وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه تحقیقاتی :

جداسازی و شناسایی باکتری های موثر در تولید پروبیوتیک از میگو های پرورشی

مجری :

مریم میربخش

شماره ثبت

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه : جداسازی و شناسایی باکتری های موثر در تولید پروبیوتیک از میگو های پرورشی

شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۱۰-۱۲-۸۰-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مریم میربخش

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مریم میربخش

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد افشارنسب، بابک قائدنیا، مصطفی شریف روحانی، عقیل دشتیان نسب، وحید یگانه، عیسی کشتکار، محمد علی نظاری، منصور صدریان، عباس اخوان سپهی، مجتبی لیاقت، آنیتا خنافری

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : عیسی شریف پور

محل اجرا : استان بوشهر

تاریخ شروع : ۸۹/۱/۱

مدت اجرا : ۲ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

شمارگان (تیتراژ) : ۲۰ نسخه

تاریخ انتشار : سال۱۳۹۲

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : جداسازی و شناسایی باکتری های موثر در تولید پروبیوتیک از میگو های پرورشی

کد مصوب : ۸۹۰۱۰-۱۲-۸۰-۲

شماره ثبت (فروست) : تاریخ :

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مریم میربخش دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مسئول فنی آزمایشگاه مجاز غذا- دارو در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION -

Shrimp Researsh Center

Project Title :

Isolation and molecular identification of probiotic bacteria from Cultured shrimps *Litopenaeus vannamei* in Bushehr province

Project Researcher :

Maryam Mirbakhsh

Register NO.

Ministry of Jihad – e – Agriculture

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION –

Shrimp Researsh Center

Project Title : Isolation and molecular identification of probiotic bacteria from Cultured shrimps
Litopenaeus vannamei in Bushehr province
Approved Number: 2-80-12-89010
Author: Maryam Mirbakhsh

Project Researcher : Maryam Mirbakhsh

Collaborator(s) *:* Mohammad Afsharnasab, Babak ghaednia, Mostafa Sharifrohani, Aghil Dashtiannasab, Vahid Yeganeh, Mahammad Ali Nazzari, Mansour Sadrian, Abbas Akhavan sepahy, Mojtaba liaghat, Anita Khanafari,Issa keshtkar

Advisor(s): -

Supervisor: Issa Sharifpoor

Location of execution : Bushehr province

Date of Beginning : 2010
Period of execution : 2 Years
Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*
Circulation : *20*
Date of publishing : *2013*
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

فهرست مندرجات

چکیده ۱

۱- کلیات ۲

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- اهمیت و ضرورت ۳

۲- مروری بر منابع ۹

۲-۱- تاریخچه پروبیوتیک ۹

۲-۲- پروبیوتیک در آبزی پروری ۹

۲-۳- انواع پروبیوتیک ها در آبزی پروری ۱۱

۲-۴- مکانیسم عمل کرد پروبیوتیک ها ۱۵

۲-۵- تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور پیرامون کاربرد پروبیوتیک ها در آبزی پروری ۱۷

۲-۶- مروری بر مواد فعال زیستی مترشحه از میکروارگانیسم های دریایی ۲۵

۲-۷- باسیلوس ها و کاربرد آن ها در فناوری زیستی ۲۶

۲-۸- پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده توسط گونه های باسیلوس ۲۷

۲-۹- طبقه بندی باکتریوسین های تولیدی توسط باسیلوس ۲۹

۲-۱۰- کاربرد باکتریوسین های تولیدی توسط باسیلوس ها..... ۳۱

۳- مواد و روش ها..... ۴۰

۳-۱- -مواد و تجهیزات مورد نیاز..... ۴۰

۳-۲- نمونه گیری..... ۴۲

۳-۳- نحوه نمونه برداری و انتقال نمونه ها..... ۴۵

۳-۴- اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورش میگو..... ۴۵

۳-۵- بیومتری میگوها..... ۴۶

۳-۶- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری..... ۴۶

۳-۷- خالص سازی و نگهداری سویه های باکتری ها..... ۴۸

۳-۸- شناسایی اولیه سویه های باکتریایی در حد جنس..... ۴۸

۳-۹- غربالگری اولیه..... ۵۰

۳-۹-۱- جداسازی مواد ممانعت کننده رشد از باکتری ها..... ۵۰

۳-۹-۲- بررسی اثر ضد میکروبی مواد ممانعت کننده رشد بر روی باکتری *Vibrio harveyi* به روش انتشار در آگار توسط چاهک (گوده)..... ۵۰

۳-۱۰- غربالگری ثانویه..... ۵۱

۳-۱۱- شناسایی مولکولی باکتری های انتخابی..... ۵۱

۳-۱۲- تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های انتخابی..... ۶۵

۳-۱۳- تعیین سینتیک رشد، میزان زی توده و بهترین زمان تولید مواد ضدمیکروبی توسط باکتری های انتخابی ۶۵

۳-۱۴- اثر غلظت های مختلف شوری برتولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی..... ۶۶

۳-۱۵- اثر دماهای مختلف برتولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی.....۶۶

۳-۱۶- اثر pH های مختلف برتولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی.....۶۷

۳-۱۷- بررسی ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی در غلظت های مختلف شوری.....۶۷

۳-۱۸- بررسی ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی در دماهای مختلف ۶۸

۳-۱۹- بررسی ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی در pH های مختلف ۶۹

۳-۲۰- بررسی اثر آنتاگونیستی عصاره ی باکتری های انتخابی بر یکدیگر و بر روی برخی باکتری های متعلق به خانواده باکتری های منتخب..... ۶۹

۳-۲۱- تعیین ماده موثره باکتری های انتخابی ۷۰

۳-۲۱-۱- بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی توسط باکتری های انتخابی ۷۰

۳-۲۱-۱-۱- استخراج مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی از باکتری های انتخابی..... ۷۰

۳-۲۱-۱-۲- رسوب دهی پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم ۷۱

۳-۲۱-۱-۳- دیالیز..... ۷۲

۳-۲۱-۱-۴- اندازه گیری میزان پروتئین محلول..... ۷۵

۳-۲۱-۱-۵- الکتروفورزیس..... ۷۷

۳-۲۱-۱-۶- طیف سنجی ماورای بنفش ۸۰

۳-۲۱-۲- بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت غیر پروتئینی توسط باکتری های انتخابی ۸۰

۳-۲۱-۲-۱ کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکپی جرمی ۸۰

۳-۲۱-۳- روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها..... ۸۱

۴- نتایج..... ۸۳

۴-۱- نتایج اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرها..... ۸۳

۴-۲- بیومتری میگوها..... ۹۰

۴-۳- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری و شمارش کلی باکتری های خانواده ویبریوناسه..... ۹۰

۴-۴- خالص سازی، شناسایی اولیه ونگهداری سویه های باکتری ها ۱۰۴

۴-۵- اثر ضد میکروبی مواد ممانعت کننده از رشد (Bioassay) بر روی باکتری پاتوژن میگو..... ۱۰۶

۴-۵-۱ - غربالگری اولیه ۱۰۶

۴-۵-۲- غربالگری ثانویه..... ۱۰۸

۴-۶- شناسایی مولکولی باکتری های انتخابی ۱۳۰

۴-۷- درخت فیلوژنی باکتری های S 169 (IS02) و Ju 102 (IS03) ۱۳۰

۴-۸- سینتیک رشد و زی توده باکتری های انتخابی ۱۳۱

۴-۹- بهترین زمان تولید ماده ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی..... ۱۳۲

۴-۱۰- اثر غلظت های مختلف شوری بر تولید ماده ضد میکروبی باکتری IS02..... ۱۳۴

۴-۱۱- اثر دماهای مختلف بر تولید ماده ضد میکروبی ۱۴۰

۴-۱۲- اثر pH های مختلف بر تولید ماده ضد میکروبی ۱۴۶

۴-۱۳- ماندگاری ماده ضد میکروبی در غلظت های مختلف شوری ۱۵۲

۴-۱۴- ماندگاری ماده ضد میکروبی در دماهای مختلف..... ۱۵۶

۴-۱۵- - ماندگاری ماده ضد میکروبی در pH های مختلف ۱۶۱

۴-۱۶- پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های انتخابی و باکتری هدف (*Vibrio harveyi*)..... ۱۶۵

۴-۱۷- اثر آنتاگونیستی باکتری های انتخابی بر یکدیگر و بر روی سویه های باسیلوسی ۱۶۶
۴-۱۸- ماده موثره باکتری های انتخابی ۱۶۹
۴-۱۸-۱- توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی توسط باکتری های انتخابی ۱۶۹
۴-۱۸-۱-۱- روش رسوب دهی پروتئین ها توسط آمونیوم سولفات ۱۷۰
۴-۱۸-۱-۲- تعیین میزان فعالیت زیستی فراکسیون های جداسازی شده ۱۷۱
۴-۱۸-۱-۳- روش دیالیز ۱۷۵
۴-۱۸-۱-۴- الکتروفورزیس به روش SDS-PAGE ۱۷۷
۴-۱۸-۱-۵- طیف سنج ماورای بنفش نمونه های تهیه شده ۱۷۸
۴-۱۸-۲- بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت غیرپروتئینی توسط باکتری های انتخابی ۱۷۹
۴-۱۸-۲-۱- گاز کروماتوگرافی جرمی(GC-MS) عصاره باکتری های منتخب ۱۷۹
۵- بحث ۱۸۳
۵-۱- غربالگری اولیه ۱۸۴
۵-۲- اثر شوری، دما و اسیدیته بر تولید ماده ضد میکروبی ۱۸۶
۵-۳- ماندگاری ماده ضد میکروبی در دما، شوری و اسیدیته های مختلف ۱۸۸
۵-۴- شناسایی مولکولی باکتری های انتخابی ۱۸۹
۵-۵- تعیین ماده موثره باکتری های انتخابی ۱۹۱
۵-۵-۱- ماهیت پروتئینی مواد ضد میکروبی ۱۹۱
۵-۵-۲- ماهیت غیرپروتئینی مواد ضد میکروبی ۱۹۶

پیشنهاد ها..... ۱۹۸

فهرست منابع..... ۲۰۰

چکیده انگلیسی ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

فهرست تصاویر:

تصویر ۳-۱- نقشه هوایی سایت پرورش میگوی منطقه حله- استان بوشهر ۴۳

تصویر ۳-۲- نقشه هوایی سایت پرورش میگوی منطقه دلوار- استان بوشهر ۴۳

تصویر ۳-۳- نقشه هوایی سایت پرورش میگوی منطقه مند- استان بوشهر ۴۴

تصویر ۳-۴- اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورش میگو ۴۶

تصویر ۳-۵- آماده سازی و کشت میگوها ۴۷

تصویر ۳-۶- شمارش کلونی های باکتریایی ۴۸

تصویر ۳-۷- تست های افتراقی مورد استفاده برای شناسایی اولیه : ۱- تجزیه قندها ، ۲- MRVP، ۳- سیمون سیتراتاز، ۴- کسیداز، ۵- رشد در محیط TCBS، ۶- رشد در محیط مک کانگی آگار، ۷- احیای نیترات، ۸- آزمون دکربوکسیلاز، ۹- حساسیت به O/129 ۴۹

تصویر ۳-۸- محیط کشت حاوی کلون های نوترکیب ۶۲

تصویر ۳-۹- مراحل اولیه استخراج مواد ضد میکروبی ۷۱

تصویر ۳-۱۰- رسوب دهی پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم ۷۲

تصویر ۳-۱۱- دیالیز پروتئین های ترسیب شده با سولفات آمونیوم ۷۳

تصویر ۴-۱- نمایی از کلونی های رشد کرده در محیط TSA نمکی ۹۱

تصویر ۴-۲- نمایی از کلونی های رشد کرده در محیط TCBS ۹۱

تصویر ۴-۳- نمایی از غربالگری اولیه باکتری های جداسازی شده بر روی باکتری *V. harveyi* ۱۰۸

تصویر ۴-۴- رنگ آمیزی گرم کشت ۲۴ ساعته باکتری الف) IS02 و ب) IS03 ۱۳۰

تصویر ۴-۵- نمایی از کلونی های باکتری الف) IS02 و ب) IS03 ۱۳۰

تصویر ۴-۶- درخت فیلوژنی باکتری IS02 *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain* به فرم Rectangle ۱۳۱

تصویر ۴-۷- درخت فیلوژنی باکتری IS03 *Bacillus vallismotis* به فرم Rectangle ۱۳۱

تصویر ۴-۸- اثر غلظت های مختلف شوری بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS02 ۱۳۶

تصویر ۴-۹- اثر غلظت های مختلف شوری بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS03 ۱۳۸

تصویر ۴-۱۰- اثر دما های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS02 ۱۴۱

تصویر ۴-۱۱- اثر دما های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS03 ۱۴۴

تصویر ۴-۱۲- اثر pH های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS02 ۱۴۸

تصویر ۴-۱۳- اثر pH های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS03 ۱۵۱

تصویر ۴-۱۴- نمایی از اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS02 بر باکتری IS03 ۱۶۷

تصویر ۴-۱۵- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS02 بر باکتری IS03 ۱۶۸

تصویر ۴-۱۶- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS02 و IS03 بر باکتری های *B.cereus* و *B.subtilis* ۱۶۹

تصویر ۴-۱۷- ژل الکتروفورزیس عصاره باکتری IS03 ۱۷۷

تصویر ۵-۱- ساختار مواد فعال زیستی جداسازی شده از *B. vallismortis* C89 ۱۹۵

فهرست جداول:

جدول ۲-۱- مروری برپژوهش های انجام شده در زمینه پروبیوتیک ها بر روی میگو ۲۴

جدول ۳-۱- تعداد نمونه های روده و هپاتوپانکراس میگو بررسی شده به تفکیک مکان نمونه برداری ۴۴

جدول ۳-۲- تعداد نمونه های آب و رسوب بررسی شده به تفکیک مکان نمونه برداری ۴۵

جدول ۳-۳- اجزای محلول واکنش PCR ۵۵

جدول ۳-۴- برنامه دستگاه ترمال سایکلر ۵۵

جدول ۳-۵- اجزای محلول واکنش الحاق ۵۷

جدول ۳-۶- اجزای مخلوط واکنش هضم آنزیمی ۶۴

جدول ۳-۷- اجزای تشکیل دهنده ژل پایین الکتروفورز و ژل بالا الکتروفورز ۷۹

جدول ۴-۱- میزان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرها، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی سفید غربی از ماه خرداد لغایت مهر ۱۳۸۹ به تفکیک محل- استان بوشهر ۸۴

جدول ۴-۲- میانگین وزن و طول میگوهای نمونه برداری شده در طول دوره پرورش به تفکیک منطقه نمونه برداری – استان بوشهر ۱۳۸۹ ۹۰

جدول ۴-۳- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (HBPC) و باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) نمونه های دستگاه گوارش میگوی پا سفید– استان بوشهر ۱۳۸۹ ۹۳

جدول ۴-۴- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (HBPC) و باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) نمونه های آب به تفکیک ماه–استان بوشهر ۱۳۸۹ ۹۴

جدول ۴-۵- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (HBPC) و باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) نمونه های رسوب به تفکیک ماه–استان بوشهر ۱۳۸۹ ۹۵

جدول ۴-۶- فراوانی باکتری های دارای اثر ممانعت کننده رشد بر روی *V. harveyi* پس از زمان های مختلف ۱۰۶

جدول ۴-۷- باکتری های انتخابی از غربالگری اولیه ۱۰۷

جدول ۴-۸- باکتری های منتخب از غربالگری ثانویه ۱۰۹

جدول ۴-۹- نتایج حاصل از غربالگری ۱۹۸ ایزوله باکتریایی بر روی *V.harveyi* به روش انتشار آگار در چاهک ۱۱۱

جدول ۴-۱۰- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS02 در شوری های مختلف ۱۳۶

جدول ۴-۱۱- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS03 در شوری های مختلف ۱۳۹

جدول ۴-۱۲- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS02 دماهای مختلف ۱۴۲

جدول ۴-۱۳- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS03 دماهای مختلف ۱۴۵

جدول ۴-۱۴- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS02 در pH های مختلف ۱۴۸

جدول ۴-۱۵- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS03 در pH های مختلف ۱۵۱

جدول ۴-۱۶- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS02 در شوری های مختلف ۱۵۳

جدول ۴-۱۷- میزان ماندگاری مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS03 در شوری های مختلف ۱۵۵

جدول ۴-۱۸- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS02 در دماهای مختلف ۱۵۷

جدول ۴-۱۹- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS03 در دماهای مختلف ۱۶۰

جدول ۴-۲۰- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS02 در pH های مختلف ۱۶۲

جدول ۴-۲۱- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS03 در pH های مختلف ۱۶۴

جدول ۴-۲۲- پروفایل آنتی بیوگرام باکتری های منتخب و باکتری *V.harveyi* ۱۶۵

جدول ۴-۲۳- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS02 بر باکتری IS03 ۱۶۶

جدول ۴-۲۴- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS03 بر باکتری IS02 ۱۶۷

جدول ۴-۲۵- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS02 بر باکتری های *B.cereus* و *B.subtilis* ۱۶۸

جدول ۴-۲۶- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS03 بر باکتری های *B.cereus* و *B.subtilis* ۱۶۹

جدول ۴-۲۷- بررسی اثر ضدمیکروبی فازهای حاصل از استخراج مواد ضدمیکروبی باکتری های منتخب توسط رسوب دهی با سولفات آمونیوم بر روی باکتری *V. harveyi* ۱۷۰

جدول ۴-۲۸ -داده های حاصل از مراحل مختلف استخراج پروتئین از عصاره باکتری IS02 ۱۷۵

جدول ۴-۲۹ -داده های حاصل از مراحل مختلف استخراج پروتئین از عصاره باکتری IS03 ۱۷۶

فهرست نمودارها:

نمودار ۴-۱- میزان نوسانات دما در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه ۸۷

نمودار ۴-۲- میزان نوسانات pH در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه ۸۷

نمودار ۴-۳- میزان نوسانات هدایت الکتریکی آب در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه ۸۸

نمودار ۴-۴- میزان نوسانات شوری آب در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه ۸۹

نمودار۴-۵- میانگین فراوانی HBPC و VC شمارش شده برحسب نمونه های مورد بررسی ۹۲

نمودار ۴-۶- روند تغییرات تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (HBPC) در دستگاه گوارش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹ ۹۷

نمودار ۴-۷- روند تغییرات تعداد کل باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) در دستگاه گوارش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹ ۹۸

نمودار ۴-۸- روند تغییرات تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (HBPC) در رسوبات استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی –بوشهر ۱۳۸۹ ۹۹

نمودار ۴-۹- روند تغییرات تعداد کل باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) در رسوبات استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹ ۱۰۰

نمودار ۴-۱۰- روند تغییرات تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (HBPC) در آب استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی -بوشهر ۱۳۸۹ ۱۰۱

نمودار ۴-۱۱- روند تغییرات تعداد کل باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) در آب استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹ ۱۰۲

نمودار۴-۱۲- درصد فراوانی سویه های باکتریایی جداسازی شده از آب، رسوب و دستگاه گوارش میگو ۱۰۴

نمودار۴-۱۳- درصد فراوانی باکتری های جداسازی شده از نظر مرفولوژی ۱۰۵

نمودار۴-۱۴- درصد فراوانی باکتری های جداسازی شده در حد جنس ۱۰۵

نمودار۴-۱۵- نمودار رشد و توده زیستی باکتری IS02 بر حسب زمان ۱۳۲

نمودار۴-۱۶- نمودار رشد و توده زیستی باکتری IS03 بر حسب زمان ۱۳۲

نمودار۴-۱۷- نمودار میزان هاله عدم رشد باکتری IS02 برحسب زمان در مقایسه با فازهای مختلف رشد ۱۳۳

نمودار۴-۱۸- نمودار میزان هاله عدم رشد باکتری IS03 برحسب زمان در مقایسه با فازهای مختلف رشد ۱۳۴

نمودار۴-۱۹- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS02 در شوری های مختلف ۱۳۵

نمودار۴-۲۰- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS02 بر اساس گروه های مختلف شوری در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ۱۳۵

نمودار۴-۲۱- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS03 در شوری های مختلف ۱۳۷

نمودار۴-۲۲- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS03 بر اساس گروه های مختلف شوری در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ۱۳۸

نمودار۴-۲۳- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS02 در دماهای مختلف ۱۴۰

نمودار۴-۲۴- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS02 بر اساس گروه های مختلف دما در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ۱۴۱

نمودار۴-۲۵- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS03 در دماهای مختلف ۱۴۳

نمودار۴-۲۶- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS03 بر اساس گروه های مختلف دما در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ۱۴۴

نمودار۴-۲۷- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS02 در pH های مختلف ۱۴۷

نمودار۴-۲۸- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS02 بر اساس گروه های مختلف pH در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ۱۴۸

نمودار۴-۲۹- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS03 در pH های مختلف ۱۵۰

نمودار۴-۳۰- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS03 بر اساس گروه های مختلف pH در سطح اطمینان ۹۵ ٪ ۱۵۱

نمودار۴-۳۱- میزان فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS02 در شوری های مختلف ۱۵۳

نمودار۴-۳۲- فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS03 در شوری های مختلف ۱۵۵

نمودار۴-۳۳- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS02 در دماهای مختلف در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه ۱۵۷

نمودار۴-۳۴- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS03 در دماهای مختلف در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه ۱۵۹

نمودار۴-۳۵- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS02 در pH های مختلف ۱۶۱

نمودار۴-۳۶- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS03 در pH های مختلف ۱۶۳

نمودار۴-۳۷ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف عصاره باکتریIS02 بر روی باکتری *V.haeveyi* ۱۷۲

نمودار۴-۳۸ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از ترسیب با آمونیوم سولفات عصاره باکتریIS02 بر روی باکتری *V.haeveyi* ۱۷۳

نمودار۴-۳۹ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از دیالیز عصاره باکتریIS02 بر روی باکتری *V.haeveyi* ۱۷۳

نمودار۴-۴۰- قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف عصاره باکتریIS03 بر روی باکتری *V.haeveyi* ۱۷۴

نمودار۴-۴۱ - قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از ترسیب با آمونیوم سولفات باکتریIS03 بر روی باکتری *V.haeveyi* ۱۷۵

نمودار۴-۴۲ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از دیالیز عصاره باکتری IS03 بر روی باکتری *V.haeveyi* ۱۷۵

نمودار۴-۴۳- طیف نوری عصاره باکتری IS02 در دی کلرومتان ۱۷۸

نمودار ۴-۴۴- طیف نوری عصاره باکتری IS02 در استونیتریل ۱۷۸

نمودار۴-۴۵- طیف نوری عصاره باکتری IS02 در متانول ۱۷۸

نمودار۴-۴۶- طیف نوری عصاره باکتری IS02 در هگزان ۱۷۸

نمودار۴-۴۷- طیف نوری عصاره باکتری IS03 در استونیتریل ۱۷۹

نمودار۴-۴۸- طیف نوری عصاره باکتری IS03 در کلروفرم ۱۷۹

نمودار۴-۴۹- طیف نوری عصاره باکتری IS03 در متانول ۱۷۹

نمودار۴-۵۰- طیف نوری عصاره باکتری IS03 در هگزان ۱۷۹

نمودار۴-۵۱- کروماتوگرام عصاره باکتری IS02 ۱۸۰

نمودار۴-۵۲- کروماتوگرام عصاره باکتری IS03 ۱۸۱

چکیده:

صنعت تکثیر و پرورش میگو به ویژه گونه پا سفید (*Litopenaeus vannamei*) یکی از فعالیت های عمده آبزی پروری در کشورهای جهان از جمله ایران می باشد ولی بروز بیماری ها از عوامل اصلی محدود کننده افزایش تولید می باشد و با توجه به اثرات سوء استفاده نادرست آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی، کنترل و پیشگیری از بروز بیماری ها نیاز به اقدامات نوینی دارد که مقرون به صرفه، موثر و ایمن برای محیط و انسان باشند. لذا این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی پروبیوتیک های باکتریایی از دستگاه گوارش میگوی پا سفید و محیط زیست آن انجام شد.

برای این منظور در طی پنج ماه از سه سایت اصلی پرورش میگوی استان بوشهر، نمونه برداری از ۱۵۰ قطعه میگوی پرورشی پا سفید و ۱۳۵ نمونه آب و رسوب از استخر و کانال های ورودی و خروجی به روش استاندارد صورت گرفت و در کلیه مراحل نمونه گیری، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، ثبت و بیومتری میگوها انجام شد. جداسازی پروبیوتیک ها از نمونه های فوق، به روش کشت بر روی محیط های تریپتیک سوی آگار و TCBS پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انجام شد و اثر ضدمیکروبی عصاره محیط کشت جدایه های فوق بر روی باکتری *Vibrio harveyi* به روش انتشار در آگار مورد ارزیابی قرار گرفت و بهترین جدایه ها گزینش گردید. شناسایی باکتری های منتخب با روش توالی یابی 16S rDNA انجام شد. سینتیک رشد باکتری های منتخب و اثر عوامل محیطی بر تولید ترکیبات ضدمیکروبی و ماندگاری آنها به ترتیب در شرایط شوری (٪۵/۵-۱/۵) و(۵۰ppt-۰)، pH (۹-۵) و دمای(۴۰°C-۳۰) و (۱۰۰°C-۳۵) مورد بررسی قرارگرفت و پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های منتخب تعیین گردید. استخراج مواد زیستی تولید شده توسط باکتری های منتخب به روش دیالیز و تعیین هویت آنها به روش های SDS-PAGE الکتروفورزیس، طیف سنجی ماورای بنفش و گاز کروماتوگرافی جرمی انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش، بیشترین فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری را در دستگاه گوارش میگو ها (۳/۰۴± ۰/۷۵) $\times 10^5$CFU/g در ماه مهر نشان داد. جنس *Vibrio* spp. (٪۳۷/۸۸) و *Bacillus* spp. (٪۲۷/۲۷) به ترتیب دارای بیشترین فراوانی ارزیابی شدند. از میان ۱۹۸ باکتری جداسازی شده، دو سویه جداسازی شده از دستگاه گوارش و رسوب استخر که بیشترین میزان بازدارندگی رشد و پایداری در برابر باکتری *V.harveyi* را داشتند، انتخاب گردیدند. براساس توالی یابی 16S rDNA این باکتری ها به ترتیب *Bacillus subtilis subsp.*

inaquosorum strain IS02 (GenBank: JN856456.1) و *Bacillus vallismotis* IS03 (GenBank: JQ085958.1) شناسایی و در بانک جهانی ژن ثبت شدند. بر اساس نتایج حاصل از تعیین هویت مواد زیستی تولید شده توسط باکتری های منتخب در SDS-PAGE الکتروفورزیس، باکتری *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* strain IS02 هیچ باندی نشان نداد و باکتری *Bacillus vallismotis* IS03 دو باند در محدوده وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون و ۴۵-۳۵ کیلو دالتون ایجاد کرد که احتمالاً به ترتیب مربوط به شبه باکتریوسین ها و گروه III باکتریوسین های باسیلوسی می باشند. طیف حاصل از عصاره باکتری های منتخب نیز در محدوده (۲۶۵-۲۶۰ nm) بیشترین پیک را داشت که مربوط به گروه های پپتیدی می باشد و همچنین در آنالیز GC-MS بیشترین درصد پیک کروماتوگرام هر دو باکتری مربوط به pyrrolopyrazines بود که دارای خواص آنتی باکتریال است. در مجموع با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان اظهار داشت که هر دو باکتری سازگاری بسیار خوبی با شرایط اکولوژیک زیستگاه های تکثیر و پرورش میگو داشته و می توان از آن ها به عنوان پروبیوتیک مناسب در این صنعت استفاده نمود و امید است به کمک نتایج این پژوهش گامی در جهت تحقق تولید ملی پروبیوتیک بومی در کشور ایران برداشت.

فصل اول

کلیات

کلیات

۱-۱- مقدمه

توسعه مواد غیر آنتی بیوتیکی و دوستدار محیط زیست یکی از فاکتورهای کلیدی برای مدیریت سلامت در آبزی پروری است. به طور کلی پروبیوتیک ها شامل باکتری ها، سیانوباکترها، جلبک های میکروسکوپی و قارچ ها می باشند. پژوهشگران واژه Probiotic را به واژه های انگلیسی Normal Microbiota و Effective Microbiota ترجمه کرده اند که شامل باکتری های فتوسنتتیک[۱]، *Lactobacillus* spp.، *Actinomycetes* ، نیتروباکتر ها[۲]، باکتری های دنیتریفای[۳] ، *Bifidobacterium* spp. ، برخی از مخمرها و غیره می باشند و معمولاً شامل جلبک های میکروسکوپی نمی شود. پروبیوتیک[۴]، پروبیونت[۵]، باکتری های سودمند[۶]واژه هایی هستند که مترادف یکدیگرند و همگی برای باکتری های پروبیوتیک استفاده می گردند. بکارگیری باکتری های مفید گوارشی در تغذیه انسان و بسیاری از جانوران به اثبات رسیده است، به طوریکه استفاده از *Lactobacillus acidophilus* به منظور کنترل و جلوگیری از بیماری های ناشی از میکروارگانیسم های پاتوژن روده در بسیاری از جانوران رایج است (Qi, Zhang, Boon, & Bossier, 2009). امروزه پروبیوتیک هایی که توانایی کنترل پاتوژن ها و یا بهبود کیفیت آب محل پرورش را دارند به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک ها معرفی شده اند زیرا اثرات سوء آنتی بیوتیک ها در آبزی پروری شناخته شده است به عنوان مثال با استفاده بی رویه از آنها امکان انتقال افقی ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک بین باکتری های آبزی و ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود دارد (S. R. Kim, Nonaka, & Suzuki, 2004; Sørum, 2006; WHO, 1999) از طرف دیگر بقایای آنتی بیوتیک های موجود در محصولات آبزیان برای سلامت انسان مضر است (WHO, 2006) و از سوی دیگر در کنترل بیماری های ویروسی که از عوامل مهم مرگ ومیر در استخرها و مراکز تکثیر میگو می باشند نقشی ندارند در صورتیکه پروبیوتیک ها با تحریک سیستم ایمنی میگوها سبب افزایش مقاومت نسبی میگوها به پاتوژن های ویروسی می گردند لذا با توجه به طبیعت پیچیده سیستم های پرورش آبزیان و تنوع گونه های

---

[۱] *Photosynthetic*

[۲] *Nitrobacteria*

[۳] *Denitrifying bacteria*

[۴] Probiotic

[۵] Probiont

[۶] Beneficial bacteria

پرورشی و پاتوژن ها، آنتی بیوتیک های کمی مجوز سلامت را برای استفاده در آبزی پروری گرفته اند و در حال حاضر یک نیاز فوری برای ابداع یک جایگزین آنتی بیوتیک ضروری می نماید.

