou D, Zhou R, Xing C, Wei D, Deng X, Yu L, Wang H, Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. *Microbiome*. (2020) 8: 1-13.
- [10] Alfiansah YR, Peters S, Harder J, Hassenruck C, Gardes A, Structure and co-occurrence patterns of bacterial communities associated with white faeces disease outbreaks in Pacific white-leg shrimp *Penaeus vannamei* aquaculture. *Scientific reports*. (2020) 10: 11980.
- [11] Cai Y, Yuan W, Wang S, Guo W, Li A, Wu Y, Chen X, Ren Z, Zhou Y, In vitro screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: to white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water. *Aquaculture*. (2019) 498: 61-71.
- [12] Lei X, Piao X, Ru Y, Zhang H, Peron A, Zhang H, Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. (2015) 28: 239.

- [13] Le X, Ru Y, Zhang H, Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbials and antibiotic on performance, nutrient digestibility, cecal microflora, and intestinal morphology in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. (2014) 23: 486-493.
- [14] Medina M, Sotil G, Flores V, Fernandez C, Sandoval N, In vitro assessment of some probiotic properties and inhibitory activity against *Yersinia ruckeri* of bacteria isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Reports*. (2020) 18: 100447.
- [15] Zhou S, Song D, Zhou X, Mao X, Zhou X, Wang S, Wei J, Huang Y, Wang W, Xiao SM, Characterization of *Bacillus subtilis* from gastrointestinal tract of hybrid Hulong grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) and its effects as probiotic additives. *Fish & Shellfish Immunology*. (2019) 84: 1115-1124.
- [16] Amoah K, Dong XH, Tan BP, Zhang S, Kuebutornye FK, Chi SY, Yang QH, Liu HY, Zhang HT, Yang YZ, In vitro assessment of the safety and potential probiotic characteristics of three *Bacillus* strains isolated from the intestine of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). *Frontiers in Veterinary Science*. (2021) 8: 675962.
- [17] Meidong R, Doolgindachbaporn S, Jamjan W, Sakai K, Tashiro Y, Okugawa Y, Tongpim S, A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (Phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *The Journal of General and Applied Microbiology*. (2017) 63: 246-253.
- [18] Karimzadeh R, Bahri AH, Gozari M, Evaluation of antibacterial activity of *Pseudomonas* species isolated from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) against pathogenic *Vibrio* spp. *Journal of Aquatic Ecology*. (2016) 6(3):124-131 (In Persian).
- [19] Phianphak W, Rengpipat S, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P, Probiotic Use of *Lactobacillus* spp. for Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of scientific research, Chulalongkorn University*. (1999) 24.
- [20] Hai NV, The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. (2015) 119(4): 917-935.
- [21] Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N, Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*. (2012) 33(4): 683-689.
- [22] Jueliang P, Chuchird N, Limsuwan C, The effects of probiotic, B-1, 3-glucan and organic acid on Pacific white shrimp's (*Litopenaeus vanamei*) immune system and survival upon challenge with *Vibrio harveyi*. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*. (2013) 37(3): 25-37.

Evaluation of antimicrobial activity of a combination of bacteria from farmed Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931, in vitro and in vivo phases

Saeideh Sarhadi¹, Iman Sourinejad^{1*}, Mohsen Gozari²

1. Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
2. Department of Microbiology, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas.

ABSTRACT

Evaluation of the antimicrobial activity of bacteria in the aquaculture ecosystem is the first stage of probiotic bacteria screening studies. The aim of the present study was to isolate the intestinal bacteria of cultivated *Vanammei* shrimp with antimicrobial activity against pathogenic bacteria in vitro and in vivo. For this purpose, sampling of shrimp culture sites in South Tiab and North Tiab was done in 3 stages. The results of counting culturable bacteria using Zobell agar culture medium showed that in South Tiab site, the average number of bacteria in shrimp intestine samples was from 3.66×10^6 CFU/gr in the first stage of sampling to 4.63×10^6 CFU/gr in the third stage. With a similar trend, the changes of this amount in the North Tiab site fluctuated from 16.4×10^6 CFU/gr to 16.16×10^6 CFU/gr. Evaluation of the antimicrobial activity of the isolates using the agar diffusion method showed that 9, 6, 4 and 3 isolates respectively compared to *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *P. aeruginosa* showed antimicrobial activity. The results of evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) of extracted metabolites using microdilution method showed that this amount varied from 312 µg/ml to 1250 µg/ml. The minimum bactericidal concentration (MBC) of the mentioned extracts was recorded in the variable range of 312 µg/ml to 1250 µg/ml. The results of the interaction of extracted metabolites extract showed that the composition of the extracts of isolates [IST 6 + INT 44], [IST 6 + IST 34], [IST 15 + IST 22] and [INT 66 + IST 22] has a higher antimicrobial activity than the single extract. The results showed the mutual antagonistic or synergistic effects of susceptible isolates on each other's growth in solid medium showed that the IST 6 isolate had a synergistic relationship with the INT 44 and IST 34 isolates. Also, the IST 22 isolate had a synergistic effect on the growth of the INT 66 isolate. The results of genetic identification based on 16S rRNA gene sequence matching analysis showed that IST 6 and IST 34 isolates have the highest homology with *Bacillus pumilus* strain NCTC10337 and *Bacillus safensis* subsp. *safensis* strain FO-36b showed 100%. In total, the results of the present study showed that two strains, IST 6 and IST 34, were synergistic in the production of antimicrobial compounds in in vitro tests and inhibition of disease in the in vivo phase in *Vanammei* shrimp. Therefore, they can be considered as potential candidates in future studies of probiotic bacteria.

KEYWORDS: Intestine bacteria, Genetic identification, Microbial challenge test, *Penaeus vannamei*

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 9 May 2024

Accepted: 5 Sept. 2024

ePublished: 20 Sept. 2024

* Corresponding Author:

Email address: sourinejad@hormozgan.ac.ir

Tel: 07633711035

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513