۱-۲- اهمیت و ضرورت

رایج ترین روش درمانی در موارد بروز بیماری استفاده از داروهای ضد میکروبی است. در صنعت آبزی پروری از داروهای ضد میکروبی به میزان زیادی استفاده می شود. علی رغم مزایایی مانند پیشگیری از بروز بیماری ها و افزایش شاخص های رشد توسط داروهای ضد میکروبی (Phillips et al., 2004; Wierup, 2001; Witte, 2000) این داروها سبب افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها گشته اند(Akinbowale, Peng, & Barton, 2006). این مسأله در صنعت پرورش میگو بصورت قابل توجهی مشاهده شده است زیرا میزان انبوهی از ترکیبات ضد میکروبی در سیستم های پرورش میگوی متراکم استفاده می شود که سبب شیوع سویه های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک در کشورهای آسیایی گشته است (Karunasagar, Pai, Malathi, & Karunasagar, 1994; Moriarty, 1999). برای مثال تولید میگو در فیلیپین در سال های ۹۵ تا ۹۷ از ۹۰۰۰۰ تن به ۴۱۰۰۰ تن کاهش یافت یعنی در طی دو سال ۵۵ درصد کاهش در تولید پرورش میگو مشاهده شد و این میزان هیچ وقت جبران نشد. در سال ۲۰۰۲ تولید به ۳۷۰۰۰ تن رسید. صنعتی که در سال های پیش ۷۶۰ میلیون دلار آمریکا ارزش داشت اکنون ارزشش به ۲۴۰ میلیون دلار رسیده است (FAO, 2007). درتایلند نیز در طی سال های ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷ به دلیل بروز بیماری های باکتریایی و ویروسی در مزارع پرورش میگو تولید ۴۰ درصد کاهش داشته است. تا کنون موارد زیادی از مقاومت آنتی بیوتیکی با منشا مزارع پرورش آبزیان گزارش شده است .

خطر افزایش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک نه تنها برای مزارع پرورش آبزیان بلکه برای سلامت انسان نیز مهم است و گزارشات زیادی مبنی بر انتقال ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی بین باکتری ها وجود دارد. بنابراین امکان انتقال پلاسمید حاوی ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک از باکتری های موجود در مزارع پرورش میگو به باکتری هایی که پاتوژن انسان هستند نیز وجود دارد (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000; Witte, 2000) و پژوهش های اخیر این پدیده را تأیید کرده است ولی اطلاعات کافی برای اثبات انتقال ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک به باکتری های انسانی به دست نیامده است و تمامی پژوهش ها بر مفید بودن نقش آنتی بیوتیک ها در آبزی پروری توافق داشته ولی نسبت به استفاده بی رویه و غیر علمی آن ها هشدار داده اند.

سازمان اتحادیه اروپا در سال ۱۹۹۷ محدودیت هایی برای استفاده از اوپارسین[۷] و در سال ۱۹۹۹ برای ویرجینیامایسین[۸]، اسپیرامسین[۹]، تایلوزین[۱۰] و باسیتراسین[۱۱] به عنوان محرک رشد وضع کرد (Delsol et al., 2005; Turnidge, 2004). در سال ۲۰۰۵ نیز اتحادیه اروپا برای استفاده غیر درمانی تمامی داروهای ضد میکروبی در پرورش جانوران محدودیت هایی را اعمال نمود (Delsol, et al., 2005).

ایالات متحده آمریکا در این زمینه محدودیت های کمتری را اعمال کرد و در سال ۲۰۰۰ طرحی را برای منع استفاده از فلوروکوئینولون[۱۲] و ویرجینیامایسین ارائه کرد (Nawaz et al., 2001). در کنگره آمریکا، اعلامیه ای تحت عنوان « نگهداری آنتی بیوتیک ها برای درمان پزشکی سال ۲۰۰۵ » ارائه شد و بر اساس این اعلامیه کاربرد داروهای مورد استفاده در درمان بیماری های انسانی، برای پرورش جانوران به مدت دو سال ممنوع شد (Maroni, 2000).

در کشورهای آسیایی که محدودیت استفاده از آنتی بیوتیک در پرورش جانوران اعمال نشده، از طریق کنترل و بازرسی تولیدات صادر شده از این کشورها از نظر آلودگی آنتی بیوتیکی تحت فشار قرار گرفتند. اگرچه از سال ۱۹۹۹ در کشور تایلند، استفاده از کلرامفنیکل در پرورش جانوران ممنوع شده است اما تا سال ۲۰۰۴ آلودگی به این آنتی بیوتیک در میگوهای این کشور دیده می شد و اتحادیه اروپا واردات میگو به اروپا را ممنوع کرده بود (Heckman, 2004). کلرامفنیکل در میگوهای هند، پاکستان و ویتنام هنوز دیده می شود که نشان دهنده استفاده نادرست از داروهای ضد میکروبی در پرورش میگوی آسیا است.

یکی از مثال های شاخص در زمینه کاهش مصرف آنتی بیوتیک، پرورش ماهی سالمون در کشور نروژ است. از دهه ۱۹۸۰ تا سال ۲۰۰۰، ۹۵ درصد کاهش در میزان مصرف آنتی بیوتیک مشاهده است یعنی از ۵۰ تن در سال به ۱ تن در سال رسیده است. در همان دوره تولید ماهی سالمون از ۵۵۰۰ تن به ۵۵۰۰۰ تن افزایش یافت (۱۰ برابر). دلیل این پیشرفت چشمگیر، استفاده از واکسن، مدیریت بهتر و برنامه به گزینی می باشد (Maroni,

---

[۷] Avoparsin
[۸] Virginiamaysin
[۹] Spiramcin
[۱۰] Tylosin
[۱۱] Basitrasin
[۱۲] Fluoroquinolone

2000). امروزه گرایش زیادی به عدم مصرف بی رویه داروهای ضد میکروبی در جهان وجود دارد و به ناچار استفاده از روش های جایگزین نیز رو به افزایش است. پروبیوتیک ها یکی از جایگزین هایی است که امروزه مورد توجه قرار گرفته است.

در حال حاضر، پروبیوتیک به طور وسیعی در آمریکا، ژاپن، کشور های اروپایی، اندونزی و تایلند استفاده می شوند.پروبیوتیک ها می توانند سبب : ۱)تنظیم فلور میکروبی آب ، ۲)کنترل میکروارگانیسم های پاتوژن، ۳) بهبود فرآیند تجزیه مواد آلی ناخواسته در آب ها، ۴) بهبود محیط زیست اکولوژیکی، ۵) افزایش جمعیت ارگانیسم های مغذی، ۶) بهبود سطح تغذیه آبزیان، ۷) افزایش ایمنی آبزیان پرورشی در مقابله با میکروارگانیسم های بیماریزاو در نهایت سبب کاهش استفاده از آنتی بیوتیک ها ،مواد شیمیایی و نیز پیشگیری از اپیدمی های ناگهانی بیماری ها شوند (Vaseeharan & Ramasamy, 2003). بنابراین مطالعه بر روی پروبیوتیک ها می تواند گستره جدیدی از تولیدات صنعتی را همانند گستره صنعتی فرآوری آبزیان و غذای آبزیان فراهم نماید. در ایران یکی از منابع اقتصادی آبزی پروری است ولی کاربرد و توسعه پروبیوتیک در کشور ما در مقایسه با سایر کشورها بسیار ناچیز است.

صنعت تکثیر و پرورش میگو یکی از فعالیت های عمده آبزی پروری می باشد که درآمد حاصل از آن در بعضی کشورهای جهان در شمار نخستین درآمدهای ملی محسوب می شود و می تواند به عنوان راه حلی در برطرف کردن مشکل عمده کمبود مواد غذایی در جهان باشد. در دهه گذشته محصول میگوی صید شده و پرورشی در سطح جهان افزایش نشان داده است. به طوریکه محصول میگو از۲/۴ میلیون تن در سال ۱۹۸۷ به ۴/۲ میلیون تن در سال ۲۰۰۰ رسید، که البته یک افت تولید در سال ۱۹۹۶ به خاطر مواجهه با مسائل مربوط به بیماری ها دیده شد. تولید میگوی پرورشی نیز بتدریج از سالهای دهه ۱۹۸۰ افزایش یافت و در سال ۲۰۰۰، ۵۰٪ از سهم تولید کل میگوی جهان را برعهده داشت. ولی با شیوع بیماری ها و افزایش تمایل برای صید میگو این سهم به ۲۵٪ کاهش یافت و در سال ۲۰۰۳ محصول میگوی پرورشی به بیش از ۱/۶ میلیون تن رسید. بر اساس گزارش FAO تولید میگوی پرورشی در اوایل قرن بیست ویکم از مرز یک میلیون تن و در سال ۲۰۰۶ از مرز سه میلیون تن نیز گذشت (FAO, 2006).

بوشهر اولین استان ایران است که پرورش میگو در آن آغاز شد ودر سال ۱۳۶۳ میگوی ببری سبز[۱۳] به مدت ۵ ماه در شرایط آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات شیلاتی خلیج فارس (پژوهشکده میگوی کشور) پرورش داده شد (Matinfar, 1992). اما به دلیل مشکلاتی که بیشتر در زمینه کشت جلبک وتغذیه بود تکثیر میگوی ببری سبز متوقف شد و از سال ۱۳۶۸ تکثیر و پرورش میگوی سفید هندی[۱۴] در استان آغاز و توسعه یافت. میزان برداشت میگوی پرورشی سفید هندی دراستان بوشهراز سال ۱۳۷۴ لغایت ۱۳۸۳ از رشد مناسبی برخوردار بوده است، بطوری که در سال ۱۳۸۳ به ۵۶۰۰ تن رسید و میانگین وزنی اعلام شده تقریبا ۱۷ الی ۱۸ گرم بوده است که ارزش اقتصادی آن بالغ بر ۱۶۰ هزار میلیارد ریال می باشد، ولی در سال ۱۳۸۴ بدلیل بروز و شیوع بیماری لکه سفید [۱۵] به حدود ۵۰۰ تن رسید. با توجه به پایین بودن میانگین وزنی میگوهای برداشت شده در این سال ارزش اقتصادی آن به حدود ۹۰ میلیارد ریال کاهش یافته است و در سال های ۸۶ و ۸۷ پرورش میگوی سفید هندی در مزارع خصوصی استان بوشهر به طور کلی برچیده و میگوهای وارداتی پا سفید جایگزین میگوی بومی سفید هندی گشت (۶).

لذا از این پس در راستای نیل به اهداف برنامه راهبردی میگو درکنار فعالیت هایی که برای احیای پرورش میگوی سفید هندی و ببری سبز در استان صورت می گیرد، پژوهش هایی جهت افزایش میزان تولید در واحد سطح نیز بر روی میگوی پا سفید با توجه به شرایط اکولوژیک خاص موجود در استان بوشهر صورت می گیرد. زیرا علی رغم تولید پروبیوتیک های گوناگون در کشورهای مختلف جهان به دلیل شرایط خاص اکولوژیک موجود در استان بوشهر که شامل شوری بالا و دمای بالای آب می باشد پروبیوتیک های تجاری وارداتی اثربخشی خوبی ندارند و همچنین در پژوهش هایی که در سال های قبل بر روی میگوی سفید هندی صورت گرفته از روش های سنتی بر پایه ویژگیهای فنوتیپی، فیزیولوژیک و نیازهای رشد برای شناسایی باکتری ها استفاده گشته است که در مقایسه با تکنیک های نوین مولکولی فاقد حساسیت و ویژگی بالا می باشند. در این پژوهش با جداسازی وشناسایی مولکولی باکتری های موجود در دستگاه گوارش و محیط زیست میگوی پا سفید و استفاده از روش های غربالگری که امروزه برای انتخاب باکتری پروبیوتیکی مناسب صورت می گیرد

---

[۱۳] *Penaeus semisulcatus*

[۱۴] *Fenneropenaeus indicus*

[۱۵] White Spot Disease

گامی در جهت بومی کردن این دانش، افزایش میزان تولید میگوی پا سفید و حل یکی از مشکلات صنعت پرورش میگو در کشور برداشته می شود.

با توجه به اهمیت راهکارهای مناسب در پرورش میگو هدف از انجام این پژوهش به شرح ذیل می باشد:

۱- جداسازی و شناسایی مولکولی گونه های باکتری های مفید و غالب از دستگاه گوارش میگوی پا سفید و محیط زیست آن و مطالعه اثرات آنتاگونیستی آن ها به منظور انتخاب پروبیوتیک مناسب
۲- بررسی سینتیک رشد باکتری های انتخابی به عنوان پروبیوتیک در شرایط مشابه استخرهای پرورش میگو
۳- بررسی ماندگاری مواد ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری های منتخب در شرایط مشابه استخرهای پرورش میگو
۴- تعیین ماده موثره واجد اثر آنتاگونیستی تولید شده توسط باکتری های انتخابی بر گونه پاتوژن رایج

فصل دوم

مروری بر منابع

مروری بر منابع

۲-۱- تاریخچه پروبیوتیک

واژه پروبیوتیک به معنای « برای زندگی » است و از کلمه یونانی «pro» و«bios» گرفته شده است (۶۵). تعریف جامع و کامل تر آن در سال ۱۹۸۹ توسط فولر ارائه شد. او اعلام کرد: " پروبیوتیک یک افزودنی غذایی میکروبی زنده است که از طریق بهبود توازن روده میزبان ، دارای اثرات مفیدی برای جاندار می باشد (۶۰). این تعریف علی رغم نظرات مخالفی که دارد هنوز به صورت وسیعی استفاده می شود. کاربردهای امروزی پروبیوتیک و اطلاعات علمی جاری نشان داده است که اجزای غیر زنده میکروبی دارای اثرات مفیدی بوده و این اثرات مفید فقط محدود به روده نمی شود (۱۶۶). تعریف فولر در واقع تصحیح شده تعریف اولیه پروبیوتیک می باشد که در آن پروبیوتیک به تک یاخته هایی که با تولید موادی سبب تحریک سایر تک یاخته ها می شوند گفته می شد (۱۱۵). اگرچه در سی سال اخیر پژوهش های زیادی در زمینه پروبیوتیک انجام گرفته است اما ایده اولیه آن در اوایل دهه ۱۹۰۰ توسط Metchnikoff ارائه شد. وی در سال ۱۹۰۷ تئوری ارائه کرد که بر مبنای آن استفاده از محصولات شیری تخمیر شده به سلامت انسان کمک می کند (۱۲۸). امروزه پروبیوتیک ها جایگاه شناخته شده ای در بین غذاهای فراسودمند ارتقا دهنده سلامت انسان و همچنین جانوران دارند (۱۴۵, ۱۶۸).

۲-۲- پروبیوتیک در آبزی پروری

در سالیان اخیر میکروفلور دستگاه گوارش در تحقیقات پزشکی، دامپزشکی و سایر زمینه های علمی بشدت مورد توجه واقع شده و نمود یافته است. در نتیجه این تحقیقات، نقش اساسی و جدایی ناپذیر میکروفلور دستگاه گوارش در حفظ سلامتی دام بوضوح آشکار گردیده است. میکروفلور دستگاه گوارش نه تنها در هضم غذا بلکه در بروز مقاومت مطلوب در برابر بیماری ها نقش اساسی دارد.

زمانی که پروبیوتیک ها با هدف کاربرد درآبزی پروری مورد توجه قرار می گیرند، در نظر گرفتن فاکتورهایی که سبب تفاوت آن ها از پروبیوتیک های مورد استفاده در خشکی می شود ضروری است.

آبزیان با محیط زیست پیرامونشان ارتباط نزدیک تری دارند. پاتوژن ها داری توانایی زندگی در محیط پیرامون آبزیان (آب) و تکثیر مستقل از میزبانشان هستند (۸۸, ۱۸۳).

آبزیان بصورت مداوم این پاتوژن ها را از طریق فرایندهای تنظیم فشار اسمزی و تغذیه وارد بدن خود می کنند. در یک مطالعه ای بر روی ماهی هالیبوت[1] اقیانوس اطلس، تغییر فلور روده این ماهی از *Flavobacteria* spp. به فلور غالب *Aeromonas* spp. و *Vibrio* spp. پس از اولین تغذیه آبزی اتفاق افتاد (۱۷). این مطالعه بیان گر اثر محیط زیست خارجی و تغذیه بر فلور میکروبی ماهی می باشد. البته در مطالعه دیگری نشان داده شد که فلور میکروبی مرحله لاروی صدف های دوکفه ای با فلور آب موجود در تانک تغییر نمی کند زیرا زمان عبور باکتری ها آن قدر کوتاه است که جمعیت باکتریایی فرصت استقرار در دستگاه گوارش را ندارند (۱۵۸).

با توجه به ارتباط پیچیده آبزیان با محیط زیست پیرامونشان در مقایسه با جانداران خشکی ، تعریف پروبیوتیک برای زیستگاه های آبی باید اصلاح شود. Verschuere و همکارانش در سال ۲۰۰۰ تعریف ذیل را برای پروبیوتیک پیشنهاد نمودند : « افزودنی میکروبی زنده که از طریق اصلاح جامعه میکروبی درون یا پیرامون میزبان ، بهبود استفاده از غذا یا افزایش ارزش غذایی ، افزایش پاسخ میزبان علیه بیماری ها یا بهبود کیفیت محیط پیرامون آبزی دارای اثر مفیدی بر روی میزبان می باشد (۸۸, ۱۹۰). مشکل این تعریف طولانی بودن آن و همچنین اشاره به زنده بودن پروبیوتیک می باشد. طبق تعریف Austin و Irianto در سال ۲۰۰۲ « پروبیوتیک عبارت است از کل، بخش یا بخش هایی از یک میکروارگانیسم که برای سلامت میزبان مفید است (۱۸). این تعریف با تعریف قدیمی Salminen و همکارانش نیز تطابق دارد (۱۶۶). عدم نیاز به کشت زنده، استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان محرک سیستم ایمنی را امکان پذیر می سازد (۶۱, ۷۶) و می توان از اجزای باکتریایی مانند پپتیدوگلایکن و لیپوپلی ساکارید به عنوان پروبیوتیک استفاده کرد. اگرچه نظرات یکسانی در مورد تعریف پروبیوتیک در محیط آبی وجود ندارد، ولی تمامی تعاریفی که تا کنون ارائه شده است با تعریف فولر در سال ۱۹۸۹ متفاوت است و بر اساس تعاریف ارائه شده برای پروبیوتیک در محیط آبی، نیازی به عملکرد پروبیوتیک در لوله گوارش نیست. بنابراین رقابت برای مواد مغذی و تولید مواد بازدارنده در محیط پیرامون آبزی نیز می تواند صورت بگیرد و اثرات مفید دیگری را نیز می توان برای پروبیوتیک در نظر گرفت از جمله تغییر کیفیت آب و برهم کنش با فیتوپلانکتون ها (۹۹).

[1] *Hippoglossus hippoglossus*

در دهه اخیر رشد تصاعدی کاربرد پروبیوتیک ها در آبزی پروری مشاهده شده است. تا کنون بیش از صد کمپانی تولیدات گوناگونی از پروبیوتیک ها را به بازار ارائه کرده اند و سالیانه بیش از ۵۰هزار تن از تولیدات پروبیوتیکی فروخته می شوند که ارزش آنها حدود ۵۰ میلیون یورو است.

۲-۳- انواع پروبیوتیک ها در آبزی پروری

بر اساس بسیاری از مقالات، پروبیوتیک مناسب باید دارای یک سری ویژگی هایی باشد که این ویژگی ها به منظور کمک به تولید صحیح یک محصول مؤثر و ایمن ارائه شده است. ویژگی های ارائه شده برای پروبیوتیک های مورد استفاده در آبزی پروری عبارتند از (۹۸):

- پروبیوتیک نباید برای میزبانش مضر باشد.
- پروبیوتیک باید توسط میزبان از طریق هضم یا قابلیت کلونیزاسیون و یا تکثیر قابل پذیرش باشد.
- پروبیوتیک باید قابلیت رسیدن به مکانی که در آن تأثیرگذار است را داشته باشد.
- پروبیوتیک مناسب باید در شرایط درون تن مانند شرایط برون تن به خوبی عمل نماید.
- پروبیوتیک نباید شامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی یا ویرولانس باشد.

پروبیوتیک های باکتریایی و مخمری که در آبزی پروری استفاده می شوند شامل:

- باکتری های فتوسنتزکننده*(PSB)*
- باکتری های دارای فعالیت آنتاگونیستی مانند:*Pseudoaltreromonas* spp. ، *Flavobacterium* spp. ، *Alteromonas* spp.، *Phaeobacter* spp.، *Bacillus* spp. و غیره)
- میکروارگانیسم هایی که دارای اثرات آنزیمی و تغذیه ای در هضم غذا هستند مانند: باکتری های اسیدلاکتیک، مخمرها و غیره)
- باکتری های بهبود دهنده کیفیت آب
- و اخیراً پروبیوتیک های ترکیبی[۱] می باشد(۱۵۴).

که در ذیل به شرح مختصری از هر یک پرداخته شده است.

[۱] Microecologius

- باکتری های فتوسنتزکننده:

بطور کلی باکتری های فتوسنتزکننده در ۵ شاخه قرار می گیرند که عبارتند از: *Cyanobacteria*, *Chlorobi*، *Chloroflexi* (فتوتروف های بی هوازی رشته ای)، *Firmicutes* (*Heliobacteria*) و پروتئوباکترها (باکتری های ارغوانی گوگردی و غیرگوگردی) (۲۸).

باکتری های ارغوانی غیر گوگردی در آبهای شیرین، شور، خاک و چشمه های آب گرم پراکنش دارند و دارای مسیرهای متابولیک مختلفی برای تجزیه ضایعات آلی می باشند. دیواره سلولی این باکتری ها قابل هضم و غنی از پروتئین، کارتنوئید، کوفاکتورهای زیستی و ویتامین ها می باشد (۱۰۵) افزودن باکتری های فتوسنتیک بعنوان افزودنی خوراکی محرک رشد میگو و ماهی است و سبب افزایش ضریب بازماندگی لارو ماهی و بهبود تولید نرم تنان و سایر آبزیان می گردند (۱۵۴).

- باکتری های دارای فعالیت آنتاگونیستی:

فعالیت آنتاگونیستی در بین باکتریها یک پدیده رایج در طبیعت است. بنابراین بر هم کنش میکروبی نقش مهمی در توازن میان میکروارگانیسم های مفید و پاتوژن دارد. برخی از میکروارگانیسم ها که در دستگاه گوارش آبزیان زندگی می کنند بواسطه فعالیت آنتاگونیستی سبب حذف سایر میکروارگانیسم ها شده و بدین ترتیب با تغییر در ترکیب جامعه میکروبی دستگاه گوارش آبزی کاهش یا حذف پاتوژن های فرصت طلب صورت می گیرد (۲۰). به عنوان مثال دارای اثرات باز دارنده رشد *Vibrio anguillarum* است. Mo و همکارانش (۲۰۰۱) پس از غربالگری ۶۰۲ ایزوله از محیط های پرورش آبزیان باکتری گرم منفی به نام*odoratum* *Flavobacterium* را شناسایی کردندکه دارای خواص آنتاگونیستی بوده و علیه ۳۳ سویه از ۳۷ سویه ویبریو خاصیت بازدارندگی از رشد داشت (۱۳۱).

Li و همکارانش (۲۰۰۱) پنج سویه باکتریایی متعلق به جنس *Alteromonas* از میگوهای پنائیده سالم و استخرهای پرورش میگو جدا کردند که از رشد باکتری های پاتوژن در آبزیان جلوگیری می کنند.سویه A18 به نام *A. aurantia* که امروزه *Pseudoalteromonas* نامیده می شود توانایی تولید پپتید ضد میکروبی را در شرایط آزمایشگاهی داشته و تعداد ویبریوها را در محل پرورش لارو نرم تنان کاهش می دهد (۱۹۴, ۱۹۵).

بر اساس گزارش Dong و همکارانش (۲۰۰۷) باکتری *Phaeobacter inhibens* جداسازی شده از بیوفیلم دریایی از رشد گونه های پاتوژن ویبریو مانند: *V. harveyi*، *V. anguillarum* و *V. parahaemolyticus* جلوگیری می کند(۵۰).

یکی دیگر از انواع پروبیوتیک هایی که مورد مطالعات زیادی قرار گرفته اند سویه های باسیلوس (*Bacillus* spp.) می باشند. سویه های باسیلوس توانایی اتصال، تولید باکتریوسین (پپیتیدهای دارای خاصیت ضد میکروبی) و تحریک سیستم ایمنی را دارند (۳۸, ۷۸). طبق، مطالعات صورت گرفته به نظر می رسد که این سویه های باکتریایی، پروبیوتیک های مؤثری بوده و محصولات تجاری حاوی این سویه ها سبب بهبود تولید میگوهای پرورشی می شوند (۴۲) همچنین نحوه نگهداری سویه هایی از باسیلوس که تولید کننده اسپور می باشند بسیار راحت می باشد (۸۲). برخی از باکتری های باسیلوس اتوکتونوس مانند *Bacillus subtilis* که از دستگاه گوارش یا محیط پرورش ماهی یا میگو جداسازی شده اند در آبزی پروری کاربرد فراوانی داشته و دارای اثرات آنتاگونیستی بر پاتوژن هایی مانند *Aeromonas hydrophila*بوده و یا سبب کاهش میزان آمونیاک آب محل پرورش می شوند (۸۴). باسیلوس های جداسازی شده از خشکی کاربرد فراوانی داشته و منبع اصلی سویه های پروبیوتیکی هستند (۱۱۸).

- میکروارگانیسم هایی که دارای اثرات آنزیمی و تغذیه ای در هضم غذا هستند :

بر اساس آزمایشات و تجربیات حاصل از صنایع غذایی و به دلیل ایمن بودن برخی از باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک[۱] و مخمرها به سرعت به عنوان پروبیوتیک در شیلات پذیرفته شدند. علت کاربرد زیاد این باکتری ها مقاومت آن ها در محیط های اسیدی و صفراوی و همچنین زیستگاه طبیعی آن هاست که در روده می باشد. گونه های لاکتوباسیل سبب تبدیل لاکتوز به اسید لاکتیک، کاهش اسیدیته لوله گوارش و جلوگیری از کلونیزاسین بسیاری از باکتری ها در روده می شوند (۱۰۴, ۱۳۲).

رایجترین پروبیوتیک مورد استفاده *Lactobacilli* spp. و *Bifidobacterium* spp هستند که به تعداد زیادی در روده جانداران سالم وجود دارند (۷۴, ۱۶۳) و بر اساس گزارش سازمان غذا و دارو آمریکا(FDA) از نظر

[۱] LAB: Lactic Acid Bacteria

GRAS[1] ایمن هستند (۱۴۸). بسیاری از تولیدات پروبیوتیکی تجاری حاوی لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتریوم ها هستند اگرچه نام گونه یا سویه مورد استفاده بر روی برچسب محصولات تجاری ذکر نمی شود (۱۵۴).

بر روی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* نیز مورد مطالعات زیادی انجام گرفته است و ویژگی هایی مانند تحریک سیستم ایمنی و تولید مواد بازدارنده از آن گزارش شده است (۱۸۷).

- باکتری های بهبود دهنده کیفیت آب:

ازدیاد مواد آلی و بقایای نیتروژنی مانند آمونیوم و آمونیاک در آبزی پروری بسیار مورد توجه می باشد. نیتریفیکاسیون فرآیندی است که در طی آن آمونیاک به نیترات تبدیل می شود و در آن دو گروه از باکتری ها شامل باکتریهای اکسیدکننده آمونیاک و باکتریهای اکسیدکننده نیتریت نقش دارند. این فرآیند به جلوگیری از تولید آمونیاک سمّی کمک می کند. باکتری های نیتریفایر (در حد کیلوگرم) بصورت تجاری موجود نیستند. دنیتریفایرهای هوازی، باکتری های مناسبی برای کاهش نیترات و نیتریت و تبدیل آنها به N_2 هستند. Liao و همکارانش در سال ۲۰۰۶ یک سویه جدید هوازی از باکتری های دنیتریفایر به نام *Stenetrophomonas maltophilia* را از استخرهای میگو جداسازی کردند، این سویه دارای ژن nirs بود که محصول آن نیتریت ردوکتاز می باشد (۱۱۳). اخیراً ۲۷ سویه باکتریایی دنیتریفایر (که توانایی احیای نیترات و نیتریت را دارند) از استخرهای میگو جداسازی شده اند و بر اساس آنالیز توالی ژن 16S rDNA، ۲۷سویه باکتریایی متعلق به ۱۱ جنس بودند که عبارتند از: *Pseudomonas*، *Halomonas*، *Acinetobacter*، *Paracoccus*، *Arthrobacter*، *Microbacterium*، *Cellulosimicrobium*، *Bacillus*، *Stenotrophomas* و *Sphingobacterium* (۱۹۳, ۱۹۶). امروزه تمایل زیادی به ترکیب باکتری های فتوسنتزکننده، باسیلوس های نیتریفایرها و دنیتریفایرها به عنوان پروبیوتیک در آبزی پروری دیده می شود (۱۵۴).

شایان ذکر است که فیتوپلانکتون ها نیز با تولید مواد سمّی بر علیه باکتری ها اثرات مفیدی دارند برای مثال *Skeletonema Costatum* یک ریزجلبک است که در پرورش نرم تنان و سخت پوستان استفاده می شود و عصاره آلی را تولید می کند که از رشد *Listonella anaguillarum* و سایر جلبک ها جلوگیری می کند (۱۳۴). در مطالعه دیگری نشان داده شده که ریزجلبک *Caulobacter* sp. آنتی بیوتیک تیوتروپسین[2] را تولید می کند که این

[1] Generally Recognized As safe (GRAS)

[2] thiotropcin

ترکیب نه تنها دارای اثر مهارکنندگی بر روی پاتوژن ماهی *Lactococcus garvieae* است بلکه دارای فعالیت ضد ریزجلبکی علیه *Skeletonema costatum* و *Heterosigma akashiwo* نیز می باشد (۹۶).

۲-۴- مکانیسم عمل کرد پروبیوتیک ها

پروبیوتیک ها از روش های گوناگون و به صورت تکی یا ترکیب با پروبیوتیک های دیگر عمل می کنند. این راه ها عبارتند از: تولید ترکیبات آنتاگونیستی و بازدارندگی از رشد پاتوژن ها، رقابت در اتصال به جایگاه های اتصال موجود در لوله گوارش، رقابت در دریافت مواد غذایی، تغییر درفعالیت آنزیمی پاتوژن ها، تحریک سیستم ایمنی، بهبود هضم و جذب غذا در دستگاه گوارش (۹۹). در برخی گزارشات اشاره شده است که پروبیوتیک ها باید قابلیت اتصال و کلونیزه شدن در دستگاه گوارش، تکثیر به تعداد زیاد، تولید مواد ضد میکروبی و تحمل شرایط اسیدی دستگاه گوارش را داشته باشند (۶۵, ۱۳۲). البته ،این تعریف در صورتیکه پروبیوتیک عضو پایدار و همیشگی فلور روده باشد درست است. اگرچه باکتری های دارای این ویژگی رایج بوده و پژوهش های انجام گرفته روی پروبیوتیک ها بروی توانایی اتصال باکتری ها به روده تمرکز کرده است امّا باکتری هایی که عضو گذرا و موقت روده می باشند نیز دارای آثار مفیدی بروی میزبان می باشند (۸۸). علاوه بر این، پروبیوتیک می تواند فقط از یک طریق عمل کند و نیازی نیست که حتماً توانایی اتصال به مخاط و تولید مواد ضد میکروبی را به صورت توام داشته باشد . استفاده از گونه ها و سویه های گوناگون پروبیوتیکی بصورت همراه با هم امکان عملکرد چند جانبه پروبیوتیک در بدن میزبان و افزایش ایمنی و سلامت را ممکن می سازد (۱۸۳).

مطالعات بسیاری روش عملکرد پروبیوتیک ها در محیط های آبی را نشان داده است. Bairagi وهمکارانش در سال ۲۰۰۲ به بررسی باکتری های موجود در لوله گوارش شش ماهی آب شیرین پرداختند. آن ها دریافتند که سویه های انتخاب شده آنزیم های هضمی تولید می کنند و بدین ترتیب سبب بهبود هضم و استفاده از غذا در ماهیان می شوند(۱۷).

Dixon وRamirez نیز در سال ۲۰۰۳ خواص آنزیمی باکتری های بی هوازی رودهٔ سه گونه ماهی را بررسی و نقش بالقوه و مهم پروبیوتیک ها را نشان دادند (۱۵۸). Bairagi و همکارانش (۲۰۰۴) دریافتند که افزودن دو گونهٔ باسیلوس *B. circulans* و *B. subtilis* موجود در رودهٔ ماهی به رژیم غذایی ماهی سبب افزایش

شاخص های رشد، ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارآیی پروتئین می شود. آنها این آثار را به تولید آنزیم های خارج سلولی سلولولیتیک و آمیلولیتیک نسبت دادند (۱۸).

اگرچه رقابت برای اتصال به جایگاه های اتصال روده یکی از مکانیسم های پیشنهادی عملکرد پروبیوتیک هاست اما شواهد کمی برای اثبات آن وجود دارد. گزارشات زیادی مبنی بر اتصال باکتری های خاص به مخاط روده در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد اما در مدل حیوانی این نتایج تایید نشده است (۷۶). توانایی اتصال باکتری های پروبیوتیکی بالقوه در شرایط آزمایشگاهی قابل تعمیم به مدل حیوانی نیست. علاوه بر این مطالعات زیادی تا به امروز توانایی اتصال باکتری های خاصی را به مخاط روده نشان داده است اما آنها وجود رقابت در این اتصال را نتوانسته اند اثبات کنند (۶۱, ۹۹). Vin وهمکارانش (۲۰۰۴) نشان دادند که در مخاط رودهٔ ماهی بین پنج پروبیوتیک و دو پاتوژن ماهی رقابت وجود دارد. حضور یکی از پروبیوتیک ها در مخاط روده از اتصال یکی از پاتوژن های مورد آزمایش ممانعت کرد. از سوی دیگر کلونیزاسیون اولیه با پروبیوتیک های دیگر سبب افزایش کلونیزاسیون این دو پاتوژن گردید ولی تیمار ماهی با پروبیوتیک ها پس از مواجهه با باکتری های پاتوژن، از لانه گزینی پاتوژن ها جلوگیری نمود (۱۹۲). بر اساس برخی پژوهش های صورت گرفته اتصال به سطح برای عملکرد مؤثر برخی از باکتری های پروبیوتیکی الزامی است (۲۰۴). Irianto و Austin (۲۰۰۲) نشان دادند که افزودن باکتری های پروبیوتیکی در مراحل اولیه باروری تخم آبزی اثرات سودمندی دارد (۸۶). اما طبق بررسی های Makridis و همکارانش (۲۰۰۰) تعداد باکتری های پروبیوتیک افزوده شده در رودهٔ لارو سپر ماهی قبل و بعد از مرحلهٔ تفریخ دو روز بعد اختلاف معنی داری وجود نداشت (۱۲۴).

پژوهش های زیادی نشان داده که پروبیوتیک ها سبب رقابت در مصرف منبع انرژی می شوند (۱۹۰). رقابت برای دریافت آهن یکی از مهم ترین فاکتورها در باکتری های دریایی می باشد(۹۸, ۱۹۰). آهن مورد نیاز رشد اکثر باکتری ها است، اما بیشتر محدود به بافت ها و مایعات بدن جانوران است و به فرم آهن فریک (Fe^{3+}) نا محلول موجود می باشد (۱۹۰). سیدروفورها که مواد متصل شونده به آهن هستند، آهن مورد نیاز برای رشد میکروبی را تامین می کنند. تولید سیدرفور یکی از مکانیسم های مهم ویرولانس در بسیاری از پاتوژن ها است. پروبیوتیک تولید کنندهٔ سیدروفور می تواند در شرایط کمبود آهن، رشد پاتوژن های وابسته به آهن را محدود کند. این عملکرد در سال ۱۹۹۹ توسط Gram و همکارانش نشان داده شد، آنها دریافتند که مایع رویی

محیط کشت حاوی *Pseudomonas fluorescens* که در شرایط کمبود آهن رشد می کند، از رشد *V. anguillarum* جلوگیری می کند در صورتیکه مایع رویی محیط کشت حاوی آهن این عملکرد را ندارد (۷۱).

Itami و همکارانش در سال ۱۹۹۸ دریافتند که افزون پپتیدوگلایکن باکتری *Bifidobacterium thermophilum* به غذای میگوی Kuruma بصورت معنی داری سبب افزایش بازماندگی آن ها پس از مواجهه با *V. penaeicida* می شود. آن ها این ماده را به عنوان محرک سیستم ایمنی معرفی کردند زیرا فعالیت فاگوسیتی گرانولوسیت های میگوهای تیمار بصورت معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود (۸۹).

Gullian و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به جای استفاده از مشتقات باکتریایی مانند پپتیدوگلایکن و لیپوپلی ساکارید به عنوان محرک ایمنی، از باکتری های زندهٔ *Vibrio* sp. سویه p64 و *V. alginolyticus* استفاده کردند. بر اساس نتایج آن ها این دو باکتری محرک سیستم ایمنی هستند (۷۲). در مطالعه مروری از Smith و همکارانش (۲۰۰۳) اطلاعات مهمی در زمینه مشکلات بالقوه استفاده از محرک سیستم ایمنی در پرورش سخت پوستان مورد بحث قرار گرفته است. آن ها اعلام کردند که استفاده طولانی از محرک های سیستم ایمنی برای میزبان مضر بوده و پژوهش های بیشتری پیش از استفاده از آن ها باید صورت بگیرد (۱۷۳) به نظر می رسد بیشترین مدل عملکرد پروبیوتیک که در آبزیان مورد مطالعه قرار گرفته است تولید مواد بازدارنده توسط آن ها می باشد (۹۸).

۲-۵- تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور پیرامون کاربرد پروبیوتیک ها در آبزی پروری

در ذیل بیان مختصر پیشینه تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور پیرامون کاربرد پروبیوتیک ها در آبزی پروری بخصوص پرورش میگو ارائه شده است (**Error! Reference source not found.**):

در تحقیقی که توسط حسن نیا و همکاران(۱۳۸۱) به منظور تعیین اثر باکتری *Pseudomonas fluorescence* بر رشد و بقای میگوی سفید هندی[۱] در مرحله لاروی اولیه از ناپلیوس پنج تا پست لاروی چهار انجام گرفت، اثر باکتری در آزمایشات مختلف به صورت مکمل غذای زنده و یا جایگزین جلبک بر لارو میگو مورد مطالعه قرار گرفت و عوامل زیست سنجی از قبیل بقا، طول بدن و وزن لارو های

[۱] *Penaeus indicus*

میگو ثبت و گردید. نتایج حاصله اثر مثبت باکتری فوق را بر رشد و بازماندگی میگوی سفید هندی نشان می دهد به گونه ای که استفاده از ۵۰ میلی گرم در لیتر باکتری *Pseudomonas fluorescence* توانست تا ۲۶۶٪ بقا، ۵۶٪ طول و ۱۲۲٪ وزن را بهبود بخشد (۵،۶).

حسن نیا و همکاران (۱۳۸۵) در پژوهشی به مطالعه تاثیر باکتری های خانواده ویبریوناسه به عنوان پروبیوتیک بر روی رشد، بازماندگی و مقاومت میگوهای سفید هندی در مراحل تکثیر و پرورش پرداخته و از آب دریا، آب و لجن کارگاه های تولیدی و همچنین میگوهای پرورشی باکتری های مختلفی از خانواده ویبریوناسه جداسازی کردند و در آزمایشات مختلف اثرات این باکتری ها را بر مراحل مختلف زندگی میگو و غذای زنده مورد استفاده از جمله جلبک های کتوسروس، تتراسلمیس و اسکلتونما در سه مرحله متفاوت از ناپلیوس سه و چهار تا پست لاروی سیزده و چهارده و مراحل بالاتر آن بررسی کردند. بر اساس نتایج این تحقیق *Vibrio alginolyticus* 1 با تراکم 10^7 سلول در هر میلی لیتر قادر به ۷۱ درصد افزایش در تولید جلبک *Tetraselmis* spp. بود و همچنین *Vibrio splendidus* I نیز موجب افزایش طول در پست لاور چهار شده و ترکیب *Vibrio fischeri* +*Vibrio alginolyticus* موجب بهبود طول و وزن لاروهای میگو به طور معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد گردد (۷).

Ziaei-Nejad و همکاران (۲۰۰۶) اثر باکتری *Bacillus* spp. جداسازی شده از پروبیوتیک تجاری پروتوکسین را به عنوان پروبیوتیک بر روی فعالیت آنزیم های گوارشی، بازماندگی و رشد میگوی سفید هندی مورد بررسی قرار دادند. آنها در طی سه مرحله شامل افزودن مستقیم پروبیوتیک به آب در مراحل ناپلیوس ۲-۱ تا زوآی ۳، افزودن پروبیوتیک به آب و یا تغذیه میگوها با آرتمیای غنی شده با پروبیوتیک در مراحل مایسس ۱ تا پست لارو ۴ و افزودن مستقیم پروبیوتیک به آب در مراحل پست لارو ۳۰ تا پست لارو ۱۲۰ در تغذیه میگو اثرات پروبیوتیک را مورد بررسی قرار دادند بر اساس نتایج حاصل، در تمام تیمارها تعداد باکتری *Bacillus* spp. در روده بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود. تعداد کل باکتری در گروه کنترل و تیمار تفاوت معنی داری نداشت. میزان کلونیزاسیون باسیلوس در روده پست لارو ها کم بود. میزان فعالیت آنزیم های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در گروه تیمار بیش از کنترل بود. میگو هایی که پروبیوتیک دریافت کرده بودند میزان بازماندگی(۱۷-۱۱ درصد) و وزن مرطوب (۲۲-۸ درصد) بیشتر از گروه شاهد بود. در میگوهایی که آرتمیای

غنی شده با پروبیوتیک دریافت کرده بودند تعداد باسیلوس بیشتر از میگو هایی بود که با آب حاوی پروبیوتیک غذادهی شده بودند ولی میزان رشد و بازماندگی دو گروه فرقی نداشت. در تمامی مراحلی که میگوها با پروبیوتیک غذادهی شده بودند، ضریب تبدیل غذا، ضریب رشد و تولیدات نهایی بالاتر از گروه کنترل بود. میگو هایی که هم در مراحل لاروی و هم در مراحل پست لاروی پروبیوتیک دریافت کردند ضریب رشدشان بیشتر از سایرین بود (۲۰۹).

Nogami و Meada در سال ۱۹۹۲ سوشی از باکتری را از استخرهای پرورش سخت پوستان جداسازی کردند که این سوش باکتریایی سبب بهبود رشد لارو خرچنگی بنام *Portunus trituberculatus* و سرکوب کردن رشد سایر باکتری های پاتوژن به خصوص *Vibrio* spp. گردید و علی رغم اثر بازدارندگی در آب دریا سبب مرگ میکروآلگ های مفید آب دریا نشد (۱۴۰).

Qiao و همکاران نیز در سال ۱۹۹۲ اثرات سه سوش باکتری فتوسنتیک را در رژیم غذایی میگوی چینی[1] مطالعه نمودند و نتیجه گرفتند که افزودن این باکتری ها در غذا یا آب، رشد میگو ها و کیفیت آب را بهبود می بخشد (۱۵۵).

Austin و همکاران در سال ۱۹۹۲ یک نوع میکروآلگ به نام *Tetraselmis suecica* را گزارش کردند که می تواند بر روی باکتری های بیماریزای ماهی اثر بازدارندگی داشته باشد. افزودن *T. suecica* به عنوان مکمل غذایی برای ماهی سالمون در شرایط آزمایشگاهی، سبب بازدارندگی از رشد *Aeromonos hydrophila*، *A. salmonicida*، *Serratia liquefaciens*، *Vibrio anguillaram*، *V.salmonicida* و *Yersina ruckeri* type 1 می شود (۱۵).

بر اساس مطالعات Smith و Davey (۱۹۹۳) سویه ای از باکتری *Pseudomonads* spp. با خاصیت فلئورسنت می تواند از رشد *A. salmonicida* که پاتوژن شناخته شده ماهی است، جلوگیری کند (۱۷۲).

[1] *P. chinensis*

Douillet و Langdon در سال ۱۹۹۴ مطالعه ای بر روی استفاده از پروبیوتیک ها در پرورش لارو صدف اقیانوسی انجام دادند و باکتری پروبیوتیک را به محل پرورش گزنیک صدف اضافه و مشاهده کردند که سبب افزایش رشد لارو در فصول مختلف سال می گردد (۵۲).

در سال ۱۹۹۵ Austin و همکاران گزارش دادند که مایع رویی کشت منجمد شده یکی از سوش های *V. alginolyticus* غیر بیماریزای ماهی آزاد زمانی که با استفاده از روش Cross-streaking به باکتری های پاتوژنی مانند *V. ordalii*، *V. anguillarum*، *A. salmonicida* و *Y. ruckeri* افزوده می شود سبب کاهش تدریجی در تعداد سلول های قابل کشت در مقایسه با کنترل می گردد و بدین ترتیب از رشد پاتوژن های ماهی جلوگیری می نماید (۱۵).

Garriques و Arevalo (۱۹۹۵) گزارش کردند استفاده از *V. alginolyticus* به عنوان پروبیوتیک سبب افزایش بازماندگی و رشد پست لارو میگوی پا سفید می گردد و مکانیسم عمل آن به این ترتیب است که با باکتری های پاتوژن رقابت کرده و می تواند نیاز به آنتی بیوتیک را در سیستم های متراکم پرورش لارو برای پیشگیری کاهش دهد (۶۲).

بر اساس نتایج مطالعات Sugita و Shibug (۱۹۹۶) باکتری های دستگاه گوارش دارای توانایی ضدباکتریایی در ماهی های آب شیرین می باشند. آنها باکتری ها را از دستگاه گوارش ۷ نوع از ماهی های پرورشی آب شیرین جداسازی و فعالیت ضدباکتریایی آنها را بر روی ۱۸ باکتری پاتوژن رایج ماهی یا انسان مورد بررسی قرار دادند، نتایج آنها نشان داد که باکتری های جداسازی شده از دستگاه گوارش دارای خواص آنتی باکتریال هستند (۱۷۸).

بر اساس مطالعات Jiravanichpasial و همکاران در سال ۱۹۹۷ از *Lactpbacillus* spp. می توان به عنوان پروبیوتیک در میگوی ببری سیاه بالغ[۱] استفاده کرد، آنها اثرات گونه های لاکتوباسیلوس را بر میگوی ببری سیاه مبتلا به بیماری های ویبریوزیس و لکه سفید در شوری ۲۰ ppt آب دریا به مدت ۷ روز بررسی کردند و همچنین فعالیت بازدارندگی دو سوش لاکتوباسیلوس را بر روی *Vibrio* spp.، *E. coli*، *Staphylococcus* spp. ، *Bacillus subtilis* مشخص نمودند (۹۳).

[۱] *P. monodon fabricus*

Maeda و Nogami در سال ۱۹۹۸ به بررسی برخی جنبه های کنترل بیولوژیک بواسطه پروبیوتیک ها در آبزی پروری پرداخته اند. در مطالعه آنها سوش های ویبریویی که دارای فعالیت ثابت و مداوم در بهبود رشد لارو میگو و خرچنگ می باشند مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج آنها از این باکتری ها می توان به منظور ایجاد تعادل بیولوژیک بین میکروارگانیسم های مفید و مضر که با هم در رقابت هستند، سود جست و همچنین این باکتری ها جمعیت گونه های ویبریو را که سبب آسیب های وسیعی در زمینه تولید لارو می گردد کاهش می دهند (۱۲۳).

Avendano و Riquelme نیز (۱۹۹۹) بر روی رشد هفت سویه باکتریایی همراه ریز جلبک *Isochrysis galbana* تحقیق کردند و دریافتند که چهار سویه اثری بر روی رشد ریز جلبک ها نداشته و کشت همزمان آنها به صورت معنی داری سبب بهبود هضم باکتری C33 توسط لارو دو کفه ای *Argopecten purpuratus* می شود(۱۶).

در مطالعه ای که توسط Rengpipat و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شده است استفاده از باسیلوس سوش S11 موجب فعال شدن سیستم ایمنی سلولار و هومورال میگوی ببری سیاه می گردد (۱۶۰).

بر اساس گزارش Dalmin و همکاران در سال ۲۰۰۱ .*Bacillus* spp موجب بهبود کیفیت آب و افزایش میزان رشد و بازماندگی میگو های ببری سیاه جوان و کاهش ویبریو های بیماریزا می شود (۴۰).

Chythanya و همکاران در سال ۲۰۰۲ از باکتری *Pseudomonas* I2 جداسازی شده از دریا به عنوان پروبیوتیک در پیشگیری از ویبریوزیس در میگو استفاده کرده اند(۳۷).

Gomez - Gil و همکارانش (۲۰۰۲) به پروبیوتیک *Vibrio alginolyticus* سویه C7b دست یافتند که قابل استفاده در غذای مرحله لاروی میگو بود و در کشت همزمان با *Chaetoceros muelleri* اثری برروی این ریز جلبک نداشت (۶۶)

Balcazar و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که استفاده از سوش های باسیلوس و ویبریو بطور همزمان اثر مثبت بر رشد و بازماندگی میگوی پا سفید جوان داشته و قدرت دفاعی این آبزی را در برابر *V haryeyi*. افزایش می دهد (۱۹).

بر اساس تحقیقات Vasseharan و همکاران (۲۰۰۳) در هند ویبریوهای پاتوژن در شرایط درون تن و برون تن توسط *B. subtilis* سویه BT23 کنترل می شوند و از آنها می توان در مزارع پرورش میگوی میگوی ببری سیاه به منظور کنترل ویبریوزیس استفاده کرد (۱۸۹).

Lee در سال ۲۰۰۳ اعلام کرد، گونه ای از باکتری سودوموناس دریایی ماده ای شیمیایی با وزن مولکولی پایین تولید می کند که خاصیت مهاری بر ویبریوها از جمله *V. harveyi* دارد (۱۰۹).

در سال ۲۰۰۶ Li گزارش کرد بکار گیری *Arthrobacter* spp. به عنوان پروبیوتیک سبب افزایش بازماندگی پست لارو میگوی چینی در مقابل عوامل بیماریزا می شود (۱۱۱).

Bourouni و همکاران (۲۰۰۷) ۱۳۲ سویه باکتریایی را از صدف خوراکی جداسازی و شناسایی نمودند و پس از بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، خاصیت بازدارندگی آنها را بر روی پاتوژن های رایج ماهی و صدف مورد بررسی قرار داده و در نهایت ۹ سویه باکتریایی (*Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria*, *Pseudomonas cepacia*, *Vibrio* spp, *Serratia liquefaciens* و *Lactobacillus rhamnosus*) که بیشترین اثر بازدارندگی را در شرایط آزمایشگاهی داشتند انتخاب نمودند (۳۴).

در سال ۲۰۰۹ Guo و همکاران سه باکتری *Bacillus foraminis, Bacillus cereus biovar toyoi* و *Bacillus fusiformis* را جداسازی و از این باکتری ها در غذای مرحله زوآی ۱ تا پست لارو ۱ میگوی پا سفید استفاده کردند و بر اساس نتایج حاصل باکتری *Bacillus fusiformis* به میزان 10^5CFU/ml بصورت معنا داری سبب افزایش بازماندگی لاروها می شود(۷۳).

Ma و همکارانش (۲۰۰۹) سویه های لاکتوباسیلوس JK-8 و JK-11 را از آب مزارع پرورش میگو جداسازی کردند و اعلام کردند که این باکتری ها میزان نیترات، نیتریت و آمونیوم آب را کاهش داده و همچنین سوپرناتنت عاری از سلول این باکتری ها توانایی از بین بردن باکتری های پاتوژن میگو را دارد (۱۲۲).

Nimrat و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند استفاده از مخلوط باکتری، مخمر و ریز جلبک spp. *Chaetoceros* سبب افزایش رشد و ضریب بازماندگی مراحل پست لارو ۱ الی ۲۱ میگوی پا سفید می شود و

افزودن مخلوط فریز درای شده و یا میکروانکپسوله این میکروارگانیسم ها به آب و یا غنی سازی آرتمیا با آن ها سبب بهبود شاخص های رشد و بازماندگی در مراکز تکثیر میگوی پا سفید می گردد(۱۳۸).

بر اساس گزارش Zokaeifar و همکاران (۲۰۱۲) غذادهی میگوهای پا سفید توسط دو سویه *Bacillus subtilis* به مدت ۸ هفته و سپس بررسی اثر آنها در پیشگیری از بروز ویبریوزیس نشان داد که استفاده از این باکتری ها سبب افزایش وزن نهایی، ضریب رشد و فعالیت آنزیمی در مقایسه با گروه کنترل گردید و همچنین ضریب رشد ویژه و درصد بازماندگی در میگوهایی که با دوز 10^8 CFU/ml از باکتری ها تغذیه شده بودند اختلاف معناداری با گروه شاهد داشتند. همچنین آنالیز Real Time PCR نشان داد که بر اثر تغذیه با این باکتری ها ژن های مرتبط با سیستم ایمنی میگو بیان می شوند و این باکتری ها به عنوان محرک سیستم ایمنی نیز عمل می کنند.

طبق یافته های پژوهش Nimrat و همکاران (۲۰۱۲) استفاده همزمان مخلوط *Bacillus* spp. سبب بهبود رشد و درصد بازماندگی پست لارو میگوی پا سفید می شود و همچنین بهبود کیفیت با تعدیل میزان اسیدیته آمونیاک و نیتریت ایجاد می گردد(۱۳۹).

جدول ۰-۱- مروری برپژوهش های انجام شده در زمینه پروبیوتیک ها بر روی میگو

ردیف	آبزی مورد آزمایش	پروبیوتیک	باکتری پاتوژن مورد آزمایش	منبع
۱	میگوی سفید هندی	*Pseudomonas fluorescence*، ویبریوناسه	شاخص های رشد و بازماندگی	(۷،۶،۵)
۲	میگوی سفید هندی	پروبیوتیک تجاری پروتوکسین حاوی *Bacillus* spp.	شاخص های رشد و بازماندگی	(۲۰۹)
۳	میگوی چینی	Photosyntetic bacteria	شاخص های رشد و بازماندگی و کیفیت آب	(۱۵۵)
۴	میگوی پا سفید (مرحله لاروی)	*V. alginolyticus*	شاخص های رشد و بازماندگی	(۶۲)
۵	میگوی ببری سیاه	*Lactpbacillus* spp.	*Vibrio* spp.، *E. coli*، *Staphylococcus* spp.، *Bacillus subtilis*	(۹۳)
۶	میگو	*Vibrio alginolyticus*	شاخص های رشد	(۴۹)
۷	میگوی ببری سیاه	*Bacillus* sp. (S11)	تحریک سیستم ایمنی و *V. harveyi*	(۱۵۸، ۱۵۹)
۸	میگوی ببری سیاه	*Bacillus* spp	شاخص های رشد و بازماندگی و کیفیت آب	(۴۰)
۹	میگوی ببری سیاه	*B. subtilis*	*V. harveyi*	(۱۸۹)
۱۰	میگوی پا سفید	*Vibrio*. spp., *Bacillus* spp	*V. harveyi* و شاخص های رشد و بازماندگی	(۱۹)
۱۱	میگو	*Pseudomonas* I2	*V. harveyi*	(۳۷)
۱۲	میگوی چینی	*Arthrobacter* XE-7	*V. parahaemolyticus, V. anguillarum, V. nereis*	(۱۱۱)
۱۳		*Pseudomonas* sp.	*V. harveyi*	(۱۰۹)
۱۴	میگوی پا سفید	*Bacillus fusiformis*	شاخص های رشد و بازماندگی	(۷۳)
۱۵	میگو	*Lactpbacillus* spp.	ویبریوناسه و کیفیت آب	(۱۲۲)

۲-۶- مروری بر مواد فعال زیستی مترشحه از میکروارگانیسم های دریایی

باکتری ها و قارچ ها از تولیدکننده های اصلی مواد مواد فعال زیستی در اکوسیستم خشکی می باشند. به نظر می رسد که این ارگانیسم ها نقش مشابهی در دریاها و اقیانوس ها داشته باشند. فعالیت های آنتی بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد مخمری از این ارگانیسم ها گزارش شده است(۲۵).

همچنین مطالعات نشان داده است که برخی از این ترکیبات سبب تحریک رشد، بهبود زخم و درمان سرطان می گردند. در میان باکتری های گوناگونی که خواص ضد میکروبی نشان می دهند یک سویه ای از *Pseudomonas piscicida* فعالیت ضدمیکروبی زیادی دارد. این باکتری دارای کلونی قرمز رنگ بوده و توانایی تولید ویتامین B و مواد ضد میکروبی در آب دریا دارد(۱۵۳).

باکتری ها و قارچ های موجود در دریا توانایی تولید مواد مؤثر بر سیستم اعصاب مرکزی، دستگاه تنفس، سیستم عصبی قلب و دستگاه گوارش را دارند(۲۵). تعدادی از این مواد آثار موضعی مانند درد، نکروز، ادم، فلج و غیره ایجاد می نمایند. قارچ دریایی *Cephalosporium acremonium* جداسازی شده از فاضلاب خروجی سواحل، آنتی بیوتیک های زیادی را تولید می کند(۹۷). آنتی بیوتیک های حساس به پنی سیلیناز که آنتی بیوتیک N active ضدباکتری های گرم منفی از این منبع جداسازی گشته اند، این ماده سفالوسپورین C است که با سفالوسپورین N متفاوت است (۲۵). آنتی بیوتیک سفالوسپورین p و سفالوتین که مشتق نیمه مصنوعی سفالوسپورین C است نیز از این قارچ جداسازی شده اند، این آنتی بیوتیک فعالیتی مشابه بنزیل پنی سیلین دارد اما به پنی سیلیناز حساس نیست و علیه استافیلوکوکوس های مقاوم به پنی سیلین و تعدادی از سویه های باکتری های گرم منفی مؤثر است (۲۵) سایر آنتی بیوتیک های جدا شده از سفالوسپوریوم آکرمونیوم عبارتند از: سفالوسپورین های p_1، p_2، p_3، p_4 و p_5. سفالوسپورین p_1 در شرایط آزمایشگاهی فعالیت خوبی علیه *B. mesentericus*، *Mycobacterium phlei* و *S.aureus* دارد.

Serratia marcescens دریایی نیز باکتری غیر بیماریزایی است که پراکنش وسیعی دارد و آنتی بیوتیک قرمز رنگی به نام پرودیجیوسین[۱] تولید می کند که فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی دارد (۲۵).

[۱] Prodigiosin

بنابراین به نظر می رسد که باکتری های دریایی توانایی تولید آنتی بیوتیک های جدید و متنوعی را داشته و بسیاری از این مواد فعال زیستی بی شک در پزشکی و داروسازی کاربرد دارند.

۲-۷- باسیلوس ها و کاربرد آن ها در فناوری زیستی

از نظر فیلوژنتیکی، باکتری های جنس باسیلوس به شاخهٔ فیرمیکوتس (Firmicutes) تعلق دارند. این باکتری ها گرم مثبت، هوازی و اسپوردار می باشند. مشخصهٔ اصلی این باکتری ها، شکل میله ای سلول ها، تولید کاتالاز و پراکنش جهانی آن ها است. این باکتری ها در محیط های زیست گوناگونی مانند، خاک، گل، صخره، گرد و غبار، آب، محصولات کشاورزی، غذا و دستگاه گوارش حشرات و جانوران مختلف یافت می شوند (۱۳۷). توانایی زنده ماندن و رشد در چنین اکوسیستم هایی به علت تولید فراوان اسپور، گوناگونی خصوصیات فیزیولوژیک و نیازهای رشد آن ها می باشد. گونه های باسیلوس از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی ناهمکن می باشند (۱۵۲, ۱۷۱) و همچنین توانایی تجزیه سوبستراهای متفاوتی با منشاء گیاهی و حیوانی مانند سلولز، نشاسته، پروتئین، آگار، هیدروکربن ها و سوخت های زیستی را دارند (۱۲۱). علاوه بر این، برخی گونه های باسیلوس نیتریفایرهای هتروتروف، دنیتریفایر، تثبیت کننده نیتروژن، رسوب دهندهٔ آهن، اکسید کننده سلینم، اکسیدکننده و احیا کننده منگنز، شیمولیتوتروف اختیاری، اسیدوفیل (اسید دوست)، آلکالوفیل(قلیا دوست)، سایکروفیل(سرما دوست)، ترموفیل (گرما دوست) و غیره هستند (۱۵۲, ۱۷۱). این گوناگونی در خصوصیات فیزلوژیک باسیلوس ها سبب تنوع سویه های باسیلوس و توانایی کلونیزه شدن آن ها در گسترهٔ وسیعی از زیستگاه های اکولوژیک می شود. گوناگونی زیستگاه باسیلوس ها بیشتر به واسطهٔ تولید اسپور است که مقاومت قابل توجه و دورهٔ نهفتگی دارد. مقاومت اسپورها به گرما، خشکی، مواد ضدعفونی کننده و سایر روش های استریل کردن به دلیل خسارات اقتصادی که در صنایع غذایی ایجاد می نماید مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۱۰).

اعضای باسیلوس های گروه Sensu lato مواد ضد میکروبی شامل آنتی بیوتیک های پپتیدی، لیپوپپتیدی و باکتریوسین تولید می کنند(۱۷۵). تولید مواد ضد میکروبی و اسپور توسط سویه های باسیلوس دو مزیت مهم این باکتری ها در قابلیت زنده مانی آن ها می باشد. وجود گونه های باسیلوس در غذا همیشه به معنای فساد و مسمومیت مواد غذایی نمی باشد، بلکه برخی گونه ها یا سویه ها در تولید غذای انسان و حیوان نیز استفاده می شوند. برای مثال، سویه های *Bacillus subtilis* در غذاهای تخمیری آسیای شرقی و غذای سنتی ژاپنی

(ناتو) استفاده می شوند(۸۳). علاوه بر این ، سویه های خاصی از *B. subtilis* به عنوان کشت آغازگر برای تخمیر دانه های سویا به عنوان چاشنی محلی داوداوا[1] (۱۸۲) یا تخمیر دانه های کهور آفریقایی در تولید ادویه اکپه غذای نیجریه ای استفاده می شود (۱۴۳).

Bacillus cereus ssp. toyoi غیر توکسینوژن بوده و به واسطه داشتن خواص پروبیوتیکی به صورت افزودنی در غذای جانوران استفاده می شود (۱۱۹) گونه ها و سویه های باسیلوس دیگری هم وجود دارند که سبب فساد و مسمومیت مواد غذایی می شوند از جمله *B. cereus*، *B. coagulans* ، *B. mycoides*، *B. weihenstephanensis*، *B. licheniformis* ، *B. subtilis* ، *B. pumilus*، *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* . بنابراین انتخاب باسیلوس بعنوان پروبیوتیک یا کشت آغازگر نیاز به روش دقیق و بررسی عدم حضور عوامل ویرولانس در باکتری را دارد (۱۰).

۲-۸- پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده توسط گونه های باسیلوس

باکتری های گرم مثبت توانایی زیادی در تولید پپتیدهای ضد میکروبی دارند. این مواد دارای خاصیت ضد میکروبی علیه برخی میکروارگانیسم ها می باشند. پپتیدهای ضد میکروبی ای که توسط ریبوزوم سنتز می شوند را باکتریوسین می نامند. باکتریوسین ها یک گروه ناهمگن از مواد ضد میکروبی پروتئینی هستند که از انواع باکتری ها تولید می شوند (۱۶۱, ۱۶۲). آن ها بصورت ویژه بر روی باکتری های هم خانوادهٔ باکتری تولید کننده مؤثرهستند البته بسیاری ازآنها دامنهٔ فعالیت وسیع تری را دارا می باشند (۹۱). ماهیت پروتئینی آن ها سبب شده که در دستگاه گوارش انسان و حیوان یک تجزیه کننده مناسب و در صنایع غذایی به عنوان یک نگهدارندهٔ طبیعی محسوب شوند. کولیسین که از *Escherichia coli* تولید می شود اولین باکتریوسین توصیف شده است (۳۳). امروزه بیشتر بر روی باکتریوسین های تولید شده از باکتری های لاکتیک مطالعه می شود، زیرا بیشتر سویه های آن ها در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده زیستی ایمن شناخته شده اند (۱۴۱) البته گونه های باسیلوس مهم صنعتی به کار رفته در صنایع غذایی نیز به عنوان گونه های ایمن می باشند (۱۵۰).

[1] Dawadawa

بسیاری از مواد ضد میکروبی دیگر مترشحه از باکتری ها را با توجه به ویژگی هایشان نمی توان در گروه خاصی قرار داد به همین دلیل به عنوان مواد بازدارنده شبیه باکتریوسین [1] نامیده می شوند. این واژه زمانی به کار می رود که ماهیت پپتیدی ترکیب ضد میکروبی تأیید نشده باشد.

در مورد باسیلوس ها، باکتریوسین واقعی از طریق ریبوزوم سنتز می شود زیرا این گروه باکتری ها پپتید های ضد میکروبی (یا لیپوپپتیدهایی) را از طریق مسیر غیر ریبوزومی نیز تولید می کنند (مانند ایتورین [2] و غیره). باکتریوسین ها و مواد بازدارنده شبه باکتریوسین تولید شد توسط باسیلوس های گروه sensu lato نسبت به باکتریوسین هایی که توسط باکتری های اسید لاکتیک تولید می گردند در رده دوم اهمیت قرار دارند (۱۰).

جنس باسیلوس پپتیدهای ضدمیکروبی گوناگون و متنوعی را تولید می کند که هر یک ساختار شیمیایی خاصی دارند (۱۷۵). تا به امروزه طبقه بندی خاصی برای باکتریوسین های باسیلوسی ارائه نشده است اما طبقه بندی های خوبی برای باکتریوسین های باکتری های لاکتیک ارائه شده است که شاید به علت فقدان اطلاعات در زمینه توالی اسیدهای آمینه باکتریوسین ها یا گوناگونی قابل توجه پپتیدها یا پروتئین های تولید شده توسط باسیلوس ها باشد (۱۰).

تعدادی از پپتیدهای ضد میکروبی باسیلوس ها در طبقه بندی باکتریوسین های لاکتیک قرار می گیرند. برای مثال لنتی بیوتیک ها [3] یک گروه منحصر به فرد از پپتیدهای ضدمیکروبی تولید شده توسط باسیلوس ها هستند که در گروه ۶ باکتریوسین های باکتری های لاکتیک قرار می گیرند (۱۰, ۱۳۶). لنتی بیوتیک ها از مسیر ریبوزوم سنتز می شوند و به عنوان پپتیدهای پیش ساز هستند. در مسیر اصلاحات پس از ترجمه ای بواسطهٔ دهیدراسیون سرین و ترئونین و اضافه شدن بین ملکولی سیستین، پل (β متیل) لنتیونین تیو اتر تشکیل می شود که شاخص ساختاری لنتی بیوتیک ها می باشد (۲۶) اکثر باکتریوسین ها و شبه باکتریوسین های تولید شده توسط گونه های باسیلوس در گروه II باکتریوسین های باکتری های لاکتیک قرار می گیرند (۱۰, ۱۳۶) و

---

[1] Bacteriocin Like Inhibitory Substances (BLIS)

[2] Iturins

[3] Lantibiotic

شامل باکتریوسین های شبیه پدیوسین کلاس II a [1] و باکتریوسین های دوپپتیدی کلاس IIb هستند. در ذیل خلاصه ای از طبقه بندی باکتریوسین و شبه باکتریوسین باسیلوس ها ارائه شده است.

۲-۹- طبقه بندی باکتریوسین های تولیدی توسط باسیلوس

طبقه بندی اصلی که برای پپتیدهای ضدمیکروبی سنتز شده از مسیر ریبوزومی در دسترس است براساس باکتریوسین های باکتری های لاکتیک می باشد. این طبقه بندی اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط Klaenhammer انجام شد و سپس تغییراتی بر روی آن اعمال شد در این طبقه بندی، برخی از باکتریوسین های باسیلوسی به گروه لنتی بیوتیک ها تعلق دارند(۱۳۶, ۱۸۵). لنتی بیوتیک ها به دو گروه یا تیپ تقسیم می شوند: گروه A شامل لنتی بیوتیک های خطی بلند با بار الکتریکی مثبت و گروه B شامل لنتی بیوتیک های کروی و بدون بار الکتریکی است. گروه A لنتی بیوتیک ها براساس آنزیمی هایی که در تکامل مولکول آن به کار می رود به دو زیر گروه تقسیم می شود، زیر گروه A I وA II (۲۰۱) زیر گروه A I با آنزیم های Lan B و LanC و سرین پروتئاز اختصاصی LanP اصلاح می شود. زیر گروه A II با آنزیم LanM اصلاح شده، انتقال و فعال سازی آن با ABC transporter LanT انجام می شود که دارای فعالیت پروتئازی N ترمینال نیز می باشد. علاوه بر این، لنتی بیوتیک های دو جزئی شامل دو پپتید اصلاح شدهٔ پس ترجمه ای هستند که به صورت سینرژیک با هم عمل کنند و در گروه سوم طبقه بندی می شوند (۱۴). اگرچه این گروه سوم شبیه زیر گروه A II هستند اما ولی یکی از ساب یونیت های باکتریوسین بسیار مشابه مرساسیدین [2] است که فرم اولیهٔ زیر گروه A II می باشد. سایر لنتی بیوتیک هایی که در سال های اخیر تعریف شده اند (مانند پانی باسیلین [3] یا سوبلانسین۱۶۸ [4] در هیچ کدام از گروه های تعریف شدهٔ لنتی بیوتیک ها قرار نمی گیرند. به همین دلیل، طبقه بندی باکتریوسین های باسیلوس باید مستقل از باکتریوسین های باکتری های لاکتیک باشد. سیستم طبقه بندی باکتریوسین های باسیلوسی که توسط Abriouel و همکارانش (۲۰۱۱) ارائه شده است به شرح ذیل می باشد (۱۰):

---

[1] Pediocin – like

[2] Mersacidin

[3] Paenibacillin

[4] Sublancin

گروه I : شامل پپتیدهای ضد میکروبی است که تحت انواع مختلفی از اصلاحات پس از ترجمه ای قرار می گیرند این گروه به ۴ زیر گروه تقسیم می شود. زیر گروه های I.1 الی I.3 شامل پپتیدهایی هستند که اصلاحات پس ترجمه ای آن ها مثل لنتی بیوتیک ها است. زیر گروه I.4 شامل اصلاحات پس ترجمه ای منحصر بفردی است. زیر گروه I.1 در بر گیرندهٔ تیپ A لنتی بیوتیک ها با ساختار خطی و طویل است مانند سوبتیلن[۱] ( ) ، اریسین S[۲] و اریسین A[۳].

زیر گروه I.2 : شامل تیپ B لنتی بیوتیک مرساسیدین با ساختار کروی و سایرلنتی بیوتیک ها مانند سوبلانسین ۱۶۸ و پانی باسیلین است.

زیر گروه I.3 : نیز شامل لنتی بیوتیک های دو جزئی مانند هالودوراسین[۴] و لیکنی سیدین[۵] می باشد.

زیر گروه I.4 : شامل پپتید حلقوی منحصر بفرد سوبتیلوزینA[۶] می باشد که دارای باندی از سر به دم پپتید است که مانند پل سولفیدی ویژه ای بین گروه های سیستین و بقایای بدون آب اسید آمینه تشکیل شده است.

این طبقه بندی بر اساس نتایج سکانس اسیدهای آمینهٔ باکتریوسین هایی است که تا به حال چاپ و منتشر شده است.

گروه II : شامل باکتریوسین های کوچک (۰/۷۷ –۱۰ kDa) سنتز شده توسط ریبوزوم ، غیر اصلاح شده و خطی است که به حرارت واسیدیته مقاوم می باشند.این گروه به چهار زیر گروه تقسیم می شود :

---

[۱] Subtilin

[۲] Ericin S

[۳] Ericin A

[۴] Haioduracin

[۵] Lichenicidin

[۶] Subtilosin A

زیر گروهII.1 : شامل پپتیدهای شبیه پدیوسین با متیف ثابت YGNGVXC نزدیک N ترمینال است. کوآگولین[1] باسیلوس کوآگولانس I4 و باکتریوسین های *B. circulance* و *Paenibacillus polymyxa* سویه های SRCAM 37، SRCAM 602 و SRCAM 1580 به این زیر گروه تعلق دارند.

زیر گروه II.2 : شامل پپتیدهای مشابه توریسین [2] است که دارای متیف ثابت DWTXWSXL در نزدیکی ناحیهٔ N ترمینال می باشد مانند باکتوریسین F4 [3]، تورین سینH [4]، تورین سینS و ۱۷ که توسط سویه های ب.تورینجینسیس و سرئین MRX1 که توسط سویه های *B. cereus* تولید می شود .

زیر گروه I.3 : در برگیرندهٔ پپتیدهای خطی دیگرمانند لیکنین[5]تولید شده توسط *B. licheniformis* یا سرئین 7Aو 7B است.

گروه III : شامل پروتئین های بزرگ (KDa<۳۰) با فعالیت فسفولیپازی است مانند مگاسین های[6] A – 2 تولید شده توسط *B. megaterium* می باشد.

بسیاری از انواع پلی پپتیدهای ضد میکروبی دارای اندازهٔ حد وسط (KDa ۳۰-۱۰) و سایر پروتئین های ضد میکروبی بزرگ تولید شده توسط باسیلوس ها در این طبقه بندی قرار نمی گیرند زیرا اطلاعاتی در زمینهٔ توالی اسید آمینه یا ژن آن ها وجود ندارد. این انواع در گروه مواد شبه باکتریوسینی قرار می گیرند.

۲-۱۰- کاربرد باکتریوسین های تولیدی توسط باسیلوس ها

- کاربرد در سلامت انسان

افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک های مرسوم سبب توجّه بیشتر به باکتریوسین ها به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های انسانی (و احتمالاً جانوران) گشته است (۱۰۸). مقاومت متقاطع بین باکتریوسین ها و آنتی بیوتیک های مرسوم مورد استفاده در پزشکی به ندرت گزارش شده است زیرا این دو

---

[1] Coagulin

[2] Thuricin

[3] Bacthuricin

[4] Thurincin

[5] Lichenin

[6] Megacin

گروه مواد ضد میکروبی هدف سلولی متفاوتی دارند. باکتریوسین ها یا شبه باکتریو سین های متعددی از گونه های باسیلوس ترشح می شوند که دارای خواص آنتی باکتریال در برابر باکتری های پاتوژن مهم هستند. برای مثال شبه باکتریوسین های تولید شده توسط *B. sphaericus* عبارتند از : پومی لیسین4 [1] یا لنتی بیوتیک های لیکنی سیدین [2]، هالودوراسین [3] و مرساسیدین [4]. هالودوراسین بیشتر کاربرد پزشکی دارد زیرا در pH فیزیولوژیک پایدارتر از نیسین است (۱۴۴). مرساسیدین خواص ضد میکروبی قوی علیه استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط برون تن و درون تن دارد. لنتی بیوتیک سوبتیلورین A دارای خواص آنتی باکتریال علیه پاتوژن هایی مثل *L. monocytogenes* ، *G. vaginalis* و *S. agalactiae* است، برخی از باکتریوسین ها و شبه باکتریوسین ها دارای خواص ضد قارچی نیز می باشند و در پزشکی مصرف می شوند (۱۰). از سویه های تولید کننده باکتریوسین به عنوان پروبیوتیک انسانی نیز استفاده میشود. زیرا این سویه ها دارای فعالیت بازدارندگی علیه پاتوژن های روده مانند *Clostridium perfringens* ، *Clostridium difficile* و غیره هستند. به عنوان مثال *B. polyfermenticus* SCD که تولید کننده فرمنتیسین SCD است، برای درمان طولانی مدّت مشکلات روده استفاده می شود و دارای فعالیت بازدارندگی علیه *C. perfringens* است (۱۱۰). سویه های پروبیوتیکی *B. clausi* O/C مواد بازدارنده ای را علیه *Staphylococcus aureus* ، *Enterococcus faecalis* و *C. difficile* تولید می کند. توریسین SD نیز به صورت ویژه بر *C. difficile* موثر است (۱۰).

از باکتریوسین های تولید شده توسط باسیولوس ها به عنوان کنتراسپتیو طبیعی نیز استفاده می شود، یک مثال خوب از این مورد سوبتیلوزین A است که دارای خاصیت اسپرم کشی علیه اسپرماتوزای انسان و تعدادی از جانوران اهلی است (۱۷۹).

- کاربرد در پرورش دام:

تعدادی از سویه های باسیلوس به صورت تجاری در دسترس می باشند و از آنها در پرورش دام، بهبود وزن دام یا ماکیان استفاده می شود .برای مثال Bio plus 2B شامل مخلوطی از سویه های *Bacillus licheniformis* و *Bacillus subtilis* است. از باسیلوس های تولید کننده باکتریوسین می توان به عنوان

---

[1] Pumilicin
[2] Lichenicidin
[3] Haloduracin
[4] Mersacidin

پروبیوتیک در پرورش و بهبود سلامت دام استفاده کرد. سویه هایی از *Bacillus licheniformis* ، باکتریوسین لیکنین[1] تولید می کند که دارای خواص آنتی باکتریال علیه *S. bovis* و *Eubacterium ruminantium* است و فعالیت هیدرولیتیک قابل توجهی در برابر انواع پلی ساکاریدها دارد. *Bacillus amyloliquefaciens* T 5640 به عنوان پروبیوتیک در غذای ماکیان استفاده می شود و با نام تجاری Ecobiol ®,Norel and nature nutrition در دسترس است. این باکتری شبه باکتریوسین تولید می کند و سبب کاهش اثر باکتری های پاتوژنی مانند *C. perfringens*، *E. coli* و *Yersinia* spp. می شود.

از *B. circulans* و *B. polymixa* نیز در پرورش ماکیان استفاده می شود. از سویه های NRRL B-30507 و NRRL B-30508 و *B.circulans* NRRL B-30644 که تولید کننده باکتریوسین هستند، برای درمان غیر آنتی بیوتیکی جانوران در برابر *Campylobacter jejuni* استفاده می شود. مصرف خوراکی این باکتریوسین سبب کاهش کلونیزاسیون این باکتری وکاهش ریسک کمپیلوباکتریوزیس می شود.

از باکتریوسین های باسیلوسی که فعالیت بازدارندگی شدید علیه استافیلوکوکوس دارند می توان در کنترل ماستایتیس (ورم پستان) گاوهای شیرده استفاده کرد. در سال های اخیر شبه باکتریوسین های متعددی از ب. تورینجینسیس مانند مریسین ۲۶۹[2] ،کورستاسین287 [3] ، کنیاسین ۴۰۴[4] ،انتومسین ۴۲۰[5] ،تولورتسین ۵۲۴[6] بر روی کلکسیونی از سویه های مختلف *Staphylococcus aureus* جداسازی شده از منابع لبنی و مقاوم به آنتی بیوتیک های تجاری رایج آزمایش شدند. علی رغم تفاوت های سویه های *S. aureus* در حساسیت، مهمترین نتیجه از شبه باکتریوسین مریسین ۲۶۹ و کورستاسین ۲۸۷ به دست آمد. طبق نظر Abriouel و همکارانش (۲۰۱۱) این پتپیدهای ضد میکروبی روش جایگزین مناسبی برای کنترل ورم پستان گاو می باشند و استفاده از فرم تخلیص و تلغیظ شده این باکتریوسین ها را برای پیشگیری و درمان بیماری ورم پستان پیشنهاد کرده اند (۱۰).

---

[1] Lichenin

[2] Morricin

[3] Kurstacin

[4] Kenyacin

[5] Entomocin

[6] Tolworrthcin

کاربرد در صنایع غذایی

افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای محصولات غذایی دارای کمترین فراوری یا غذای تازه بدون هیچ نگهدارنده شیمیایی، توجه پژوهشگران را به مواد ضد میکروبی طبیعی مانند باکتریوسین ها معطوف کرده است. اگرچه بیشتر مطالعات بر روی باکتریوسین های باکتری های لاکتیک خصوصا نیسین صورت گرفته است. نیسین تنها باکتریوسینی است که تا کنون مجوز نگهدارنده زیستی را گرفته است. کاربردهای آن محدود به اسیدیته خنثی یا قلیایی است و به همین جهت پژوهشگران در جهت یافتن باکتریوسینی جدید با خصوصیات فیزیکوشیمیایی بهبود یافته (پایداری در گستره وسیعتری از اسیدیته ودما) و طیف فعالیت ضد میکروبی گسترده به عنوان نگهدارنده زیستی تلاش می نمایند. اگرچه باکتریوسین های متعددی از سویه های باسیلوس تولید می شوند اما هنوز تحت آزمایش و ارزشیابی هستند و یکی از مهمترین مشکلات دراین زمینه فقدان GRAS برای گونه های باسیلوس به غیر از *B. licheniformis* و *B. subtilis* است. بعلاوه تعدادی از گونه ها بسیار پاتوژن بوده و یا در غذا سم تولید می کنند مانند سویه های *B. anthracis*، *B. cereus* توکسین زا، *B. coagulans*، *B. mycoides*، *B. weihenstephanensis*، *B. licheniformis*، *B. subtilis*، *B. pumilus*، *B. thuringiensis* و *B. sphaericus*.

در سال های اخیر اداره سلامت غذای اروپا (EFSA) سویه های *B.cereus* را برای تغذیه حیوانات مورد تایید قرار داده است. جنبه های کیفی استانداردی که برای سویه های باسیلوس در نظر گرفته شده شامل موارد زیر است :

- عدم وجود توکسین های مسموم کننده غذا
- نداشتن فعالیت سورفاکتانتی و انتروتوکسیکی

اگرچه در صنایع غذایی از سویه های تولید کننده باکتریوسین یا باکتریوسین آن ها به عنوان نگهدارنده استفاده می شود اما باید شرایط ذکر شده توسط EFSA را داشته باشند. باکتریوسین های تولید شده توسط باسیلوس ها پتانسیل کاربرد به عنوان نگهدارنده مواد غذایی مختلف در صنایع لبنی، شیر و پنیر را دارند. دو مثال

شاخص باسیلوسین ۴۹۰[1] و سرئین 8A می باشند. باسیلوسین ۴۹۰ علیه گونه های باسیلوس نزدیک به هم در شرایط هوازی و بی هوازی فعال است و فعالیت باکتری کشی خود را در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، گستره وسیعی از pH، دمای بالا و مواد غذایی مانند شیر حفظ می کند. لذا از باسیلوسین ۴۹۰ می توان در فراوری مواد غذایی در دمای بالا به عنوان مکمل ماده ضد میکروبی نیسین که (در اسیدیته خنثی یا قلیایی فعالیت کمی دارد) استفاده کرد.

باکتریوسین دیگری که در محصولات لبنی (شیر و پنیر نرم) برای کنترل *Listeria monocytogenes* استفاده می شود سرئین 8A است که توسط *B. cereus* 8A تولید می شود، افزودن $160\ AU\ ml^{-1}$ سرئین 8A به شیر بسیار گرم سبب کاهش سه سیکل لگاریتمی سلول های زنده در طی دوره ۱۴ روزه در دمای ۴۰°C گشت. اما سرئین 8A در پنیر نرم نوع میناس فقط در شروع فاز رشد لگاریتمی، تاخیر ایجاد کرد.

فعالیت ضد میکروبی سرئین 8A بر ضد *Samonella enteritidis* توسط EDTA و سدیم لاکتات افزایش می یابد. بنابراین توانایی و دامنه عملکرد سرئین 8A مانند باکتریوسین های لاکتوباسیل ها بواسطه ترکیب با داستبلایزرهای خارج غشایی افزایش می یابد.

کاربرد دیگری که برای باکتریوسین باسیلوسی گزارش شده، استفاده از آن به عنوان نگهدارنده در صنایع گوشت ماکیان است که از BLIS تولید شده توسط سویه *B. amyloliqufaciens* GA1 استفاده می شود.

یکی از مشکلات کاربرد باکتریوسین ها در صنایع غذایی، هزینه تولید در مقیاس صنعتی است. سرئین 8A را می توان با کشت سویه های تولید کننده آن در محیط BHI براث[2] و محیط سویا به میزان زیاد و با هزینه مناسبی تولید کرد. پپتیدهای ضد میکروبی دیگری نیز پتانسیل کاربرد به عنوان نگهدارنده مواد غذایی را دارند. بیشتر آنها نسبت به حرارت و اسیدیته ی موجود در طی فرآوری مواد غذایی مقاوم بوده و توسط پروتئازها تجزیه می شوند همچنین تعداد زیادی از آنها دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و از رشد پاتوژن های مواد غذایی جلوگیری می کنند و برروی گستره وسیعی از میکرو ارگانیسم ها شامل باکتری های گرم مثبت، گرم

---

[1] Bacillocin

[2] Brain-Heart Infusion

منفی و حتی قارچ ها موثرند. از این نظر باکتریوسین های باسیلوسی بهتر از باکتریوسین های باکتری های اسید لاکتیک هستند. برای مثال پپتیدهای p34، پانی باسیلین ،پلیکسین [1] از سویه های *B. polymyxa* جدا شده از سوسیس تخمیری آرژانتینی تولید می شوند همچنین پپتیدهای ضد قارچی که از سویه های *B. breveis* جدا شده از غذای سنتی کره ای کیمچی تولید می شوند. علاوه بر این سویه های باسیلوس نقش مهمی را در تولید غذاهای تخمیری قلیایی و نوشیدنی های تخمیری ایفا می کنند (۱۰). کاربرد سویه های تولید کننده باکتریوسین در مواد غذایی یک فرصت جدید در نگهدارنده های زیستی موادغذایی ایجاد می کند.

- کاربرد در محیط زیست (۱۰)

باسیلوس ها در خاک و گیاهان یافت می شوند. به همین دلیل سویه های تولید کننده باکتریوسین یا شبه باکتریوسین ها که دارای فعالیت ضد باکتریایی یا ضد قارچی هستند را می توان برای کنترل زیستی استفاده نمود. بسیاری از باکتریوسین ها یا شبه باکتریوسین های تولید شده توسط باسیلوس ها قابلیت مهار رشد باکتری های پاتوژن های گیاهی را دارند و از این سویه ها و باکتریوسین ها ی نیمه تخلیص شده در کنترل زیستی بیماری های گیاهی استفاده می شود.

برای مثال اری سین S [2] برروی آفت باکتریایی گوجه فرنگی به نام *C. michiganensis* موثر است. اری سین تخلیص شده یا سویه تولید کننده آن را می توان برای حفاظت زیستی گیاه گوجه فرنگی به کار برد. مثال دیگر Bac 14B است که یک شبه باکتریوسین تولید شده از *B. subtilis* 14B جداسازی شده از ایزوسفر گیاهان سالم می باشد. Bac 14B بر *A. tumefaciens* موثر بوده و از آن برای کنترل زیستی این پاتوژن گیاهی استفاده می نمایند.

باکتری های ریزوسفر با مکانیسم های گوناگونی سبب تحریک رشد گیاهان می شوند. این باکتری ها در کشاورزی کاربردهای گوناگونی دارند گونه های باسیلوس به عنوان عوامل محرک رشد یا مقاومت در برابر بیماری گیاهان شناخته شده اند. به عنوان مثال پلی پتپید تولید شده توسط سویه *B. thurengiensis* NEB17 که از گرهک ریشه سویا جدا شده است. به همراه سویه *Bradyrhizobium japonicum* 532 C سبب افزایش گرهک زایی در ریشه می شود. همچنین این سویه پپتید ضد

---

[1] Polyxin

[2] Ericin

باکتری توری سین ۱۷ را تولید می کند که محرک رشد گیاه (و تغییر شکل تارهای ریشه گیاه به فرم حلقوMerckی و گرهک زایی است. استفاده مستقیم توریسین بر روی برگ یا ریشه سبب تحریک رشد سویا و ذرت می گردد. سکانس N ترمینال اسید آمینه ی توریسین ۱۷ همولوژی زیادی با باکتریوسین های باسیلوسی مانند : توری سین S ، توری سین H ، باکتوری سینF4 یا سرئین MRX1 دارد. به همین دلیل این باکتریوسین ها هم احتمالاً سبب تحریک رشد گیاه می شوند.

این باکتریوسین ها عملکرد دوگانه داشته و لذا می توان از آنها نه تنها برای بهبود رشد گیاهان ومحصولات کشاورزی بلکه جلوگیری از رشد باکتری های پاتوژن و یا کاهش آلودگی گیاهان به باکتری های پاتوژن انسانی مانند *L. monocytogenes* و.spp *Salmonella* استفاده کرد.

از شبه باکتریوسین هایی که خواص ضد قارچی دارند می توان در کنترل زیستی فساد گیاهان و کنترل های بعد از برداشت میوه جات و سبزی جات استفاده نمود. برای مثال، سویه ب.آمیلو لیکوئی فاسینس RC-2، شبه باکتریوسینی تولید می کند که علیه *C. dematium*، قارچ توت سفید و بسیاری از قارچ ها وباکتری های بیماری زای گیاهی مانند: *R. nectrix* ، *P. oryzane* ، *A. tumefaciens* و Pv.campestris *X.compestris* موثر است.

باسیلوس های تولید کننده باکتریوسین کاربردهای دیگری هم در محیط زیست دارند و سویه های جالبی از مخازن زیستی جداسازی شده اند. برای مثال *B.cereus* سویه Q1 تولید کننده سرئیسیدین [۱] یا سویه های تولید کننده شبه باکتریوسین جداسازی شده از مخازن نفتی برزیل که خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری های احیا کننده سولفات دارند. سویه *B. firmus* H2O-1، شبه باکتریوسین پپتیدی کوچکی را تولید می کند که پایدار به دما و pH قلیایی است و در شرایط استخراج نفت نیز پایدار است و به واسطه خواص ضد میکروبی زیاد آن، می توان از این شبه باکتریوسین به عنوان بیوسید علیه باکتری های احیا کننده سولفات در صنایع پتروشیمی برای کنترل مشکلات ناشی از باکتری های احیا کننده سولفات استفاده کرد. از این سویه یا شبه باکتریوسین آن میتوان برای تمیز کردن لوله و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و در نهایت کاهش خوردگی لوله های انتقال نفت استفاده نیز استفاده نمود.

[۱] Cereicidin

فصل سوم

مواد و روش ها

مواد و روش ها

۳-۱- مواد و تجهیزات مورد نیاز

باکتری مورد نیاز: *Vibrio harveyi* IS01 PTCC 1755

- محیط های کشت:

محیط کشت Tryptic Soy Agar (Merck, Germany)

محیط کشت Tryptice Soy Broth (Merck, Germany)

محیط کشت تیوسولفات – سیترات – نمک صفراوی – ساکارز آگار (TCBS) (Merck, Germany)

محیط کشت Muller Hinton Agar (Merck, Germany)

و محیط کشت های افتراقی

- مواد شیمیایی ساخت شرکت Merck:

گلیسرول، پودر Skim milk ، کیت رنگ آمیزی گرم، کلرید سدیم [۱] ، سولفات آمونیوم ، استاندارد مک فارلند، سدیم هیدروکساید[۲]، اسید کلریدریک، سولفات مس[۳]، سدیم پتاسیم تارتارات[۴]، سدیم کربنات[۵]، معرف فولین[۶] ، آلبومین سرم گاوی[۷]،دی پتاسیم هیدروژن فسفات[۸]، سدیم دی هیدروژن فسفات[۹].

---

[۱] NaCl

[۲] NaOH

[۳] $CuSO_4 . 5H_2O$

[۴] Na_2 Tartrate. $2H_2O$

[۵] Na_2CO_3

[۶] Folin- ciocalteaa

[۷] Bovin Serum Albumin fraction v

[۸] Di Potassium hydrogen phosphate

[۹] Sodium dihydrogen phosphate

- تجهیزات:

انکوباتور یخچال دار (JSBI-250C, JSR Inc., Korea)، انکوباتور شیکردار(JSSI-200CL JSR Inc., Korea)، سانتریفیوژ (3-16PK, Sigma Inc., Germany)، دستگاه مولتی پارامتر پرتابل (HACH Cat No.58258-00 مدل HQ 40d)، اسپکتروفوتومتر (UV-Vis Spectrophotometer 6800 Jenway Inc., England)، اسپکتروفوتومتر HATCH مدل DR 4000، کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکپی جرمی ساخت کارخانه Varian(مدل GC 3800، MS 2000)، کولیس دیجیتال (Guanglu, China)، دستگاه picodrop، بن ماری، اتوکلاو، فور، میکروسکوپ نوری، هیتینگ بلاک، ترمال سایکلر، تانک الکتروفورز، هیتر، ترازو، هود لامینار، چراغ گاز آزمایشگاه، سمپلر، فریزر ۷۰- و ۲۰- درجه، یخچال آزمایشگاهی، فریزدرایر، گراب، تور سالیک،شوری سنج (رفراکتومتر)، هواده، یخدان

- سایر لوازم شیشه ای و مصرف شدنی :

کیسه دیالیز با مشخصات: Sigma Co., Cat. D6191, flat width (25mm), Cut off: 12000 Da ، گیره کیسه دیالیز، دیسک های آنتی بیوتیک ساخت شرکت پاتن طب، لوله فالکن، کرایوتیوب، جعبه مخصوص کرایوتیوب، لوله آزمایش، ظروف شیشه ای درب دار قابل اتوکلاو، ظروف پلاستیکی استریل، ارلن ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ سی سی، پی پت مدرج ،پلیت پلاستیکی استریل، هاون چینی، میله شیشه ای ال شکل، قیچی، اسکالپل، پنس، ست تشریح، جا لوله ای، مگنت، آب مقطر، آب دیونیزه، سنگ هوا، فیلتر میلی پور (Millipore, MS®PES syringe filter, USA)، میکروتیوب، سوآپ

- آزمایشات مولکولی

کیت استخراج DNA ژنومیک باکتریایی گرم مثبت (IBRC)

کیت استخراج DNA از روی ژل آگارز (IBRC)

کیت خالص سازی محصول PCR (IBRC)

کیت استخراج DNA پلاسمیدی (IBRC)

Eubacterial universal primers (Sigma):

forward primer: 5′- TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC – 3′

reverse primer: 5′- AGGAGGTGATCCAACCGCA – 3′

، وکتور کلونینگ pGEM (Promega)، محلول کلرید کلسیم ۱۰۰mM، باکتری *E.coli* DH5α، محیط کشت Luria Bertani (LB)، پودر آمپی سیلین، پودر X-Gal و پودرIPTG ، آنزیم های برشی، محلول های لازم جهت انجام الکتروفورز ژل آگارز

۳-۲- نمونه گیری

- جامعه آماری:

جامعه آماری این طرح استخرهای پرورش میگو بودند.

- زیر جمعیت ها:

میگو (روده و هپاتوپانکراس)، آب استخر، آب کانال ورودی، آب کانال خروجی، رسوبات بستر استخر، کانال ورودی وکانال خروجی زیر جمعیت های جامعه آماری بودند.

- واحدهای نمونه گیری:

نمونه های برداشته شده از هریک از زیر جمعیت ها، واحدهای نمونه گیری نامیده می شوند.

- حجم نمونه گیری:

برای مقایسه فراوانی باکتری ها در طی دوره پرورش در هر بار نمونه گیری از هر سایت ۱۰ قطعه میگوی سالم و برای بررسی هر یک از نمونه های آب و رسوب طبق استاندارد ۴۲۰۸، سه تکرار از هر نمونه تهیه شد.

- روش نمونه گیری:

برای نمونه گیری از زیر جمعیت ها، از دو روش نمونه گیری سیستماتیک و نمونه گیری تصادفی ساده استفاده شد.

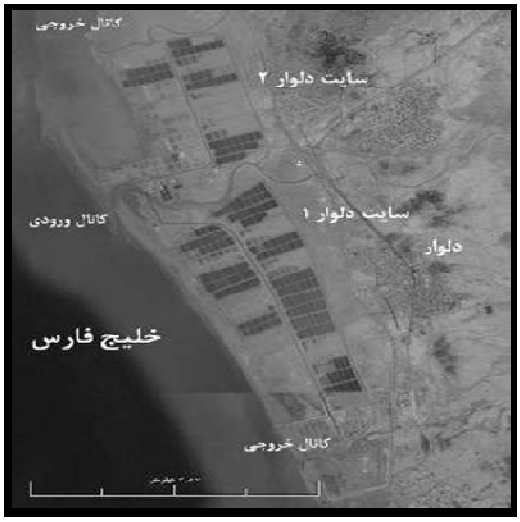
- منطقه مطالعاتی:

این بررسی طی دوره پرورش سال ۱۳۸۹، در سه منطقه حله، دلوار و مند انجام گردید.

مجتمع پرورشی حله در۱۰۵ کیلومتری شمال- شمال غرب شهرستان بوشهر واقع شده مساحت کل آن۱۱۰۰هکتار و سطح زیر کشت آن در سال ۸۹ حدود ۱۴۷/۷ هکتار بوده است (تصویر ۰-۱).

تصویر ۰-۱- نقشه هوایی سایت پرورش میگوی منطقه حله- استان بوشهر

مجتمع دلوار در ۲۵ کیلومتری جنوب شرق شهرستان بوشهر واقع شده و مساحت آن ۶۰۰هکتار و سطح کل زیر کشت آن در سال ۸۹ حدود ۱۹۵/۶ هکتار بوده است (تصویر ۰-۲).



تصویر ۰-۲- نقشه هوایی سایت پرورش میگوی منطقه دلوار- استان بوشهر

منطقه مند نیز دارای مساحت تقریبی ۹۰۰ هکتار و سطح زیر کشت آن در سال ۱۳۸۹، ۱۰۳/۶۵هکتار بوده است (تصویر ۰-۳).

تصویر ۰-۳- نقشه هوایی سایت پرورش میگوی منطقه مند- استان بوشهر

در این پژوهش از خرداد ماه لغایت مهرماه ۱۳۸۹ به صورت ماهانه از سه سایت اصلی پرورش میگو استان بوشهر در مجموع ۱۵۰ قطعه میگوی پرورشی لیتوپنئوس وانامی، ۱۳۵ نمونه آب و ۱۳۵ نمونه رسوب از استخر، کانال ورودی و کانال خروجی نمونه برداری شد و از نظر فراوانی و گوناگونی باکتریایی و همچنین خواص آنتی باکتریال مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۰-۱- تعداد نمونه های روده و هپاتوپانکراس میگو بررسی شده به تفکیک مکان نمونه برداری

مکان نمونه برداری	تعداد میگو (قطعه)	روده	هپاتوپانکراس	تعداد کل (قطعه)
حله	۵۰	۵۰	۵۰	۱۰۰
مند	۵۰	۵۰	۵۰	۱۰۰
دلوار	۵۰	۵۰	۵۰	۱۰۰
جمع کل	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۳۰۰

جدول ۰-۲- تعداد نمونه های آب و رسوب بررسی شده به تفکیک مکان نمونه برداری

مکان نمونه برداری	آب	رسوب
حله	۴۵	۴۵
مند	۴۵	۴۵
دلوار	۴۵	۴۵
جمع کل	۱۳۵	۱۳۵

۳-۳- نحوه نمونه برداری و انتقال نمونه ها

در هر نمونه برداری تعداد ۱۰ قطعه میگوی سالم توسط تور سالیک جمع آوری و به صورت زنده در تانک و توسط پمپ هواده به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه برداری از آب مطابق استاندارد ۴۲۰۸ انجام شد (۳) و پس از ثبت مشخصات و برچسب گذاری، نمونه ها در ظروف درب پیچ دار استریل در یخدان و دور از نور خورشید به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده میگوی کشور انتقال داده شد.

نمونه برداری از رسوب نیز در مواقع لزوم توسط گراب انجام شده و نمونه ها به ظروف استریل انتقال و پس از ثبت مشخصات نمونه ها و برچسب گذاری، در یخدان و دور از نور خورشید به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده میگوی کشور انتقال داده شد.

۳-۴- اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورش میگو

در هر بار نمونه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای محل پرورش میگوها شامل: دما، pH، شوری، اکسیژن محلول و هدایت الکتریکی توسط دستگاه مولتی پارامتر پرتابل (HACH مدل HQ 40d) اندازه گیری و ثبت گردید (تصویر ۰-۴).

تصویر ۰-۴- اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورش میگو

۳-۵- بیومتری میگوها

عملیات زیست سنجی میگو ها با تعیین میزان وزن و اندازه میگوهای جمع آوری شده در هر بار نمونه برداری انجام شد. همچنین بخشی از هپاتوپانکراس، عضله و روده میگو ها در محلول دیویدسون فیکس و پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، توسط میکروسکوپ نوری از نظر وضعیت سلامت میگو مورد بررسی قرار می گرفتند

۳-۶- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری

- کشت از روده و هپاتوپانکراس میگو، آب و رسوب
- آماده سازی نمونه :

پیش از آزمون، سطح بدن میگو را توسط الکل ۷۰ درصد استریل و با آب دریای استریل شستشو داده شد سپس توسط اسکالپل و قیچی استریل باله ی دمی وسر میگو را جدا کرده و توسط قاشقک الواتور استریل هپاتوپانکراس به دقت برداشته و به پلیت استریلی انتقال داده شد، روده ی میگو نیز به آرامی جداسازی و همراه با محتویاتش در پلیت استریلی قرار داده شد (Lightner, 1993) (تصویر ۰-۵).

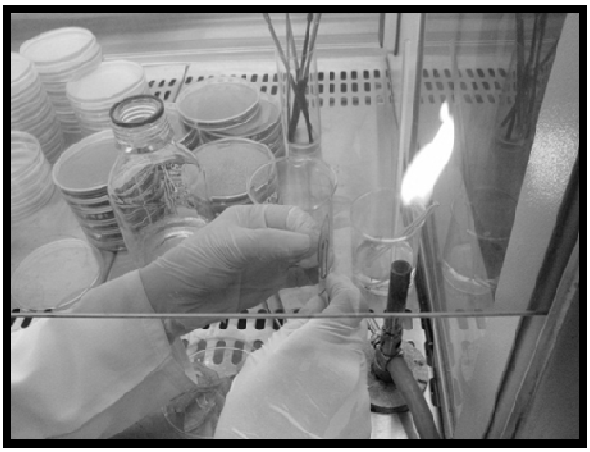
تهیه رقت از نمونه:

۱ گرم از هر نمونه را در شرایط آسپتیک و در کنار شعله برداشته و توزین کرده و از نمونه های حاصل رقت های سریع از 10^{-1} تا 10^{-6} در محلول نمکی ۲/۵ درصد استریل یا آب دریای استریل تهیه شد.

مراحل انجام کار :

از رقت های تهیه شده، ۰/۱ میلی لیتر از آزمونه را با رعایت شرایط استریل روی پلیت حاوی محیط کشت Tryptic Soy Agar تهیه شده با آب دریا (TSA نمکی) ریخته و روی سطح محیط پخش گردید. پس از جذب نمونه تلقیحی پلیت ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و تعداد کلنی ها در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش وثبت گردید. نتایج محاسبه شده تا دو رقم معنی دار گرد شدند و به صورت تعداد N باکتری درهرگرم فرآورده یا N باکتری درهرگرم رسوب یا میلی لیتر آب گزارش گردیدند (Buller, 2004) (تصویر ۰-۶).

برای هر رقت حداقل دو پلیت در نظر گرفته شد.



تصویر ۰-۵- آماده سازی و کشت میگوها

شمارش کلی باکتری های خانواده ویبریوناسه (*Vibrionaceae*)

شمارش کلی باکتری های خانواده ویبریوناسه در دستگاه گوارش میگوها و آب و رسوب استخرهای پرورش میگو مطابق با روش شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری انجام شد ولی از محیط کشت تیوسولفات – سیترات – نمک صفراوی – ساکارز آگار (TCBS) استفاده گردید (Buller, 2004).

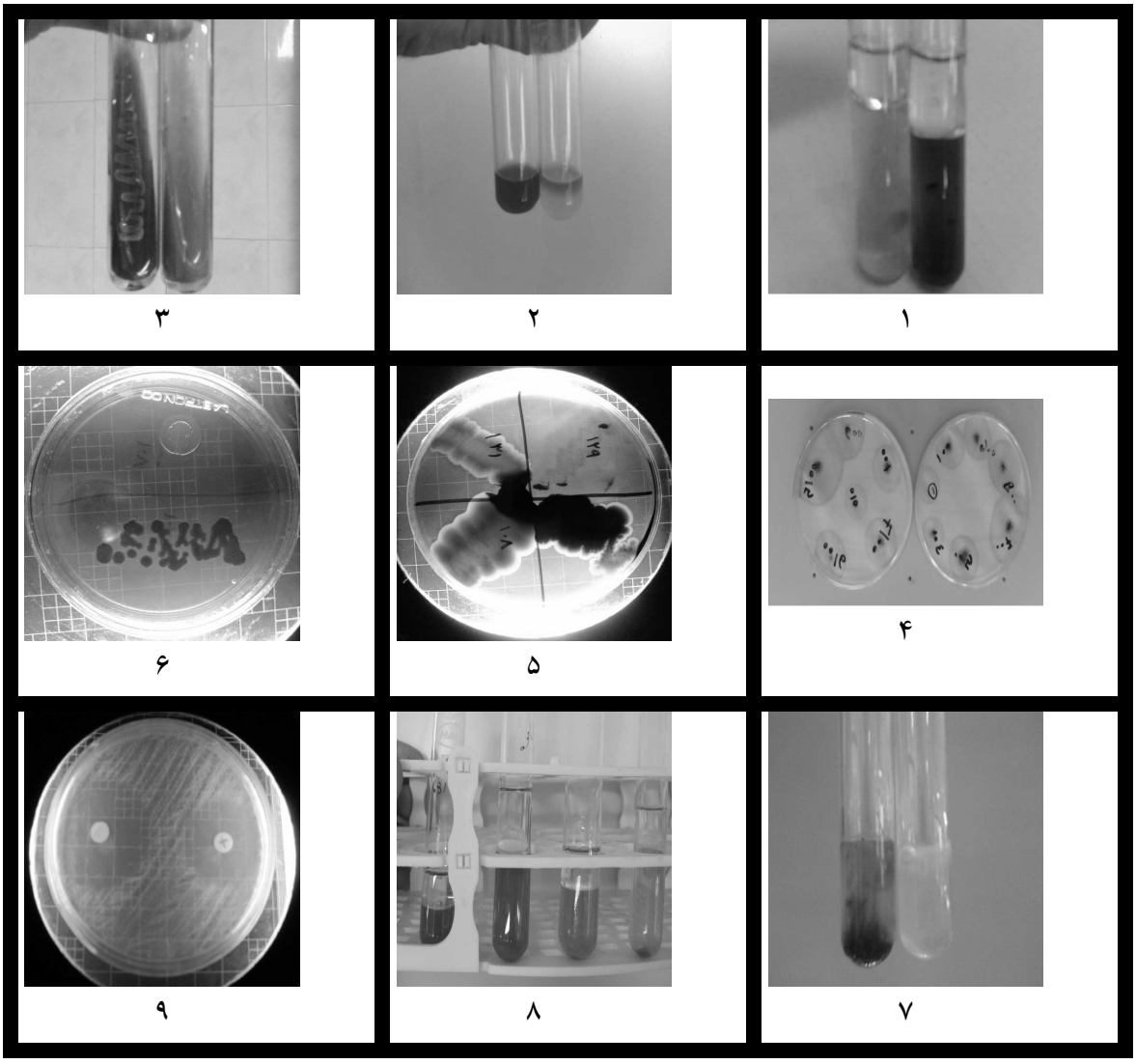
تصویر ۰-۶- شمارش کلونی های باکتریایی

۳-۷- خالص سازی و نگهداری سویه های باکتری ها

در هر بار نمونه برداری و کشت نمونه ها، از کلنی هایی که از نظر تعداد غالب بودند برداشت کرده و توسط کشت خطی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار خالص سازی آن ها انجام می شد (Aditya Kesarcodi-Watson, et al., 2009)، پس از حصول اطمینان از خالص بودن ایزوله ها به منظور نگهداری باکتری ها از شیر بدون چربی ۱۵ درصد و گلیسرول (۲۰٪-۱۰٪) استفاده شد و کرایوتیوب های حاوی سوسپانسیون باکتریایی در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد قرارداده شد (Day & Stacey, 2007). قبل از شروع آزمایشات از نمونه های فریز شده ابتدا در محیط کشت TSB و سپس TSA نمکی کشت داده می شد و پس از حصول اطمینان از خلوص کلونی ها سایر مراحل آزمایش بر روی آن ها انجام شد.

۳-۸- شناسایی اولیه سویه های باکتریایی در حد جنس

در این مرحله به منظور شناسایی اولیه باکتری های جداسازی شده از آزمایشات روتین تشخیص افتراقی باکتری ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی استفاده شد این تست ها عبارتند از: رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، کاتالاز، تجزیه قندها، آرژنین دهیدرولاز، حرکت، سیتراتاز، رشد در غلظت های مختلف نمک، رشد در مک کانکی آگار، رشد در محیط OF، حساسیت به دیسک O/129 و غیره (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006) (تصویر ۰-۷).



تصویر ۰-۷- تست های افتراقی مورد استفاده برای شناسایی اولیه : ۱- تجزیه قندها ، ۲- **MRVP**،۳- سیمون سیتراتاز، ۴- کسیداز، ۵- رشد در محیط **TCBS**، ۶- رشد در محیط مک کانگی آگار، ۷- احیای نیترات، ۸- آزمون دکربوکسیلاز، ۹- حساسیت به **O/129**

آزمایشات برون تن (In vitro):

۳-۹- غربالگری اولیه

۳-۹-۱-جداسازی مواد ممانعت کننده رشد از باکتری ها

باکتری های جداسازی شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت تریپتیک سوی آگار نمکی کشت داده شدند سپس سوسپانسیونی معادل ۱ مک فارلند در آب دریای استریل از آن ها تهیه گردید و به میزان ۵ درصد به محیط Tryptic Soy Broth نمکی (TSB نمکی) تلقیح گردید و ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰rpm انکوبه شدند. پس از طی دوره انکوباسیون، لوله های حاوی باکتری و محیط کشت در دور ۹۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ ̊C سانتریفیوژ شدند و محلول رویی لوله ها جداسازی و به لوله های استریل انتقال داده شد و پس از اندازه گیری pH در صورت نیاز توسط سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال خنثی و در حدود pH ۷ تنظیم گردید و با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون استریل گردیدند (Jose Luis Balcazar, Rojas-Luna, & Cunningham, 2007). در نهایت عصاره ی کشت هر باکتری به دو قسمت تقسیم شده و در دمای ۴ و ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۳-۹-۲-بررسی اثر ضد میکروبی مواد ممانعت کننده رشد بر روی باکتری *Vibrio harveyi* به روش انتشار در آگار توسط چاهک (گوده)

در این روش به ۲۰ سی سی محیط کشت مولر هینتون آگار نمکی، ۱ درصد از کشت یک شبه باکتری *Vibrio harveyi*(باکتری اندیکاتور) با غلظت برابر ۰/۵ مک فارلند (OD=0.5 در ۶۰۰ نانومتر) تلقیح ودر پلیت پخش شد. پس از بستن آگار چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر در آن ایجاد گردید سپس چاهک ها با یک قطره از Soft Agar پوشانده شد و با ۴۰ میکرولیتر از عصاره کشت ۴۸ ساعته سویه های باکتریایی پر و به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا تمام مواد ضدمیکروبی درون آگار منتشر شوند و در نهایت پلیت ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت تا یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. از محیط کشت تریپتیک سوی براث با pH ۷ به عنوان کنترل در یکی از چاهک های هر پلیت استفاده شد. توانایی فعالیت ضدمیکروبی سویه های مورد بررسی بر اساس قطر هاله عدم رشد باکتری اندیکاتور (برحسب میلی متر) توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد(Hjelm et al., 2004 Parente, Brienza, Moles, & Ricciardi, 1995) .

کلیه آزمایشات بالا برای باکتری هایی که سبب ممانعت از رشد باکتری اندیکاتور شدند به منظور اطمینان از تکرارپذیری و امکان پذیری با سه بار تکرار انجام گردید.

۳-۱۰- غربالگری ثانویه

در این مرحله باکتری هایی که در مرحله اول هاله عدم رشد داشتند بر اساس اندازه هاله عدم رشد، پایداری هاله عدم رشد در برابر باکتری *V.harveyi* مورد بررسی قرار گرفتند و به منظور حصول اطمینان از نتایج باکتری های انتخابی نهایی مجدداً مورد آزمون های بالا قرار گرفتند (Fjellheim, Klinkenberg, Skjermo, Aasen, & Vadstein, 2010).

۳-۱۱- شناسایی مولکولی باکتری های انتخابی

- استخراج DNA ی ژنومی:

با توجه به اینکه شناسایی باکتری های جداسازی شده در حد جنس صورت گرفته بود به منظور استخراج DNA ی ژنومیک از کیت مخصوص باکتری گرم مثبت مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران(IBRC) استفاده شد. با استفاده از این کیت ابتدا دیواره باکتری و غشای سلولی با استفاده از محلول های لیز کننده تجزیه شدند و سپس با فراهم کردن شرایط مناسب محیط، DNA به ستون سیلیکا چسبیده وطی دو مرحله شستشوی ستون با استفاده از بافرهای شستشو تمام ناخالصی ها از DNA و ستون شسته شده و در نهایت با استفاده از محلول بافر نمکی ملایم، DNA از روی ستون جداشده و درون بافر نمکی حل شد و با یک سانتریفیوژ کوتاه DNA بسیار خالص با مقدار مطلوب به دست آمد. در این روش برخلاف روش های سنتی و معمول از مواد سمی مانند فنل و کلروفرم استفاده نمی شود.

مراحل انجام کار برای هر باکتری به شرح ذیل می باشد:

کشت باکتری های انتخابی در محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی تا زمانی که $OD_{A600}=0.5$ شد.

انتقال ۱ml از محیط کشت مایع حاوی باکتری به میکروتیوب ۲ml استریل، سانتریفیوژ با دور g × ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دور ریختن سوپرناتنت۲۰ mg/ml از پودر لیزوزیم را داخل بافر GPE حل نموده سپس ۱۸۰µl از بافر GPE را روی رسوب باکتری ریخته و آن را ورتکس کرده تا رسوب باکتری به صورت سوسپانسیون درآید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ ̊C قرار داده شد.

µl ۲۰۰ از بافر GPL و µl۲۵از محلول ۲۰mg/ml پروتئیناز K را روی رسوب باکتری ریخته و بلافاصله به ورتکس به خوبی مخلوط کردیم. سپس میکروتیوب را به مدت ۱۵ دقیقه داخل بن ماری ۵۶ C̊ قرار داده شد.µ l ۲۰۰ اتانول خالص را به محلول فوق افزوده و به مدت ۵-۶ ثانیه ورتکس انجام شد تا محلول کاملاً همگن و شفافی حاصل شد.

تمام محلول را داخل میکروتیوب حاوی ستون سلیکاژل ریخته و به مدت ۱ دقیقه در دورg × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد سپس محلول داخل تیوب (عبور کرده از فیلتر) را دور ریخته و ستون مجدداً داخل میکروتیوب قرار داده شد.

µl ۷۰۰ از بافر GPW1 داخل ستون ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه در دور g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد سپس محلول داخل تیوب را دور ریخته و ستون مجدداً داخل میکروتیوب قرار داده شد.

µl ۷۰۰ از بافر GPW2 را داخل ستون ریخته و به مدت ۳ دقیقه در g × ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ و عملیات مرحله قبل تکرار شد.

ستون را بدون محلول به مدت ۱ دقیقه در g × ۱۶۰۰۰سانتریفیوژ کرده تا بافر به طور کامل از ستون حذف شد سپس ستون را از میکروتیوب خارج کرده و میکروتیوب دور انداخته شد.

ستون را داخل یک میکروتیوب ۱/۵ml استریل قرار داده و µl ۵۰ از محلول elusion buffer را که قبلاً تا دمایC̊ ۷۰-۶۰گرم شده است را روی ستون ریخته تا DNA ی روی ستون حل شود سپس ستون را به مدت ۱ دقیقه در g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ نموده (۲ بار)

ستون را دور ریخته و محلول باقی مانده در یخچال و یا برای نگهداری طولانی مدت در فریزرC̊ ۲۰- قرار داده شد.

- بررسی کمی و کیفی **DNA** ژنومی استخراج شده:

به دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز واسپکتروفتومتری انجام شد:

- الکتروفورز

محلول های لازم جهت انجام الکتروفورز ژل آگارز:

الف) محلول **TAE 50X**

Tris - base	۲۴۳ g/L
EDTA	۵۰mM(pH=8)
Glacial acetic acid	%V/V ۵/۷۱

ب) محلول **TAE 1X**

TAE 50X	۱ml
آب دیونیزه	۴۹ml

ج) محلول رنگ آمیزی

اتیدیوم برماید	۱۰ mg/ml

روش تهیه ژل آگارز و الکتروفورز **(Gel Casting Electrophoresis)**

بافر X50 TAE را طبق فرمول تهیه و برای تهیه بافر TAE 1X، به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق گردید.

۱ گرم آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر TAE IX حل کرده وآن را حرارت داده تا خوب بجوشد، سپس داخل قالب ژل که شانه ای با دندانه مناسب روی آن قرار دارد ریخته شد.

بعد از بسته شدن ژل آن را ازقالب ژل خارج کرده و داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد. سپس بافر تانک را روی آن ریخته بطوری که کاملاً روی ژل را بپوشاند و شانه از ژل بیرون کشیده شد.

نمونه های DNA به نسبت ۵µl به µl ۱با بافر بارگذاری ۶x مخلوط و در چاهک هـای ژل ریختـه شـد. از هر یک غلظت های تهیه شده مارکروزنی لامبدا µl ۱ در چاهک ریخته شد.

نکته: بافر بار گذاری حاوی ۵۰ درصد ماده سنگین کننـده ماننـد گلیسـرین یـا سـاکارز اسـت کـه باعـث می شود نمونه به خوبی داخل چاهک قرار گیرد و همچنین حاوی ۲٪ از یک رنگ نشانه مانند برومونفل بلو یـا زایلن سیانول می باشد.

ولتاژ دستگاه را در حدود ۱۰۰-۸۵ ولت تنظیم و سپس تانک الکتروفـورز را بـه منبـع تغذیـه وصـل شـد. DNA دارای شارژ منفی است و برای الکتروفورز شدن باید نمونه به طرف قطب منفی باشد تا هنگام الکتروفـورز به سمت قطب مثبت حرکت کند.

وقتی رنگ نشانه سه چهارم طـول ژل را طـی کـرد، ژل را از تانـک خـارج کـرده و در محلـول اتیـدیوم بروماید با غلظت mg/ml ۵٪ قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه ژل را از محلول رنگ خارج کـرده و بـا آب شستشو داده شد.

ژل را در دستگاه ژل داک قرار داده و مشاهده محصول PCR به صورت نوار زیر نور UV انجام شد.

- اسپکتروفتومتری

دستگاه picodrop را روشن کرده و۳µl از بافر حلال DNA را به عنوان Blank درون دستگاه قرار داده شد.

۳µl از محلـول DNA اسـتخراج شـده را درون دسـتگاه قـرار داده و میـزان جـذب نـوری آن را در طـول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰نانومتر، نسبت این دو و نیز غلظت DNA را قرائت و یادداشت نموده و غلظت نهـایی DNA استخراج شده محاسبه گردید.

- **PCR** ژن **16S rDNA** باکتریایی

- روش انجام **PCR**

محلول واکنش را طبق جدول ۰-۳ آماده کرده و یک تیوب استریل PCR روی یخ قرار داده شد. تمام مواد به استثناء DNA الگو بطور مختصر قبل از مخلوط کردن ورتکس ملایم شد. ویال های واکنش را از روی یخ برداشته و چند ثانیه سانتریفوژ نموده و درون دستگاه گذاشته شد تا مراحل (جدول ۰-۴) انجام شود.

جدول ۰-۳- اجزای محلول واکنش **PCR**

نام ترکیب	مقدار
10X Taq Buffer	5.0µl
dNTP Mix,2mM each	1.0µl
Forward Primer	0.5µl
Reverse Primer	0.5µl
25Mm $MgCl_2$	1.5µl
Template DNA	50-100ng
Taq DAN Polymerase	0.5µl
Water, nuclease-free	up to 50µl
Total Volume	50µl

جدول ۰-۴- برنامه دستگاه ترمال سایکلر

مرحله	زمان	دما(°C)	تعداد سیکل ها
واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۴	۱
واسرشت سازی	۱ دقیقه	۹۴	۳۶
اتصال	۴۰ ثانیه	۶۲	
تکثیر	۸۰ ثانیه	۷۲	
تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲	۱

الکتروفورز محصول **PCR**:

الکتروفورز **PCR**

مشاهده محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز ورنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و یا نیترات نقره امکان پذیر خواهد بود.

پروتکل انجام الکتروفورز

باتوجه به طول توالی تکثیر شده، استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مناسب می باشد و مراحل انجام الکتروفورز محصول PCR مطابق پروتکل الکتروفورزDNA استخراج شده انجام گردید.

- استخراج محصول **PCR** از ژل آگارز :

برای این منظور از کیت استخراج از ژل آگارز استفاده شد.

با استفاده از یک تیغ جراحی تمیز باند DNA مورد نظر را زیر نور UV و با استفاده از صفحه محافظ UV از روی ژل بریده و برای به حداقل رساندن وزن ژل قسمت های اضافی آگارز حذف گردید.

قطعه بریده شده ژل را درون یک میکروتیوبml ۱/۵ قرار داده وبا محاسبه تفاضل وزن تیوب خالی و تیوب حاوی باند بریده شده وزن قطعه محاسبه گردید.

۳ برابر وزن قطعه بریده شده به آن بافر GPL اضافه گردید.

تیوب در دمای C° ۵۶ به مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری و هر ۳-۲ دقیقه ورتکس گردید.

هم وزن ژل بریده شده به محلول ایزوپروپانول افزوده شد.

ستون سیلکیا درون میکروتیوب ml۲ موجود در کیت قرار داده شد.

سپس تمام محلول را داخل ستون ریخته و ۱ دقیقه در g × ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ کرده ومحلول داخل تیوب را دور ریخته وستون مجدداً درون تیوب قرار داده شد.

۷۰۰ µl از بافر GPW را درون ستون ریخته و ۱ دقیقه در ۱۱۰۰۰×g سانتریفوژ نموده و محلول داخل تیوب را دور ریخته وستون مجدداً درون تیوب قرار داده شد.

ستون خالی را ۱ دقیقه در ۱۱۰۰۰ × g سانتریفوژ نموده ومحلول داخل تیوب و تیوبدور انداخته شد.

ستون درون یک تیوب ۱/۵ml استریل قرار داده شد و ۵۰µl بافر EB را روی ستون ریخته و پس از ۲-۱ دقیقه (DNA فرصت حل شدن در بافررا داشته باشد)، ستون ۱ دقیقه در ۱۱۰۰۰ × g سانتریفوژ گردید.

DNA استخراج شده را برای مراحل بعدی آزمایش درون یخچال یا فریزر ۲۰ °C- قرارداده شد.

کمیت سنجی محصول **PCR** استخراج شده از ژل

با استفاده از دستگاه پیکودراپ کمیت و کیفیت DNA محاسبه و یادداشت گردید.

- الحاق

ژن 16S rDNA ی تکثیر شده باکتری های منتخب در وکتور کلونینگ pGEM (Promega) الحاق شده و ترانسفورماسیون و غربال باکتری های نو ترکیب و به دنبال آن کشت باکتری و استخراج پلاسمید های نوترکیب برا ساس پروتکل های ارائه شده انجام گردید. با استفاده از پروتکل کیت همسانه سازیpGEM و مقادیر محاسبه شده DNA الگو، واکنش الحاق به سهولت انجام می پذیرد.

محلول واکنش طبق جدول ۰-۵ آماده گردید:

جدول ۰-۵- اجزای محلول واکنش الحاق

نام ترکیب	مقدار
Vector pTZ57R/T (0.55nano gram/µl)	1µl
5X Ligaltion Buffer	2µl
PCR product (0.52pmol ends)	variable
T4 DNA Ligase	1µl
Water ,nuclease free	Up to 30µl
Total volume	10µl

به منظور محاسبه دقیق ودستیابی به مقدار مطلوب ۰/۵۲ pmol از انتهای آزاد دو رشته محصول PCR از رابطه زیر استفاده گردید:

$$\text{pmol ends}(0.52)=2 \times 10^{6} \times \mu g \text{ of ds DNA} / N(bp) \times 660$$

N: تعداد نوکلئوتیدهای قطعه سنتز شده

بعد از تهیه محلول الحاق، بطور مختصر ورتکس وحدود ۵-۳ ثانیه سانتریفوژ گردید.

محلول واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای $22^{\circ}C$ انکوبه گردید. برای دستیابی به بهترین نتیجه محلول واکنش به مدت یک شب در دمای $4^{\circ}C$ انکوبه شد.

۲/۵ µl از محلول واکنش برای ترانسفورماسیون استفاده شد.

- تهیه سلولهای مستعد:

آماده سازی سلول های باکتری میزبان برای جذب مولکول DNA نوترکیب خارجی با تیمار باکتری ها در محلول کلرید کلسیم طبق روش ذیل انجام گرفت.

برای تهیه سلول های مستعد از محلول کلرید کلسیم ۱۰۰mM استریل استفاده گردید و همچنین به منظور نگهداری سلول های مستعد از محلول کلرید کلسیم ۱۰۰mM (٪۸۰) به همراه گلیسرول (٪۲۰) استریل استفاده شد.

محیط کشت باکتری ***E.coli* DH5α**

برای کشت باکتری *E.coli* از محیط کشت Luria Bertani (LB) استفاده شد. مواد لازم برای تهیه این محیط و نیز نحوه آماده سازی آن به شرح زیر است:

Luria Bertani medium (pH= 7)	
Bacto-Typtone	10.0g/L
Bacto- Yeast extract	5.0g/ L
NaCl	10.0g/ L

به منظورتهیه محیط جامد ۱۵ g/ L پودر آگار به مواد فوق افزوده می شود. قبل از افزودن آگار pH را تنظیم نموده و محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $121^{\circ}C$ اتو کلاو گردید.

پروتکل تهیه سلول های مستعد:

به میزان ۱۰-۲۰ µl از استوک باکتری *E.coli* DH5α را در ۵ ml محیط کشت LB تلقیح کرده به مدت یک شب در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ °C و ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد.

سپس حدود ۲/۵ ml از کشت شبانه را در داخل ۵۰ ml محیط کشت مایع استریل LB تلقیح نموده و در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ °C و دور ۲۰۰ rpm به مدت ۳-۲ ساعت گرماگذاری گردید، تا زمانی که OD آن در ۶۰۰ نانومتر معادل ۰/۶ شد.

در مرحله ی بعد محتویات ارلن را به طور مساوی در فالکن استریل تقسیم کرده وفالکن های حاوی باکتری کشت شده را در دمای ۴°C و ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید.

سپس سوپرناتنت را دور ریخته و رسوب حاصل را در ۲۵ml ازمحلول ($CaCl_2$(100mM) سرد به آرامی حل کرده و به مدت ۴۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

در مرحله بعد فالکن ها را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتنت حاصل دور ریخته شد.

رسوب حاصل را در ۴ml از محلول نگهداری سلول های مستعد (گلیسرین ٪۲۰ + ($CaCl_2$(100mM)) ٪۸۰) سرد حل نموده و سوسپانسیون حاصل را درون میکروتیوب های ۱/۵ ml استریل سرد (هر تیوب ۲۰۰ µl) ریخته و در فریزر ۷۰- °C قرار داده شد.

تهیه محیط کشت انتخابی برای غربالگری:

محیط کشت غربال کلنی سفید/ آبی ترکیبی از محیط LB آگار، آمپی سیلین، X-Gal و IPTG است که برای جدا سازی باکتری های تراریخت نوترکیب استفاده می شود. محیط کشت باکتری ترا ریخت نیز ترکیبی از محیط LB مایع و آمپی سیلین است.

پروتکل تهیه محیط انتخابی:

آماده سازی محلول ها:

محلول آمپی سیلین mg/ml ۱۰۰: ۱۰۰میلی گرم از پودر آمپی سیلین را وزن کرده و درون تیوپ استریل ۱/۵ml ریخته و در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل و توسط ورتکس حل گردید، محلول تا زمان استفاده در یخچال قرار داده شد.

محلولIPTG با غلظت M ۰/۱ : mg ۲۳/۸۳ از پودر IPTG را در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نموده و محلول در یخچال قرارداده شد.

محلول X-GaL : mg ۲۰ از پودر X-Gal را در ۱ میلی لیتر حلال دی متیل سولفاکساید حل نموده و محلول را در مکانی دور از نور و در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- نگهداری گردید.

روش تهیه محیط کشت:

محیط کشت LB براث و آگار راتهیه و پس از اتوکلاو، هنگامی که دمای محیط کشت به $^{\circ}C$ ۵۰ رسید به میزان µl/ml ۱ محلول آمپی سیلین به غلظت mg/ml ۱۰۰ به آن اضافه گردید و خوب مخلوط شد.

سپس محیط کشت LB آگار در پلیتهای استریل در تحت شرایط استریل توزیع گردید.

µl ۱۰۰ محلول IPTG را روی هر پلیت حاوی محیط کشت های جامد ریخته و با استفاده از با میله ی L شکل استریل به خوبی پخش گردیدتا کاملاً جذب محیط شد.

سپس µl۴۰ از محلول X-GaL را روی پلیت ریخته به خوبی پخش گردید تا کاملاً جذب محیط شد. X-GaL در مقابل نور تجزیه می شود بنابراین پلیت ها را دور از نور و در دمای یخچال قرار داده شدند.

- ترانسفورماسیون:

انتقال DNA نوترکیب به درون سلولهای مستعد از طریق شوک حرارتی صورت گرفت.

پروتکل انجام ترانسفورماسیون:

ویال حاوی سلول های مستعد *E.coli* DH5α آماده شده از قبل را از فریزر $^{\circ}C$ ۷۰- خارج کرده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرارداده شد تا کاملاً ذوب شود.

سپس ۵µl از مخلوط واکنش الحاق را به سلول های مستعد ذوب شده افزوده و به آرامی مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد در طول این مدت بن ماری را روشن و روی $^{\circ}C$ ۴۲ تنظیم گردید.

پس از ۳۰ دقیقه تیوب ها را از یخ خارج کرده و بلافاصله درون بن ماری $^{\circ}C$ ۴۲ به مدت ۱۲۰ ثانیه قرار داده شد.

سپس تیوب ها را برداشته و به مدت ۲ دقیقه روی یخ گذاشته شد.

مقدار ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت مایع LB را به محتویات ویال اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ با دور rpm ۲۰۰ گرماگذاری گردید.

محتویات ویال را روی پلیت حاوی محیط کشت انتخابی ریخته و با میله ی L شکل استریل به خوبی پخش گردید.

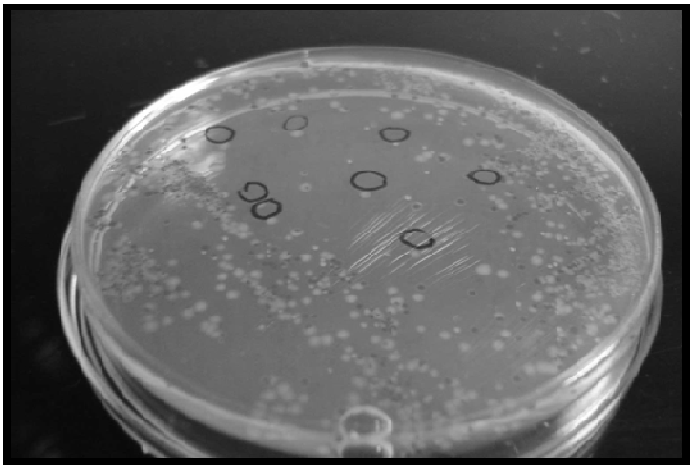
پلیت ها در دمای $37^{\circ}C$ به مدت یک شب گرماگذاری شدند.

دور پلیت باکتری را با پارافیلم پوشانده و تا انجام مرحله بعد دریخچال نگهداری شد.

- غربال و کشت باکتری های نوترکیب:

بعد از گذشت ۱۶-۱۲ ساعت و ظهور کلونی در پلیت کشت شده، سه نوع کلونی متفاوت به رنگ های سفید، آبی و آبی کمرنگ مشاهده می شود کلونی سفید کلونی های تراریخت با وکتور نوترکیب هستند و در بعضی موارد ممکن است به دلیل کوچک بودن DNA خارجی ویا عدم دگرگونی درساختار قرائت ژن lacŹ، آنزیم نیمه فعالی تولید شده وکلونی هایی به صورت آبی کمرنگ ظاهر گردند.درصورت عدم وجود کلونی سفید میتوان از این نوع کلونی برای ردیابی وکتورهای نوترکیب استفاده نمود. در بیشتر موارد کلونی های کم رنگ در صورت چند ساعت نگهداری در یخچال رنگ اصلی خود را باز می یابند. در این مرحله چندکلونی

سفید انتخاب شده و در محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین کشت می شوند. ولی آمپی سیلین در محیط مانع آلودگی محیط کشت با باکتری های غیر تراریخت از محیط خارج می شود. کشت کلونی های نوترکیب باعث تولید تعداد بیشماری از باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب می شود و این لازمه استخراج پلاسمید و دست ورزی های دیگر بر روی پلاسمید نوترکیب است (تصویر ۰-۸).



تصویر ۰-۸- محیط کشت حاوی کلون های نوترکیب

پروتکل انتخاب کلونی نوترکیب وکشت آن:

محیط کشت LB براث حاوی آمپی سیلین را در شرایط کاملاً استریل به میزان ۳-۵ml داخل فالکن استریل ریخته و یک کلونی سفید را انتخاب نموده ودر آن کشت داده شد.

فالکن را به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷°C درون شیکر انکوباتور rpm ۲۰۰ گرماگذاری گردید.

- استخراج پلاسمید:

با کشت و تکثیر کلونی باکتری نوترکیب،تعداد زیادی سلول حاوی وکتور نوترکیب تولید می شودکه در داخل هر سلول نیز تعداد بی شماری از وکتور نو ترکیب وجود دارد، لذا با استخراج پلاسمید از این باکتری می توان به تعداد انبوهی از این مولکول نوترکیب پایدار دست پیدا کرد وهرگونه آنالیز مولکولی مورد نظر اعم از توالی یابی DNA کلون شده، هضم با آنزیم های برشی بررسی های ساختار ژنی وغیره را با استفاده از آن انجام داد.

پروتکل استخراج پلاسمید:

استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی مبتنی بر ستون سیلیکا (اسپین) و با استفاده از کیت " IBRC Plasmid DNA Extraction kit (Mini-Prep) Cat NO.: MBK0051" صورت گرفت.

۱/۵ml از محیط کشت مایع کلونی سفید کشت داده شده با OD_{A600}=0.5 را داخل یک میکروتیوب استریل ریخته و با دور ۱۲۰۰۰rpm، به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید سپس مایع رویی را دور ریخته و این مرحله باردیگر تکرار شد.

۲۵۰ µ از بافرPS رابه رسوب باکتری اضافه کرده و مقدار ۲/۵ µ1 از محلول (۱۰۰ mg/ml) RNase A به آن افزوده و به آرامی پیپت نموده تا رسوب کاملاً حل شد.

۲۵۰ µ1 از بافرPL را به محلول اضافه کرده و به آرامی با سرته کردن تیوب (۸-۶ بار) کاملاً مخلوط شد.

۳۵۰µ1 از بافر PN را به محلول اضافه نموده و به آرامی با سرو ته کردن تیوب (۸-۶ بار) کاملاً مخلوطشد. در این مرحله رسوب ابری شکل تشکیل می شود وتا تشکیل رسوب ابری شکل سرو ته کردن تیوب ها ادامه یافت.

تیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه با دورg × ۱۱۰۰۰ سانتریفوژشد. محلول رویی را جدا کرده درون ستون سیلیکا که درون تیوب ۲ml قرار دارد ریخته شد.

تیوب ها به مدت ۱ دقیقه با دور g × ۱۱۰۰۰سانتریفوژ شدند. مایع درون تیوب را دور ریخته و ستون مجدداً درون تیوب ۲ml قرار داده شد.

۷۵۰µ1 از بافر PW را درون ستون ریخته و تیوب به مدت ۱دقیقه با دورg × ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع درونتیوب را دور ریخته و ستون مجدداً درون تیوب ۲ml قرار داده شد.

۷۵۰µ1 از بافرPW2 را درون ستون ریخته و تیوب به مدت ۱ دقیقه با دورg × ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید سپس مایع درون تیوب را دور ریخته و ستون مجدداً درون تیوب ۲ml قرار داده شد.

سپس تیوب حاوی ستون خالی رابه مدت ۱ دقیقه با دور g × ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ نموده و تیوب ۲ml را دور انداخته و ستون درون تیوب ۱/۵ml قرار داده شد.۵۰µl از بافر EB به مرکز ستون ریخته شد و پس از ۱ دقیقه، با دورg × ۱۱۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد.

DNA پلاسمیدی استخراج شده تا زمان انجام مرحله بعد آزمایش در فریزر$^{\circ}$C ۲۰- نگهداری شد.

- هضم آنزیمی پلاسمید:

در این مرحله دو آنزیم برشی که جایگاه برشی آنها بر روی جایگاه کلونینگ وکتور pGEM و در دو سمت ژن کلون شده قرار دارد انتخاب می شود. هر واکنش آنزیمی نیازمند شرایط خاص برای حداکثر راندمان می باشد. یکی از مهمترین شرایط محیط واکنش که درمیان آنزیم های برشی بسیار متنوع است غلظت نمک (NaCl) می باشد بافر های آنزیمی به طور ویژه برای غلظت نمک برای فراهم کردن مناسب ترین غلظت نمک برای هر آنزیم فرموله شده اند. بنابراین بسیار مهم است برای هر آنزیم از بافر مخصوص آن استفاده شود. در صورت وجود بافر مشترک می توان از یک بافر با حداکثر راندمان برای هر دو آنزیم استفاده کرد.

پروتکل انجام واکنش هضم آنزیمی:

مخلوط واکنش طبق جدول ۰-۶ تهیه شد.

جدول ۰-۶- اجزای مخلوط واکنش هضم آنزیمی

نام ترکیب	مقدار
Plasmid	10µl
Buffer(R+)	1.0µl
Buffer(Y+/Tango)	1.0µl
Enzyme (Hind III)	0.5µl
Enzyme (Sac I)	0.5µl
Dionized water	up to 20µl

مخلوط واکنش را به آرامی مخلوط کرده و چند ثانیه سانتریفوژ شد

ویال در دمای$^{\circ}$C ۳۷ به مدت ۱۲- ۳ ساعت گرماگذاری گردید.

محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و رنگ آمیزی شد.

- توالی یابی:

تـوالی یـابی نمونـه هـا توسـط شـرکت "GATC-Biotech" و بوسـیله دسـتگاه "ABI 3730xl"و تکنولـوژی SANGER صورت گرفت و توسط نرم افزار BLAST مقایسه توالی های به دست آمده با توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) و ایزوتاکسون صورت گرفت (Chun, 2007).

۳-۱۲- تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های انتخابی

به منظور تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های منتخب نسبت بـه آنتـی بیوتیـک هـایی کـه باکتری های خانواده ویبریوناسه به آن حساسند و در پرورش میگو رایج هستند، از دیسـک هـای آنتـی بیوتیـک تتراسـایکلین (۳۰µg)، اکسـی تتراسـایکلین (۳۰ µg)، استرپتومایسـین (۱۰ µg)، تـری متوپریـوم سولفامتوکسازول(۲۳/۷۵µg- ۱/۲۵µg) و اریترومایسین (۱۵ µg) (ساخت شرکت پاتن طب) استفاده شـد(Adabi, Jabbari, & Lari, 2009). آنتی بیوگرام به روش توصیه شده CLSI که روش Kirby-Bauer می باشد بـر روی محـیط کشت مولرهینتون آگار انجام شد و سپس با استفاده از جدول میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک بـه صورت، حساس، نیمه حساس و مقاوم گـزارش گردیـد (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966; C.L.S.I., 2008, 2011).

۳-۱۳- تعیین سینتیک رشد، میزان زی توده و بهترین زمان تولید مواد ضدمیکروبی توسط باکتری های انتخابی

به منظور تعیین سینتیک رشد باکتری های انتخابی، ابتدا از آن ها به میزان یک لوپ در ارلن هـای حـاوی ۵۰ml محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی تلقیح و در انکوباتور شیکردار ۳۰ °C با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۸-۶ ساعت گرمخانه گذاری گردید. هنگامی که OD نمونه ها معادل با یک مک فارلند شد(OD_{A600}=0.2) به میـزان ۵درصد به ارلن های حاوی ۱۰۰ ml محیط کشت تریپتیک سوی بـراث نمکـی تلقـیح گردیدنـد و در انکوبـاتور شیکردار ۳۰ °C با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. به منظور تعیین سینتیک رشد باکتری ها در زمان هـای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴،۲۶، ۲۸، ۴۸ و ۵۰ از ارلن ها در شرایط آسپتیک برداشت شده و میزان جـذب نمونـه هـا در طـول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت و نمودار رشد باکتری ها رسم گردید. همچنین بـه منظـور تعیین زی توده باکتری ها در زمان های مذکور، میـزان ml ۱ از محـیط حـاوی بـاکتری هـای کشـت شـده را بـه میکروتیوب های استریل انتقال داده و به مدت ۱۲ دقیقه در rpm۹۵۰۰ و دمـای °C ۴ سـانتریفیوژ شـدند و پـس از

خارج کردن محلول رویی و خشک شدن رسوب حاصل، توزین رسوب ها انجام شد. به منظور تعیین زمانی که باکتری ها بیشترین میزان تولید مواد آنتی باکتریال را دارند از سوپرناتنت رویی حاصل از مرحله قبل به میکروتیوب های استریل دیگر انتقال داده و پس از اندازه گیری pH و در صورت نیاز تنظیم در حدود pH ۷، با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون استریل گردیدند. سپس اثر آنتی باکتریال محتویات هر یک از این میکروتیوب ها در زمان های برداشت، بر روی باکتری *V.harveyi* به روش انتشار در آگار توسط چاهک مطابق بند ۳-۹-۲- مورد بررسی قرار گرفت و بعد از ۴۸-۲۴ ساعت، قطر هاله های عدم رشد مربوط به هریک از میکروتیوب ها توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد. در کلیه آزمایشات انجام شده برای هر نمونه سه تکرار درنظر گرفته شد (V. N. Gordon, 2004).

۳-۱۴- اثر غلظت های مختلف شوری برتولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی

برای تهیه کشت استارتر، یک لوپ از باکتری های انتخابی در ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی تلقیح و در انکوباتور شیکردار $30^{\circ}C$ با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۸-۶ ساعت گرما گذاری گردیدند. هنگامی که OD نمونه ها معادل با یک مک فارلند شد($OD_{A600}=0.2$) به میزان ۵درصد به ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث با شوری های ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵ درصد تلقیح گردیدند (برای هر باکتری ۳ تکرار در نظر گرفته شد) سپس بر اساس نتایج حاصل از مرحله ی تعیین بهترین زمان تولید مواد ضدمیکروبی توسط باکتری های انتخابی، در بهترین زمان تعیین شده از ارلن های حاوی محیط کشت برداشت کرده و به میکروتیوب های استریل انتقال داده شد، سپس میکروتیوب ها به مدت ۱۲ دقیقه در ۹۵۰۰rpm و دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی به میکروتیوب های استریل دیگر انتقال داده شد،و پس از تنظیم pH در حدود ۷ و استریل کردن با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون،اثر آنتی باکتریال محتویات هر یک از این میکروتیوب ها بر روی باکتری *V.harveyi* به روش انتشار در آگار توسط چاهک (مطابق روش بند ۳-۹-۲-) مورد بررسی قرار گرفت و بعد از ۴۸-۲۴ ساعت، قطر هاله های عدم رشد مربوط به مواد آنتی باکتریال تولید شده از باکتری های انتخابی در شوری های مختلف توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد (Delgado, Brito, Peres, Noe´-Arroyo, & Garrido-Ferna´ ndez, 2005; V. N. Gordon, 2004; Rajaram, Manivasagan, Thilagavathi, & Saravanakumar, 2010).

۳-۱۵- اثر دماهای مختلف برتولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی

به منظور تعیین اثر دماهای مختلف بر میزان تولید مواد آنتی باکتریال توسط باکتری های انتخابی، سه دمای ۳۰ C̊، ۳۵ C̊ و ۴۰ C̊ برای گرمخانه گذاری ارلن حاوی محیط کشت باکتری ها در نظر گرفته شد و پس از تهیه کشت استارتر از باکتری های منتخب و تلقیح آن ها به محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی (مطابق بند ۳-۱۳-)، گرماگذاری ارلن ها در دماهای مذکور در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm انجام شد (برای هر یک از دماها سه تکرار درنظر گرفته شد). سپس در بهترین زمان تولید مواد ضدمیکروبی توسط باکتری های انتخابی، مطابق روش ۳-۱۴- آماده سازی نمونه ها صورت گرفت و اثر آنتی باکتریال محتویات هر یک از این میکروتیوب ها بر روی باکتری *V.harveyi* به روش انتشار در آگار توسط چاهک (مطابق روش بند ۳-۹-۲-) مورد بررسی و قطر هاله های عدم رشد مربوط به مواد آنتی باکتریال تولید شده از باکتری های انتخابی در دما های مختلف توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد (Aasen, Moretro, Katla, Axelsson, & Storro, 2000; V. N. Gordon, 2004; Rajaram, et al., 2010).

۳-۱۶- اثر **pH** های مختلف برتولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی

به منظور تعیین اثر pHهای مختلف بر میزان تولید مواد آنتی باکتریال توسط باکتری های انتخابی، محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی با pH های ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ ساخته شد برا تهیه این محیط ها ابتدا pH اولیه محیط پس از اتوکلاو اندازه گیری می شد و سپس با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ نرمال و سود ۱ نرمال محیط های کشت با pH های مورد نظر تهیه گردید. سپس با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر تیمار، مطابق بند های۳-۱۳-، ۳-۱۴- و ۳-۹-۲- ، آماده سازی کشت های باکتریایی و نمونه ها صورت گرفت و قطر هاله های عدم رشد مربوط به مواد آنتی باکتریال تولید شده از باکتری های انتخابی در pHهای مختلف در برابر باکتری *V.harveyi* توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد (Aasen, et al., 2000; V. N. Gordon, 2004; Rajaram, et al., 2010).

۳-۱۷- بررسی ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی در غلظت های مختلف شوری

پس از تهیه کشت استارتر و تلقیح ۵ درصد از کشت اولیه به ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار نمکی گرماگذاری در انکوباتور شیکردار $30^{\circ}C$ با دور rpm ۱۵۰ انجام شد سپس بخشی از نمونه به لوله های فالکن استریل انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در rpm۹۵۰۰ و دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ شدند و سوپرناتنت رویی به میکروتیوب های استریل دیگر انتقال داده شد وpH محلول در حدود ۷ تنظیم و با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون استریل گردید. سپس برای مواد ضدمیکروبی استخراج شده از هر باکتری ۸ فالکن استریل با سه تکرار (۲۴ فالکن) در نظر گرفته شد و ابتدا با مخلوط کردن آب دریای استریل و آب مقطر استریل، محلول های با غلظت های متفاوت شوری شامل: ۰،۴۷،۵۰،۴۲،۳۵،۳۰،۲۳،۲۰ قسمت در هزار (ppt) به حجم ml ۵ تهیه شد و به نسبت ۱:۱ به این لوله ها از ماده ضدمیکروبی استخراج شده اضافه شد و شوری نهایی محلول ها توسط دستگاه رفراکتومتر ثبت گردید. پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه از تیمارها برداشت کرده و مطابق روش انتشار در آگار توسط چاهک (۳-۹-۲-)، اثر مواد ضدمیکروبی استخراج شده بر روی باکتری *V.harveyi* ارزیابی و قطر هاله های عدم رشد مربوط به هر تیمار و تکرار های آن توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد(Jung et al., 2008 Lim, Jeong, & Kim, 2011).

۳-۱۸- بررسی ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی در دماهای مختلف

استخراج ماده ضد میکروبی از باکتری های منتخب مطابق با بندهای ۳-۱۳- و ۳-۱۴- صورت گرفت و برای مواد ضدمیکروبی استخراج شده از هر یک از باکتری های منتخب ۹ میکروتیوب استریل با سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد، سپس ml۱/۵ از مواد ضدمیکروبی استخراج شده درون میکروتیوب ها ریخته شد و برای جلوگیری از تبخیر نمونه ها روی آنها پارافین مایع استریل اضافه گردید. پس از آماده شدن تیمارها آن ها را در هیتینگ بلاک قرار داده و ماندگاری اثر آنتی باکتریال مواد ضدمیکروبی بر روی باکتری *V.harveyi* در دماهای ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵ و ۱۰۰ درجه سانتیگراد در زمان های ۱۰ و ۲۰ دقیقه مطابق روش انتشار در آگار توسط چاهک (بند۳-۹-۲-) مورد ارزیابی و اطلاعات حاصل ثبت شد (Jung, et al., 2008; Lim, et al., 2011). ماندگاری اثر آنتی باکتریال مواد ضدمیکروبی بر روی باکتری *V.harveyi* در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد توسط اتوکلاو کردن نمونه انجام گرفت.

۳-۱۹- بررسی ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی در **pH** های مختلف

پس از استخراج مواد ضدمیکروبی از باکتری های منتخب (مطابق با بندهای ۳-۱۳- و ۳-۱۴-)، اندازه گیری و تنظیم pH آنها در حدود خنثی، برای هر یک از تیمارهای باکتری های انتخابی ۵ لوله فالکن استریل با سه تکرار در نظر گرفته و در هر لوله ml ۵ از مواد استخراج شده ریخته و pH آن ها توسط اسیدکلریدریک ۱ نرمال و سود ۱ نرمال با حوصله و تدریجی بر روی ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تنظیم گردید. پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه ماندگاری اثر آنتی باکتریال مواد استخراج شده از باکتری ها بر روی باکتری *V.harveyi* به روش انتشار در آگار توسط چاهک (بند۳-۹-۲-) مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه هاله های عدم رشد اندازه گیری و ثبت شد(Jung, et al., 2008 Lim, et al., 2011).

۳-۲۰- بررسی اثر آنتاگونیستی عصاره ی باکتری های انتخابی بر یکدیگر و بر روی برخی باکتری های متعلق به خانواده باکتری های منتخب

روش کار:

به منظور تهیه عصاره باکتری های انتخابی، ابتدا در ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی مقدار یک لوپ از باکتری های انتخابی به صورت جداگانه تلقیح و در انکوباتور شیکردار $30^{\circ}C$ با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۸-۶ ساعت گرما گذاری گردیدند. هنگامی که OD نمونه ها معادل با یک مک فارلند شد($OD_{A600}=0.2$) به میزان ۵درصد به ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث ۲/۵ درصد تلقیح گردیدند. سپس بر اساس نتایج حاصل از مراحل قبلی ۴۸ ساعت پس از کشت از ارلن های حاوی محیط کشت برداشت کرده و به فالکن های استریل انتقال داده شد، سپس فالکن ها به مدت ۱۲ دقیقه در rpm۹۵۰۰ و دمای $\dot{C}$ ۴ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی به فالکن های استریل دیگر انتقال داده شد و پس از اندازه گیری و درصورت لزوم خنثی سازی، با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون استریل گردیدند، سپس مطابق روش انتشار در آگار اثر آنتی باکتریال هر یک از باکتری ها ی منتخب بر روی یکدیگر و بر باکتری های *B.cereus* و *B.subtilis* مورد بررسی قرار گرفت و بعد از ۴۸-۲۴ ساعت، قطر هاله های عدم رشد توسط کولیس اندازه گیری و ثبت شد.

تعیین ماده موثره باکتری های انتخابی

۳-۲۰-۱- بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی توسط باکتری های انتخابی

۳-۲۰-۱-۱-استخراج مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی از باکتری های انتخابی

در ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی استریل، مقدار یک لوپ از باکتری های منتخب به صورت جداگانه تلقیح و ارلن ها در انکوباتور شیکردار ۳۰ °C با دور ۱۵۰ rpm به مدت یک شب گرمخانه گذاری گردید. هنگامی که OD نمونه ها معادل با یک مک فارلند شد(OD_{A600}=0.2) به میزان ۵ درصد به ارلن های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی تلقیح گردیدند و در انکوباتور شیکردار ۳۰ °C با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند.

اندازه گیری و خنثی سازی pH:

پس از طی زمان انکوباسیون، pH سوسپانسیون توسط دستگاه pH متر خوانده و ثبت گردید و سپس در صورت نیاز توسط اسید کلریدریک یا سود ۱ نرمال pH آن در حدود ۷ تنظیم شد.

جداسازی توده میکروبی:

سوسپانسیون میکروبی محیط کشت، پس از خنثی سازی به ظروف درپیچ دار استریل مخصوص انتقال داده شد و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید تا توده سلولی جداسازی شود، به منظور اطمینان از جداسازی کامل توده میکروبی سوپرناتنت حاصله را توسط لام نئوبار و زیر میکروسکوپ از نظر عاری بودن از باکتری بررسی کرده و در صورت نیاز مجدداً سانتریفوژ انجام شد. سپس سوپرناتنت حاصله به آرامی به لوله های فالکن استریل دیگر منتقل شدند (تصویر ۰-۹).

تصویر ۰-۹- مراحل اولیه استخراج مواد ضد میکروبی

۳-۲۰-۱-۲-رسوب دهی پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم

روش تهیه بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار، pH=۷:

محلول A Di Potassium hydrogen phosphate 0.05 M 11.41g $K_2HPO_4.3H_2O$/L

محلول B Sodium dihydrogen phosphate 0.05 M 1.8g $NaH_2PO_4.2H_2O$/L

سپس ml ۱۶ از محلول A را با ml ۱۰/۵ از محلول B در بالن ژوژه مخلوط کرده و با آب دیونیزه به حجم ۱ لیتر می رسانیم.

روش کار:

ml ۳۰ از سوپرناتنت تهیه شده از هر یک از باکتری های انتخابی در ارلن استریل حاوی مگنت ریخته شد و ارلن ها در ظرف حاوی یخ قرار داده شد و روی همزن مغناطیسی در انکوباتور یخچال دار با دمای ۴°C گذاشته شد سپس سولفات آمونیوم به میزان ۷۰ درصد به سوپرناتنت به صورت تدریجی همزمان با چرخش مگنت (در طی ۱ ساعت) اضافه شد. نمونه ها یک شب در یخچال ۴°C قرار داده شد تا انحلال سولفات آمونیوم به خوبی صورت گیرد (تصویر ۰-۱۰). سپس محتویات ارلن هابه لوله های استریل (به میزان ml ۱۰ در هر لوله) انتقال داده شد و به مدت ۴۰ دقیقه با دور rpm ۷۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ مایع رویی را به لوله ی دیگری انتقال داده و رسوب حاصله در هر لوله که حاوی مواد پروتئینی می باشد درml ۶ بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار حل گردید (ml ۱ برای بررسی فعالیت ضد میکروبی و ml۵ به منظور دیالیز). به منظور حصول اطمینان از جداسازی مواد ضد میکروبی، فاز رسوب و فاز آبی از نظر فعالیت ضد میکروبی مورد

سنجش قرارگرفتند. بخشی از فراکسیون رسوب حل شده در بافر نیز برای انجام آنالیز کنار گذاشته شدند (Sharma, Kapoor, Gautam, & Kumari, 2011; Xie, Zhang, Shang, & Guo, 2009).

تصویر ۰-۱۰- رسوب دهی پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم

۳-۲۰-۱-۳-دیالیز

آماده سازی کیسه دیالیز:

کیسه های دیالیز، به منظور شستشو و زدودن مواد محافظ پوشاننده از روی کیسه، در بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد و به مدت ۴ ساعت در زیر جریان شیر آب سرد قرار گرفت. سپس کیسه دیالیز بدون تماس با دست و توسط قیچی برای هر یک از نمونه ها به اندازه تقریبی ۸ سانتیمتر بریده شد (برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد) و یک سمت کیسه ها توسط گیره کیسه دیالیز بسته شد. در کلیه مراحل کار به منظور جلوگیری از تماس دست از دستکش بدون لاتکس استفاده شد.

انجام دیالیز:

رسوبات پروتئینی رسوب داده شده با سولفات آمونیوم که در مرحله قبل آماده شده بود را به میزان ۵ ml برای هرنمونه در کیسه های دیالیز ریخته شد و درب کیسه توسط گیره ی مخصوص بسته شد و مشخصات هر نمونه روی گیره ثبت گردید. و هر یک از نمونه ها قبل از شروی دیالیز توزین و وزن و حجم آن ها ثبت

گردید. سپس کیسه های دیالیز محتوی نمونه ها در ارلن ۵ لیتری حاوی ۴ لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار، pH=۷ و مگنت قرار داده شد و در انکوباتور یخچال دار ۴°C و بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۴۸ ساعت شناور گردیدند. مرحله ی اول تعویض بافر ۵ ساعت بعد از شروع دیالیز انجام شد و سپس هر ۱۸ ساعت یک بار تا ۴۸ ساعت تعویض بافر صورت گرفت (تصویر ۰-۱۱).

پس از انجام مراحل بالا و طی مدت زمان ۴۸ ساعت، به منظور اطمینان از خروج کامل یون های آمونیوم از نمونه ها از معرف HACH (Ammonia Salicylate و Ammonia Cyanorate) استفاده شد که درصورت افزودن به محلول حاوی یون های آمونیوم، محلول به رنگ سبز در می آید. نمونه ها را پس از طی فرایند دیالیز از ارلن خارج کرده، وزن و حجم آن ها ثبت گردید. سپس بخشی از محتویات کیسه های دیالیز برای بررسی فعالیت ضد میکروبی و اندازه گیری میزان پروتئین به لوله های استریل و بخشی دیگر به منظور لئوفلیزه کردن و انجام سایر آزمایشات به کرایوتیوب های استریل انتقال داده شدند. نمونه ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰°C- قرار داده شد (Sharma, et al., 2011; Xie, et al., 2009).

تصویر ۰-۱۱- دیالیز پروتئین های ترسیب شده با سولفات آمونیوم

تعیین میزان فعالیت زیستی فراکسیون های جداسازی شده:

آزمونه شامل:

عصاره محیط کشت باکتری های انتخابی پس ازسانتریفیوژو خنثی کردن pH

رسوب حاصل از ترسیب پروتئین با سولفات آمونیوم

مایع حاصل از دیالیز نمونه ها

روش کار:

از آزمونه های فوق به منظور تعیین فعالیت کل[1] مواد بازدارنده در هر یک از مراحل استخراج استفاده شد. برای این منظور رقت های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ از هر یک از فراکسیون ها تهیه گردید و میزان بازدارندگی از رشد آن ها بر روی سویه اندیکاتور *V.harveyi* به روش انتشار در چاهک مورد ارزیابی قرارگرفت (مطابق بند۳-۹-۲-) و برای هر آزمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. سپس منحنی استاندارد هر یک از نمونه ها بر اساس میزان هاله عدم رشد و رقت آزمونه تهیه شد. معادله منحنی تهیه شده به شرح ذیل است (Britoa, Fevereiro, Tenreiro, & Peresa, 2005; Parente, et al., 1995 Delgadoa,):

$$R=a+b \log (d)$$

R= قطر هاله عدم رشد

d= میزان آزمونه تلقیح شده در هر چاهک

میزان فعالیت کل هر نمونه مطابق فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$AU\ ml^{-1}= (1000/60)\ D\ 10^{(R/b)}$$

[1] Total Activity

۳-۲۰-۱-۴-اندازه گیری میزان پروتئین محلول

- تست لوری[1]:

اساس کار:

این روش بر اساس تبدیل Cu2+ به Cu+ در شرایط قلیایی و واکنش مس قلیایی با پروتئین ها و احیای فسفومولیبدات (معرف فولین) توسط تیروزین و تریپتوفان پروتئین ها استوار می باشد. در اثر ایجاد کمپلکس پروتئین ها با معرف فولین (ترکیبات آن عبارتند از: تنگستات سدیم و مولیبدات سدیم در اسیدفسفریک و اسید کلریدریک)رنگ آبی رنگی ایجاد می شود که شدت رنگ حاصله به مقدار اسید آمینه های حلقوی فوق بستگی دارد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری نمونه ها اندازه گیری و با منحنی استاندارد مقایسه شده و میزان پروتئین محلول نمونه تعیین می شود.

محلول های مورد نیاز:

محلول ۱٪ سولفات مس ($CuSO_4 . 5H_2O$)، محلول ۲٪ سدیم پتاسیم تارتارات (Na_2 Tartrate. $2H_2O$)، محلول ۰/۲ مولار سدیم هیدروکساید (NaOH)، محلول ۴٪ سدیم کربنات (Na_2CO_3)، معرف فولین (Folin-ciocalteaa)

رقت های استاندارد از آلبومین سرم گاوی (Bovin Serum Albumin fraction v) شامل رقت های: ۰/۰۰mg/ml، ۰/۰۲ mg/ml، ۰/۰۴ mg/ml، ۰/۰۶ mg/ml، ۰/۰۸ mg/ml و ۰/۱ mg/ml و همچنین رقت های mg/ml ۰/۲۰، ۰/۴۰mg/ml، ۰/۶۰mg/ml، ۰/۰۲mg/ml، ۰/۸۰mg/ml و ۱۰۰ mg/ml.

نمونه شاهد شامل ml ۱-۰/۵ آب دیونیزه

آزمونه شامل عصاره محیط کشت پس از سانتریفیوژ، سوپرناتنت حاصل از ترسیب پروتئین با سولفات آمونیوم، رسوب حاصل از ترسیب پروتئین با سولفات آمونیوم و مایع حاصل از دیالیز نمونه

کلیه محلول ها با آب دیونیزه تهیه شد.

[1] Lowry protein assay

مراحل آزمایش:

به ml ۵۰ از محلول ۳، ml ۵۰ محلول ۴ اضافه کرده سپس ml ۱ از محلول ۱ و ml ۱ از محلول ۲ به آن اضافه شد و نام آن محلول A گذاشته شد (این محلول باید قبل از هر آزمون به صورت تازه آماده شود). سپس به ml ۱-۰/۵ از نمونه مورد آزمایش (که ممکن است رقت های استاندارد BSA یا نمونه های حاصل از دیالیز و یا هر آزمونه دیگری باشد) ml ۲ از محلول A را اضافه کرده و خوب مخلوط کردیم و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار دادیم. در این فاصله زمانی به ml ۱۰ از محلول فولین، ml ۱۰ آب دیونیزه اضافه کرده تا محلول ۱ نرمال فولین تهیه شود و نام آن را محلول B گذاشتیم پس از طی مدت زمان ذکر شده به نمونه مورد آزمایش ml ۰/۲۵ از محلول B را افزوده و خوب مخلوط کردیم و میزان جذب نوری نمونه ها پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه و تاریکی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Jenway 6800 UV/VIS، برنامه اندازه گیری پروتئین توسط تست لوری خوانده شد و با قرار دادن عدد مربوطه در منحنی استاندارد، میزان پروتئین نمونه ها برحسب mg/ml تعیین گردید(Holme & Peck, 1998; Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). برای هر نمونه سه تکرار درنظر گرفته شد.

- تست برادفورد:

در این روش از کوماسی بریلیانت بلو G-250 به عنوان رنگ متصل شونده به پروتئین استفاده می شود. زمانی که پروتئین به رنگ متصل می شود تغییر رنگ ایجاد می شود که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر قابل اندازه گیری است و با مقایسه با نمودار استاندارد می توان میزان پروتئین را تعیین کرد.

محلول های مورد نیاز:

رنگ کوماسی برلیانت بلو G۲۵۰: پس از حل نمودن mg ۱۰۰ پودر کوماسی برلیانت بلو G۲۵۰ در ml ۵۰ اتانل ۹۶٪، ml ۱۰۰ اسید فسفریک(w/w)۸۵٪ به آن اضافه شد. سپس حجم محلول حاصل با آب مقطر به lit۱ رسانده شده وبا کاغذ صافی صاف گردید. این محلول تایک ماه در ۴°C قابل استفاده است.

محلول استاندارد پروتئین: آلبومین سرم گاوی BSA (۱ mg/ml)

برای رسم منحنی استاندارد مطابق جدول (۲-۱)عمل شد

جدول (۲-۱)تهیهٔ استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه‌های مجهول

لوله / محلول(µl)	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	پروتئین مجهول
پروتئین استاندارد	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	_
آب مقطر	۹۰	۸۰	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۰-۱۰۰
نمونه	_	_	_	_	_	_	_	_	_	۱۰-۱۰۰
معرف(ml)	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
[پروتئین استاندارد] (mg/ml)	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	

محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شده پس از ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976; Holme & Peck, 1998).

۳-۲۰-۱-۵-الکتروفورزیس

به منظور بررسی تخلیص پروتئین ها و تخمین وزن مولکولی پروتئین های موجود در نمونه های استخراج شده از باکتری ها ی منتخب، از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE و رنگ آمیزی کماسی بلو استفاده گردید و به عنوان مارکر وزن از مارکر استاندارد شرکت Fermentase با وزن مولکولی ۱۴/۴ الی ۱۱۶ کیلودالتون استفاده شد. الکتروفورز روی ژل ۱۳٪ پلی آکریل آمید ۳۰٪ در حضور عوامل آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ و TEMED انجام گرفت. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در جریان ۶۰ ولت قرار داده شد و سپس الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰ ولت انجام شد. رنگ آمیزی ژل با کماسی بلو و رنگ زدایی با محلول ۷٪ اسید استیک انجام شد و وزن مولکولی باند های پروتئینی با مقایسه با باندهای مارکر استاندارد تخمین زده شد.

روش کار

آماده سازی نمونه: بافر فسفات با میزان هم حجم نمونه لئوفلیزه مخلوط و ۵ دقیقه جوشانده شد.

بافر ژل بالا (Bufferstacking):. ۶/۱ گرم تریس باز (Tris base) و ۰/۴ گرم SDS را در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس با استفاده از اسید کلریدریک ۲ مولار pH آن در حدود ۶/۸ تنظیم شد و با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت تریس در این بافر ۰/۵ مولار است.

محلول استوک اکریل‌آمید (۳۰/۸ درصد): ۳۰ گرم اکریل‌آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل‌آمید را در زیر هود وزن کرده ودر آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر حل گردید. این محلول در ظرف تیره تا ۳ ماه در یخچال قابل نگهداری است.

توجه: از استنشاق پودر اکریل‌آمید و بیس اکریل‌آمید در هنگام توزین و تماس با محلول آنها باید خودداری کرد. توزین این مواد باید در زیر هود صورت گیرد و در هنگام تهیه محلول ها و کار با آنها دستکش پوشید.

۲- بافر ژل پایین (BufferResolving): ۱۸/۲ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS را حدود ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده وpH محلول با اسید کلریدریک ۲ مولار در حدود ۸/۸ تنظیم گردید. سپس با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت تریس در این بافر ۰/۵ مولار است.

بافر الکترود (بافر مخزن) (Running Buffer): ۳ گرم تریس باز، ۱۴/۴ گرم گلیسین و ۱ گرم SDS را در یک لیتر آب مقطر حل گردید. pH این بافر حدود ۸/۳ است و نیازی به تنظیم ندارد.

بافر نمونه (Loading Buffer):

برای تهیه این بافر از غلظت 5X استفاده شد. ۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل بالا، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، یک گرم SDS، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول برموفنل‌بلو(۰/۵ درصد در اتانول) و ۱ میلی‌لیتر ۲- مرکاپتواتانول را در یک ظرف مخلوط کرده سپس با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد: ۰/۱ گرم پرسولفات آمونیوم در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید (این محلول بایستی تازه باشد).

- ۱۰TEMED درصد: ۰/۱ میلی‌لیتر TEMED در ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید (این محلول بایستی تازه باشد).

رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو

کوماسی بریلیانت بلو R-250 پراستفاده‌ترین رنگ در رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در SDS-PAGE است. حساسیت این روش، ۰/۵-۰/۲ میکروگرم پروتئین در هر باند است. برای تهیه محلول رنگ‌آمیزی ۰/۲۵ گرم کوماسی بلو R-250 در ۱۲۵ میلی‌لیتر متانول حل گردید. سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی-لیتر آب مقطر اضافه شد. غلظت رنگ در این محلول ۰/۱ درصد (w/v) است.

رنگ بر:

محلول رنگ‌بر، شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. ژل به مدت ۲ ساعت در کوماسی بریلیانت بلو قرار داده شد و در ادامه برای ظهور باندها به محلول رنگ‌بر منتقل شد و برای مدت ۱ شب در این شرایط قرار می‌گرفت.

ساخت ژل ۱۳٪:

ابتدا مطابق جدول ۷-۰ مواد ژل R داخل دستگاه شیشه ای ریخته شد و حدود µl ۲۵۰ ایزوبوتانل روی آن ریخته شد تا سطح ژل یکنواخت گردد سپس ۲۰ دقیقه صبر کرده تا ژل بسته شود و ایزوبوتانل را خالی کرده و سطح ژل با آب مقطر شستشو داده شد در مرحله بعد ژل S داخل دستگاه ریخته شد و بلافاصله شانه داخل بخش S قرار گرفت. پس از بستن کامل ژل S شانه را خارج کرده و چاهک ها با آب مقطر شستشو داده شد و در تانک الکتروفورز قرار داده شد سپس از هر نمونه µl ۳۰ در چاهک ها قرار داده شد (Hammami, Rhouma, Jaouadi, Rebai, & Nesme, 2009; Holme & Peck, 1998).

جدول ۷-۰- اجزای تشکیل دهنده ژل پایین الکتروفورز و ژل بالا الکتروفورز

اجزای تشکیل دهنده	اجزای ژل پایین۱۲/۵ درصد		اجزای ژل بالا۵ درصد	
	بافر ژل پایین (R)	۳ میلی‌لیتر	بافرژل بالا (S)	۱/۲۵ میلی‌لیتر

محلول استوک اکریل آمید	۴/۹ میلی‌لیتر	۰/۶۵ میلی‌لیتر
آب مقطر	۴/۱ میلی‌لیتر	۳/۰۵ میلی‌لیتر
پر سولفات آمونیوم ۱۰ درصد	۰/۰۵ میلی‌لیتر	۰ /۰۵ میلی‌لیتر
TEMED ۱۰ درصد	۰/۰۵ میلی‌لیتر	۰ /۰۱۵ میلی‌لیتر

۳-۲۰-۱-۶-طیف سنجی ماورای بنفش

برای این منظور ۱ گرم از عصاره لئوفلیزه شده باکتری های IS02 وIS03 در ml ۱ از حلال های متانول، استونیتریل، هگزان و دی کلرومتان حل گردید و سپس توسط اسپکتروفوتومتر Jenway مدل 6800 طیف سنجی نمونه ها در محدوده طیف مرئی nm ۳۵۰-۱۹۰، با سرعت nm/min ۴۰۰-۱۰۰ ثبت شد(Campbell & Dwek, 1984; Schmid, 2001).

۳-۲۰-۲- بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت غیر پروتئینی توسط باکتری های انتخابی

۳-۲۰-۲-۱-کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکپی جرمی[۱]

برای تعیین مواد بازدارنده غیر پروتئینی موجود در عصاره باکتری های IS02 و از تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکپی جرمی استفاده شد. برای این منظور عصاره لئوفلیزه شده باکتری های مذکور در دی کلرواتان حل شد و سپس µl ۱ از نمونه به ستون VF5MS دستگاه ساخت کارخانه Varian(مدل GC 3800، MS 2000) تزریق شد، گاز حامل در این پروسه هلیم و دمای اولیه واکنش°C ۴۰ و دمای نهایی °C ۲۸۰ بود (سرعت افزایش دما °C ۱۰) سپس کروماتوگراف حاصل ذخیره و درصد مشابهت آن ها با بانک اطلاعات دستگاه ثبت و بررسی خواص احتمالی ضد میکروبی موادی که طبق نتایج حاصل بیشترین میزان و درصد خلوص را داشتند با بانک های اطلاعاتی موجود مقایسه و مورد بحث قرار گرفت (Chaudhary et al., 2006; Farzaliev et al., 2009; Y. Kim et al., 2004).

[۱] GC- MS

۳-۲۰-۳- روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

در کلیه آزمون های پارامتریک آنالیز واریانس ابتدا همگن بودن واریانس و نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون های لیونز[۱]، Welch و کولموگرو اسمیرنو[۲] بررسی و سپس با استفاده از نرم افزار آماری PASW نسخه ۱۸ آماری، آنالیز واریانس یک یا دو طرفه و آزمون های Post Hoc دانکن[۳]، توکی[۴] و جیمز-هاول[۵] به منظور تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح اعتماد ۵ درصد استفاده شد.

---

[۱] Levene's test

[۲] Kolmogorov-Smirnov

[۳] Duncan

[۴] Tukey

[۵] Games Howell

فصل چهارم

نتایج

نتایج

۴-۱- نتایج اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرها

نتایج اندازه گیره فاکتورهای فیزیکوشیمیایی در جدول ۰-۱ آورده شده است.

حداکثر شوری آب استخرهای پرورشی میگوی سفید غربی در منطقه حله مربوط به ماه مرداد (ppt ۴۶) و حداقل آن مربوط به ماه خرداد (ppt ۴۱/۳۳) بود (جدول ۰-۱، نمودار ۰-۴). میزان اسیدیته آب حداقل ۷/۳۹ و حداکثر ۸/۲۰ اندازه گیری شد (جدول ۰-۱،نمودار ۰-۲).

در منطقه دلوار بیشترین میزان شوری آب استخر محل پرورش میگو مربوط به ماه مرداد (ppt ۵۰) و کمترین آن مربوط به ماه خرداد (ppt ۴۲) بود (جدول ۰-۱، نمودار ۰-۴) و همچنین بیشترین و کمترین میزان دما نیز در طی دوره پرورش به ترتیب مربوط به ماه های مرداد ($^{\circ}C$ ۳۳/۹) و خرداد ($^{\circ}C$ ۲۶/۷) بود (نمودار ۰-۱) میزان اسیدیته آب نیز در حدود ۸ بود (نمودار ۰-۲).

بر اساس نتایج اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای محل پرورش میگوهای سفید غربی در منطقه مند، بیشترین و کمترین میزان شوری آب به ترتیب مربوط به مرداد ماه با شوری ppt ۵۶ و شهریور ماه با شوری ۴۶/۳۳ بود (نمودار ۰-۴) همچنین بیشترین دما ($^{\circ}C$) ۳۳/۵ در مرداد ماه و کمترین دما ($^{\circ}C$) ۲۸/۲۳ در خرداد ماه بود (نمودار ۰-۱).

با اندازه گیری میزان دما، شوری و pH آب استخرهای محل پرورش میگو در سه منطقه حله، دلوار و مند استان بوشهر این طور نتیجه گیری می شود که حداکثر و حداقل دمای آب در طول دوره پرورش به ترتیب $^{\circ}C$ ۳۴ و $^{\circ}C$ ۲۶ (نمودار ۰-۱) و بیشترین و کمترین میزان شوری آب در طی دوره پرورشppt۵۶ و ppt ۴۱ می باشد (نمودار ۰-۴) همچنین نوسانات pH در محدوده (۸/۲۶-۷/۳۶) می باشد (نمودار ۰-۲).

جدول ۰-۱- میزان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرها، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی سفید غربی از ماه خرداد لغایت مهر ۱۳۸۹ به تفکیک محل- استان بوشهر

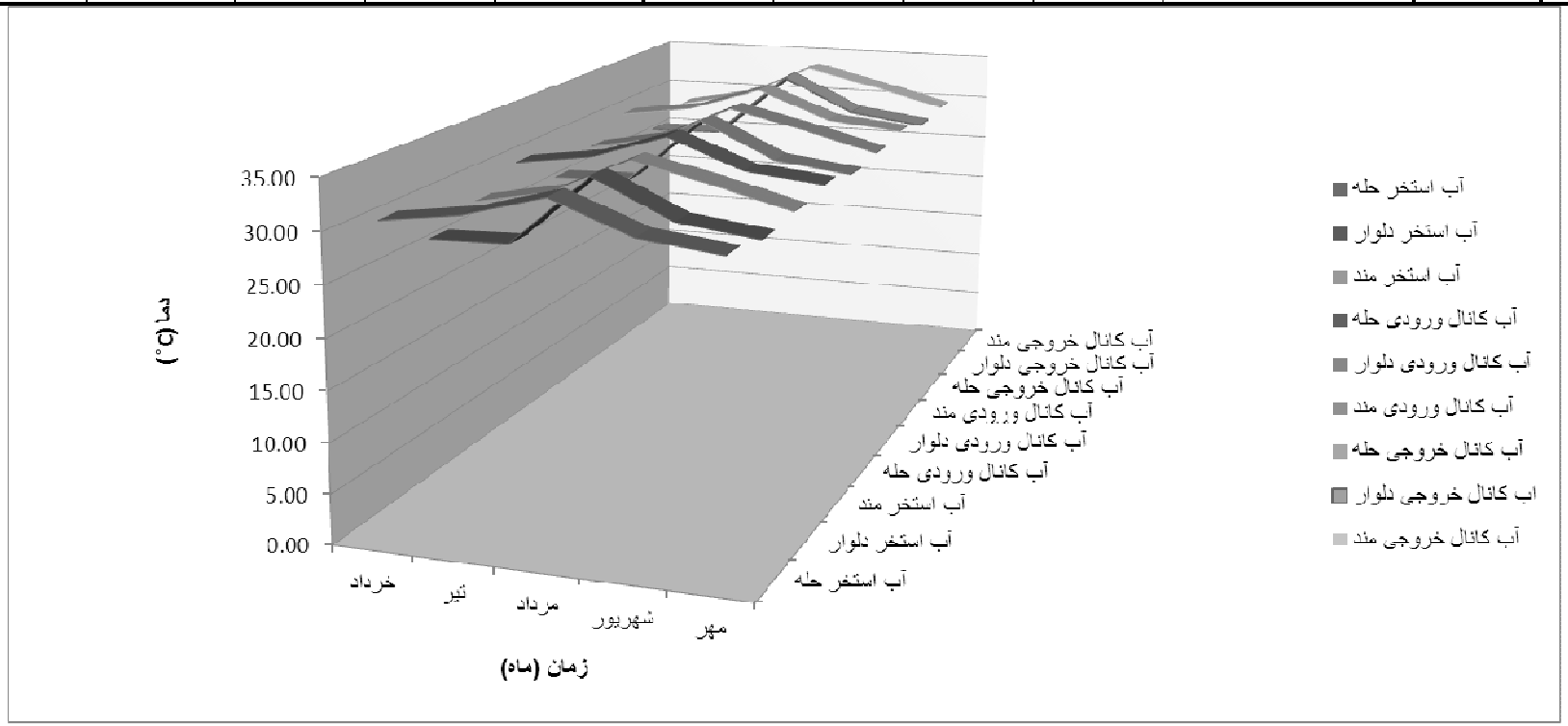
فاکتور فیزیکوشیمیایی	نمونه	شوری (ppt)					دما (°C)					pH				
		خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر
ر	حله	41.33±0.58	43.33±0.58	46±1.73	44±0	44.33±0.58	30.7±0.16	31.8±0.01	34±0.01	31±0.01	30.07±0.06	7.84±0.02	7.88±0	8.2±0.238	8.2±0.16	0.26
	دلوار	42±0.42	45±0.46	50±0.5	42±0	42.33±0.6	26.7±0.14	26.9±0.01	33.9±0.42	30.2±0.01	29.2±0.03	8.13±0.01	8.26±0	8.01±0.014	8.21±0.015	0.17
	مند	47±1	51.3±0.58	56±1	46.3±1.15	46.67±0.58	28.23±0.06	29.8±0.01	33.5±0.01	31.67±0.45	29.6±0.01	7.867±0.02	7.88±0	7.84±0.015	7.85±0.19	0.17
ی	حله	42±0.34	44±0.32	46.5±1.54	37±0.01	49.5±0.56	30.3±0.19	31.4±0.01	34±0.01	31±0.01	30.2±0.04	7.98±0.02	8.05±0	8.07±0.23	8.31±0.175	0.26
ی	دلوار	41±0.23	41.5±0.42	45±0.32	40±0	41.67±0.6	26.7±0.12	26.9±0.02	33.9±0.22	30.2±0.01	29.2±0.02	8.17±0.02	8.26±0.01	7.64±0.014	8.37±0.02	0.17
	مند	44±0.54	45.3±0.51	45±1.2	46±0.82	41.5±0.55	28.23±0.42	29.8±0.01	33.5±0.01	31.67±0.4	29.6±0.01	8.01±0.01	8.03±0	8.04±0.02	7.56±0.19	0.16
	حله	44±0.43	45±0.41	47±1.1	47.5±0.2	48±0.57	30.3±0.2	31.4±0.012	34±0.01	31±0.01	30.2±0.05	8.02±0.02	8.08±0	7.95±0.21	7.98±0.15	0.248

ی	دلوار	43±0.41	44.5±0.34	56±0.32	46±0.2	43.3±0.6	26.7±0.12	26.9±0.01	33.9±0.31	30.2±0.01	29.2±0.02	8.14±0.01	8.13±0.01	7.8±0.014	8.27±0.015	0.15±
	مند	46.1±0.9	50.4±0.45	53.5±0.7	45±0.5	47.5±0.58	28.23±0.04	29.8±0.01	33.5±0.2	31.67±0.2	29.6±0.01	8.2±0.01	8.1±0	7.8±0.01	7.65±0.25	0.16±

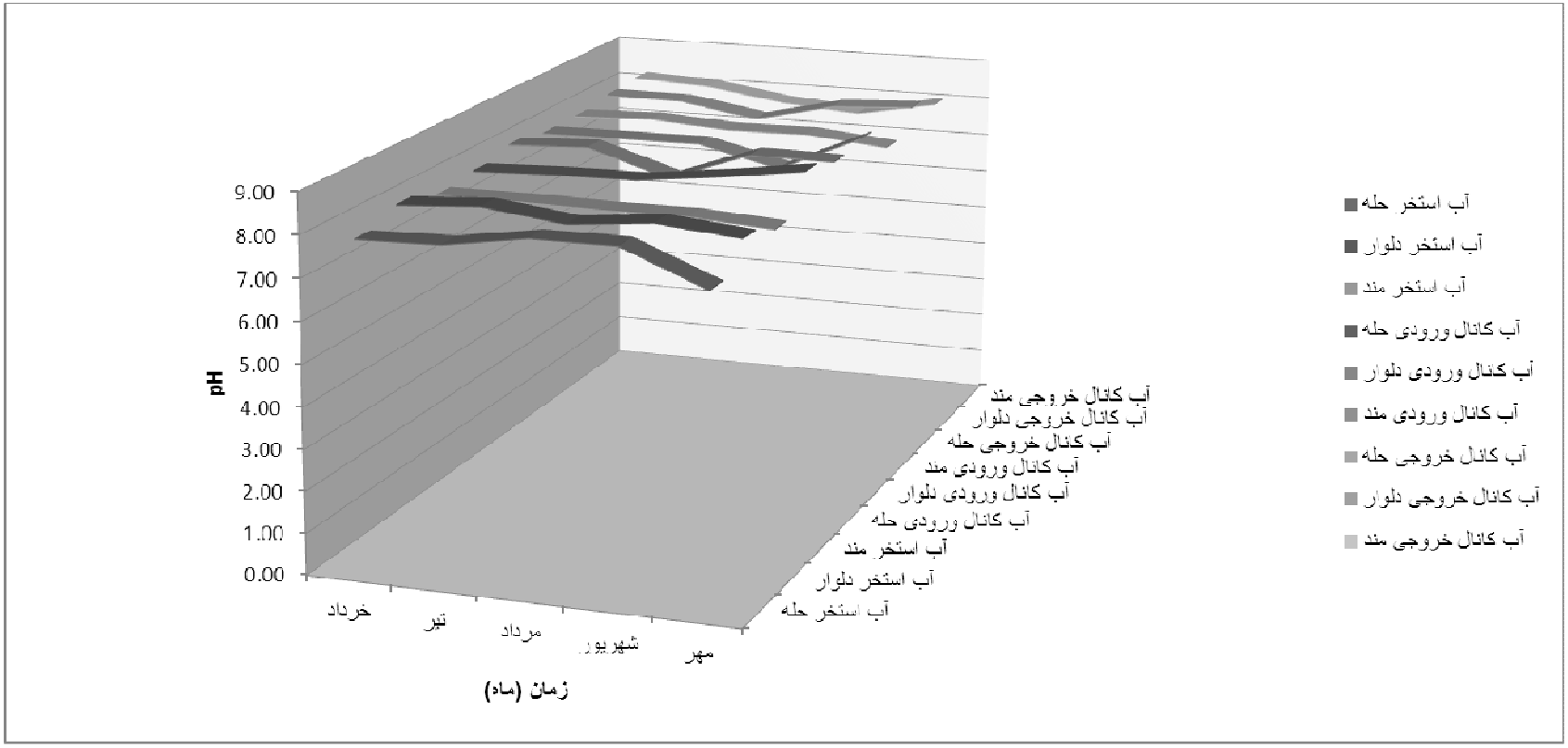
جدول ۰-۲- میزان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب استخرها، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی سفید غربی از ماه خرداد لغایت مهر ۱۳۸۹ به تفکیک محل- استان بوشهر

فاکتور فیزیکوشیمیایی / مکان نمونه برداری		اکسیژن محلول (mg/ L)					هدایت الکتریکی (µs/cm)				
		خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر
آب استخر	حله	4.81±0.37	4.64±0.5	4.72±0.68	4.68±0.5	4.84±0.1	996±1	993.67±1	980±1	992.33±1.2	983±1
	دلوار	4.3±0.2	4.91±0.6	4.15±0.42	4.21±0.38	4.11±0.24	988±1.1	1002±1	1011±0	1014.2±0.67	1012.67±1.2
	مند	4.48±0.16	4.33±0	4.73±0.11	4.54±0.21	4.54±0.11	992.67±1	993.67±1	1020±0	1018.67±0.5	1003.87±1.14
آب کانال ورودی	حله	6.3±0.38	7.19±0.51	7.32±0.6	7.41±0.53	6.98±0.16	960.5±1	960.6±1	1010±1	996.42±1.15	1001.67±1
	دلوار	8.25±0.2	8.26±0.6	7.15±0.42	8.1±0.38	7.98±0.24	987±1.1	992±1	994±0	1012.2±0.62	1014.33±1.2

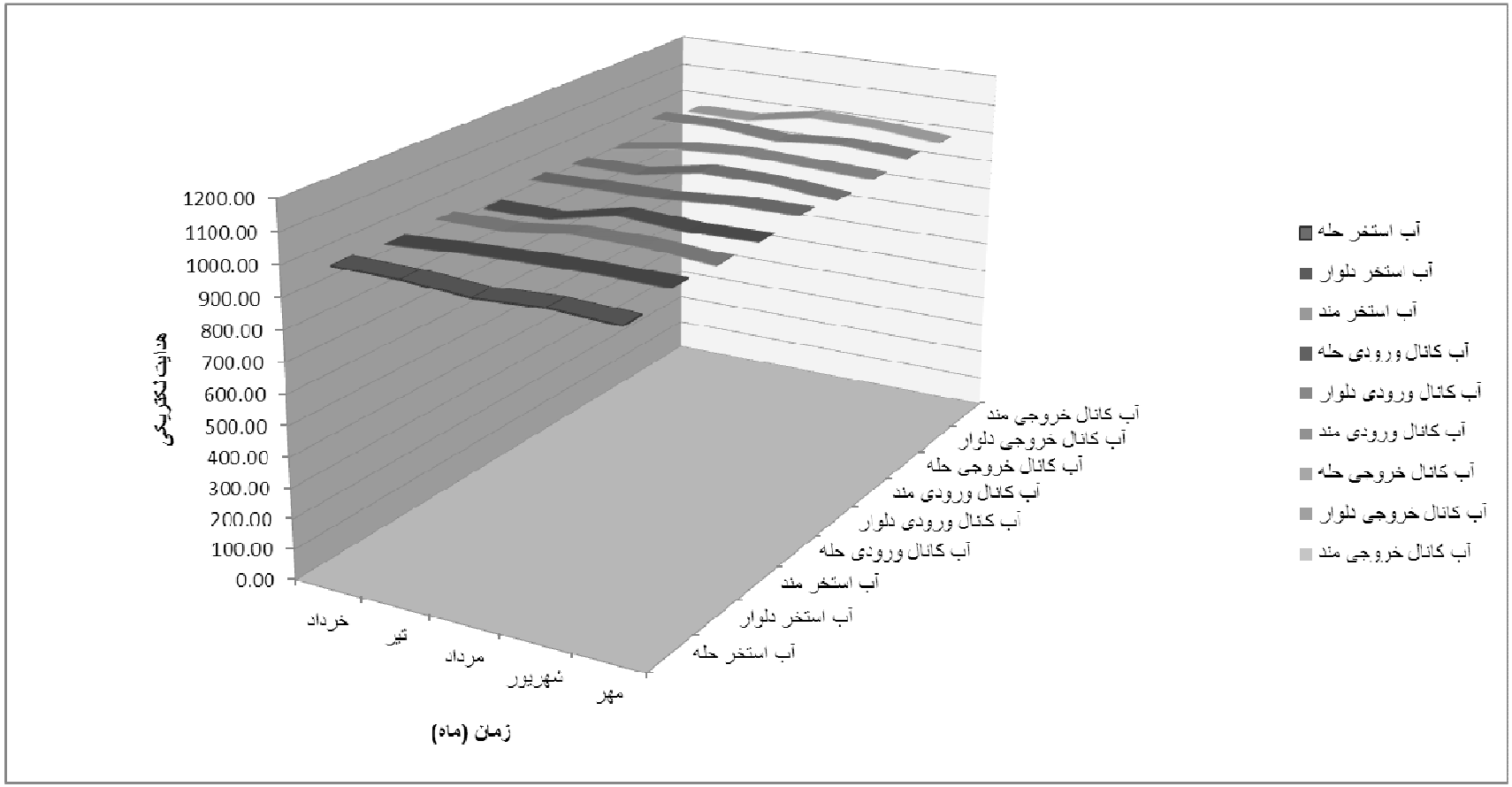
	مند	8.71±0.16	8.41±0	7.52±0.11	8.71±0.21	7.87±0.11	974.2±1	973.6±1	1015±0	1013±0.56	992.67±1.12
آب کانال خروجی	حله	6.1±0.38	6.3±0.5	7.01±0.59	7.1±0.53	6.03±0.1	962±1	996.3±1	1011.33±1	1003.1±1.14	996±1.01
	دلوار	8.32±0.2	8.28±0.6	8.19±0.42	8.21±0.38	8.32±0.24	1009.67±1.1	1014.67±1	996±0	1014±0.67	1000.87±1.2
	مند	7.2±0.16	7.52±0	8.6±0.11	7.98±0.21	8.24±0.1	976±1	976±1	1018±0	1011±0.58	991.5±1.15



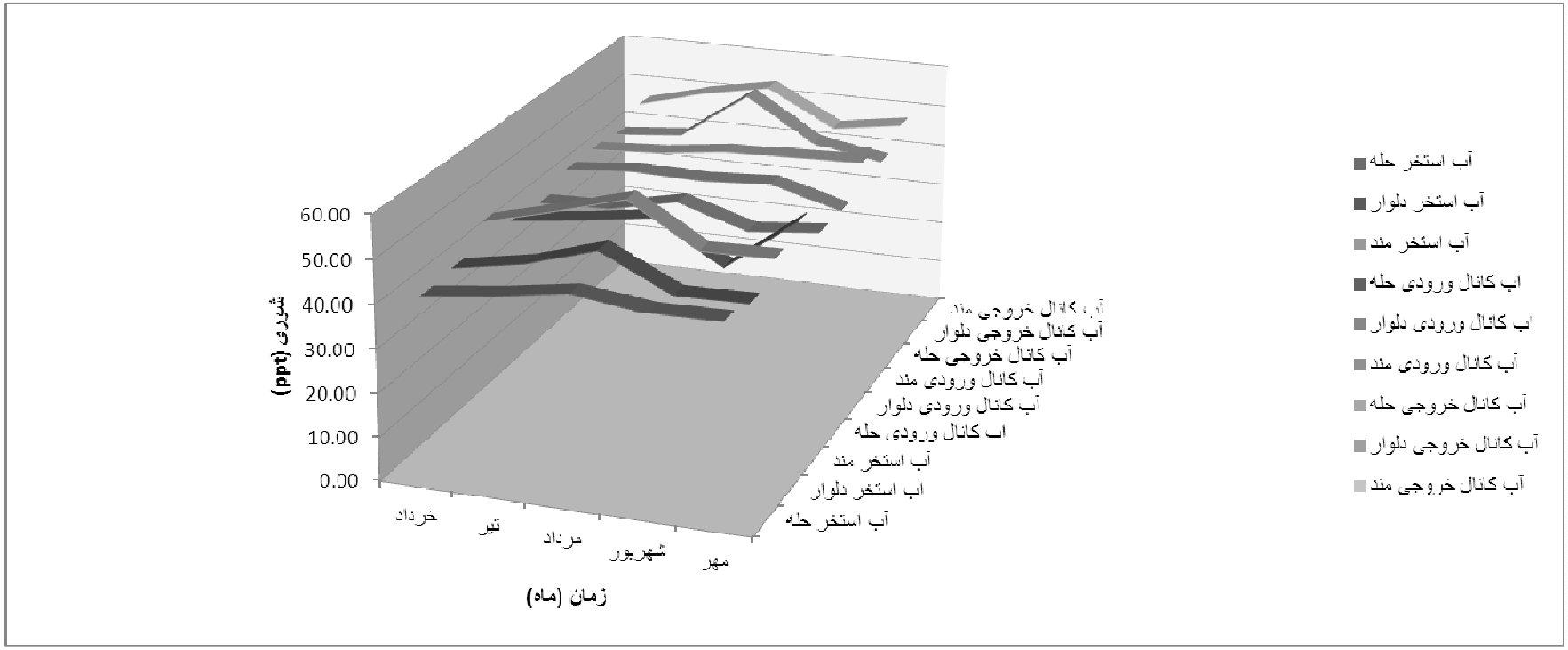
نمودار ۰-۱- میزان نوسانات دما در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه



نمودار ۰-۲- میزان نوسانات **pH** در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه



نمودار ۰-۳- میزان نوسانات هدایت الکتریکی آب در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه



نمودار ۰-۴- میزان نوسانات شوری آب در سایت های پرورش میگوی پا سفید استان بوشهر به تفکیک ماه

۴-۲- بیومتری میگوها

میگوهای مورد بررسی در محدوده وزنی (۱۷/۰۷-۰/۲۵)گرم بود و اندازه طول آن ها (۱۳/۷-۱/۲۱) سانتیمتر بود (جدول ۰-۲).

جدول ۰-۲- میانگین وزن و طول میگوهای نمونه برداری شده در طول دوره پرورش به تفکیک منطقه نمونه برداری – استان بوشهر ۱۳۸۹

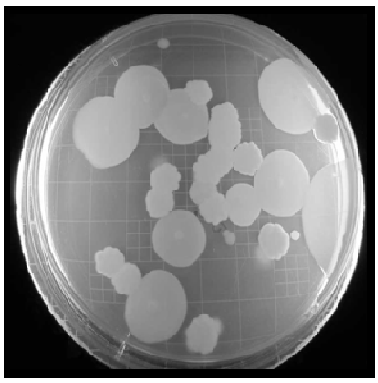
بیومتری	میانگین وزن (g)					میانگین طول (cm)				
مکان نمونه برداری	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر
حله	**0.38±0.02**	**3.2±0.05**	**5.75±0.06**	**16.04±0.10**	**17.07±0.12**	**1.2±0.04**	**5.13±0.04**	**9.17±0.06**	**12.65±0.12**	**13.13±0.11**
دلوار	**0.25±0.01**	**1.94±0.03**	**4.99±0.04**	**14.00±0.08**	**16.10±0.10**	**1.35±0.04**	**3.51±0.02**	**9.11±0.07**	**11.76±0.10**	**13.7±0.15**
مند	**0.35±0.02**	**2.83±0.05**	**3.84±0.03**	**8.31±0.06**	**14.18±0.09**	**1.76±0.05**	**4.6±0.03**	**7.32±0.07**	**9.43±0.09**	**12.9±0.11**

۴-۳- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری و شمارش کلی باکتری های خانواده ویبریوناسه

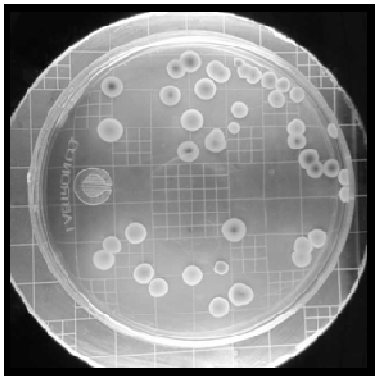
بر اساس نتایج شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری(HBPC) و شمارش کلی باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) نمونه های آب، رسوب و دستگاه گوارش میگو ها حداکثر فراوانیHBPC وVC به ترتیب در روده و هپاتوپانکراس میگو ها شمارش شد (نمودار ۰-۵).

بیشترین فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در روده میگو های منطقه حله در ماه مهر دیده شد که به ترتیب $۱۰^{۵}$CFU/g× (۳/۹±۰/۲۳) و $۱۰^{۵}$CFU/g×(۰/۷±۰/۰۶) و در هپاتوپانکراس میگوها $۱۰^{۵}$CFU /g× (۲/۸۲±۰/۲۶) و $۱۰^{۵}$CFU/g× (۰/۴۵۶±۰/۰۷)بود (جدول ۰-۳) و (نمودار ۰-۶). همانطور که در جداول مربوط به مناطق دلوار و مند نیزآورده شده است (جدول ۰-۳الی جدول

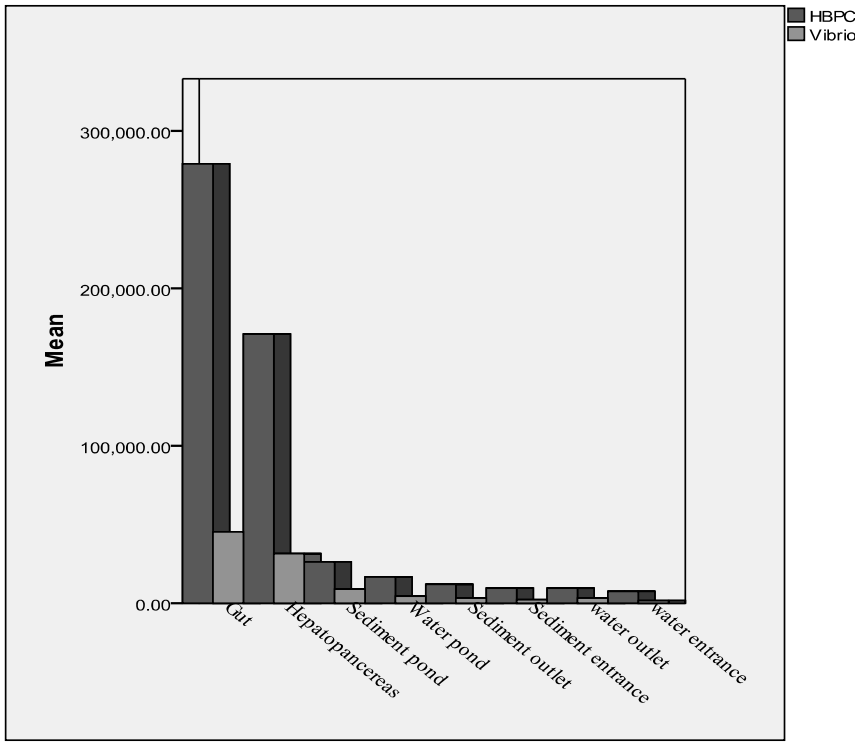
۰-۵) بیشترین فراوانی HBPC و VC در نمونه های دستگاه گوارش، آب و رسوب بررسی شده مربوط به مهرماه می باشد (نمودار ۰-۶ الی نمودار ۰-۱۱).



تصویر ۰-۱- نمایی از کلونی های رشد کرده در محیط **TSA** نمکی



تصویر ۰-۲- نمایی از کلونی های رشد کرده در محیط **TCBS**



نمودار ۰-۵- میانگین فراوانی **HBPC** و **VC** شمارش شده برحسب نمونه های مورد بررسی

جدول ۰-۳- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (**HBPC**) و باکتری های خانواده ویبریوناسه (**VC**) نمونه های دستگاه گوارش میگوی پا سفید– استان بوشهر ۱۳۸۹

شمارش کلی باکتری / مکان نمونه برداری		**HBPC CFU/g (×10^5)**					**VC CFU/g(×10^5)**				
		خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر
رودهٔ	حله	**2.82±0.22**	**2.59±0.21**	**2.61±0.21**	**2.82±0.45**	**3.9±0.23**	**0.25±0.02**	**0.32±0.03**	**0.35±0.02**	**0.37±0.027**	**0.7±0.06**
	دلوار	**2.1±0.64**	**2.55±0.71**	**2.77±0.22**	**2.86±0.22**	**3.76±0.26**	**0.14±0.02**	**0.15±0.02**	**0.21±0.02**	**0.22±0.029**	**0.32±0.03**
	مند	**1.03±0.08**	**2±0.109**	**2.95±0.31**	**3.22±0.32**	**3.87±0.74**	**0.24±0.001**	**0.45±0.003**	**0.83±0.04**	**1.05±0.16**	**1.13±0.12**
هپاتوپانکراس	حله	**1.75±0.225**	**1.85±0.15**	**1.98±0.2**	**2.08±0.04**	**2.82±0.26**	**0.18±0.01**	**0.31±0.02**	**0.34±0.06**	**0.34±0.02**	**0.45±0.07**
	دلوار	**1.5±0.54**	**1.6±0.566**	**1.60±0.17**	**1.72±0.03**	**1.87±0.08**	**0.08±0.00**	**0.10±0.004**	**0.16±0.03**	**0.18±0.01**	**0.22±0.02**
	مند	**0.58±0.03**	**0.94±0.23**	**1.53±0.22**	**1.78±0.24**	**2.01±0.85**	**0.02±0.001**	**0.18±0.003**	**0.47±0.03**	**0.63±0.030**	**1.01±0.04**

جدول ۰-۴- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (**HBPC**) و باکتری های خانواده ویبریوناسه (**VC**) نمونه های آب به تفکیک ماه– استان بوشهر ۱۳۸۹

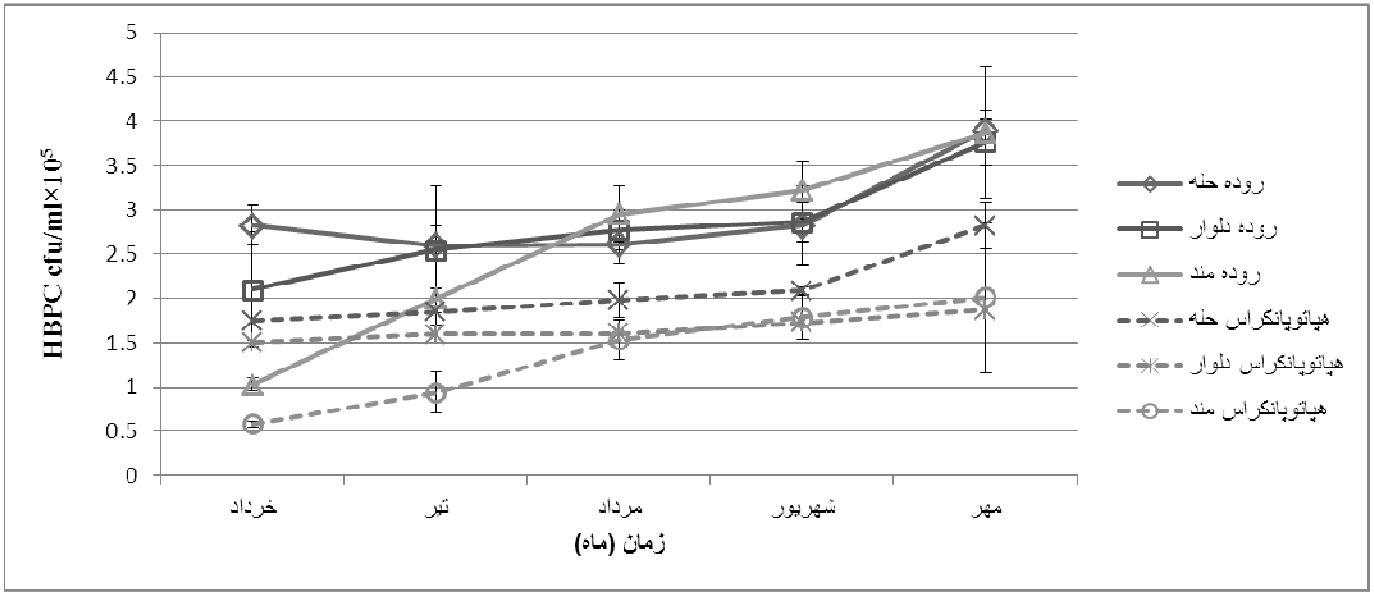
شمارش کلی باکتریایی		HBPC CFU/ml ($\times 10^4$)					VC CFU/ml($\times 10^4$)				
مکان نمونه برداری		خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر
آب استخر	حله	**0.12±0.07**	**0.20±0.02**	**0.40±0.1**	**1.21±0.13**	**2.4±0.06**	**0.03±0.002**	**0.08±0.002**	**0.11±0.02**	**0.28±0.09**	**1.23±0.018**
	دلوار	**0.87±0.03**	**1.06±0.03**	**1.81±0.14**	**3.04±0.19**	**5.3±0.25**	**0.31±0.0202**	**0.35±0.02**	**0.64±0.08**	**0.77±0.02**	**1.58±0.025**
	مند	**0.35±0.01**	**0.46±0.01**	**0.72±0.02**	**1.14±0.08**	**5.8±0.26**	**0.071±0.002**	**0.09±0.0036**	**0.11±0.01**	**0.27±0.02**	**0.63±0.022**
آب کانال ورودی	حله	**0.01±0.03**	**0.05±0.01**	**0.15±0.14**	**0.38±0.03**	**2.2±0.04**	**0.0032±0.002**	**0.011±0.005**	**0.036±0.002**	**0.08±0.005**	**0.14±0.02**
	دلوار	**0.25±0.06**	**0.28±0.07**	**0.34±0.07**	**0.46±0.09**	**0.57±0.1**	**0.15±0.053**	**0.19±0.05**	**0.22±0.06**	**0.31±0.07**	**0.36±0.01**
	مند	**0.12±0.002**	**0.29±0.01**	**0.34±0.01**	**0.56±0.07**	**5.04±0.43**	**0.21±0.011**	**0.34±0.02**	**0.39±0.02**	**0.49±0.01**	**6.26±0.47**
نال	حله	**0.017±0.03**	**0.05±0.03**	**0.18±0.06**	**0.45±0.06**	**2.27±0.21**	**0.004±0.002**	**0.0099±0.07**	**0.04±0.004**	**0.25±0.02**	**0.84±0.03**

	دلوار	0.49±0.09	0.55±0.10	0.66±0.10	0.83±0.12	1.1±0.14	0.38±0.08	0.42±0.08	0.54±0.1	0.59±0.10	0.68±0.01
	مند	0.21±0.01	0.34±0.02	0.38±0.02	0.49±0.01	6.2±0.47	0.06±0.001	0.07±0.004	0.08±0.04	0.15±0.02	0.59±0.04

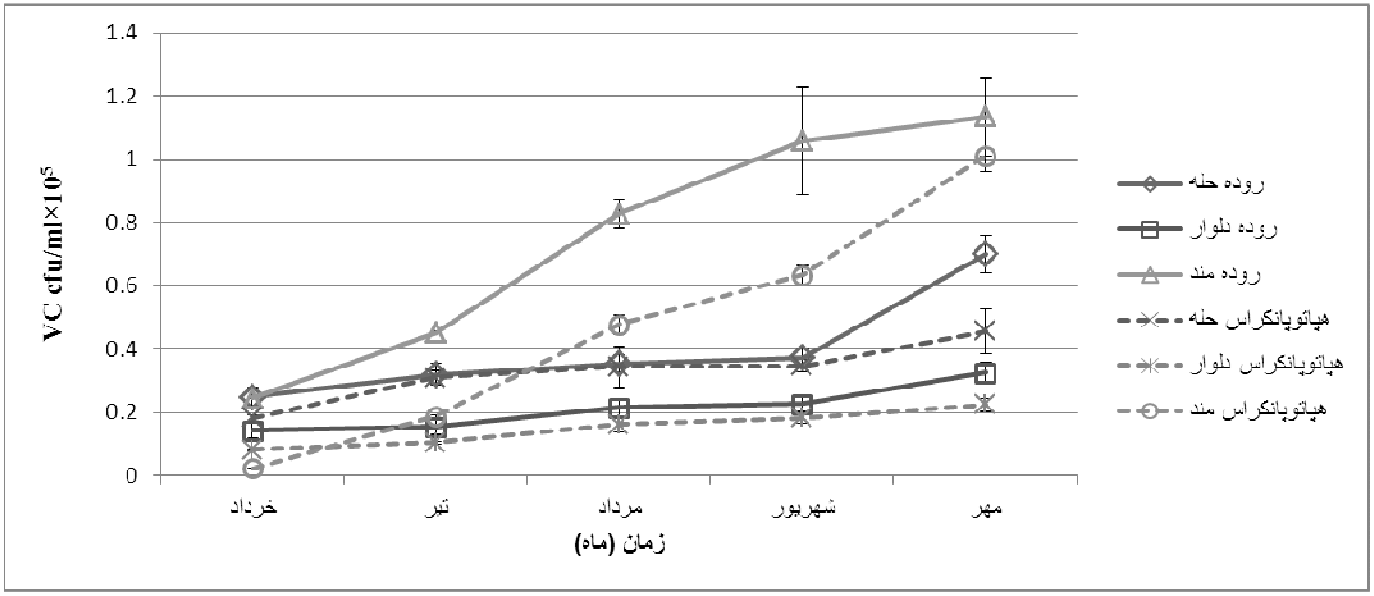
جدول ۰-۵- شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (**HBPC**) و باکتری های خانواده ویبریوناسه (**VC**) نمونه های رسوب به تفکیک ماه– استان بوشهر ۱۳۸۹

شمارش کلی باکتریایی		HBPC CFU/ml ($\times 10^4$)					VC CFU/ml($\times 10^4$)				
مکان نمونه برداری		خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر
رسوب استخر	حله	0.21±0.03	0.50±0.04	0.59±0.04	2.96±0.19	5.8±0.38	0.05±0.008	0.19±0.04	0.21±0.01	0.84±0.04	1.09±0.11
	دلوار	1.46±0.13	1.36±0.13	3.14±0.23	3.82±0.21	8.06±1.03	0.40±0.07	0.48±0.07	1.10±0.13	1.22±0.12	3.47±0.20
	مند	0.72±0.02	0.88±0.02	1.3±0.15	2.62±0.21	5.88±0.32	0.28±0.001	0.34±0.008	0.51±0.01	0.98±0.06	2.01±0.01
رسوب کانال ورودی	حله	0.05±0.01	0.15±0.04	0.16±0.07	1.7±0.11	4.7±0.41	0.013±0.006	0.003±0.0001	0.064±0.005	0.26±0.02	0.42±0.07
	دلوار	0.15±0.05	0.20±0.06	0.3±0.07	1.01±0.19	2.25±0.20	0.05±0.02	0.07±0.03	0.08±0.03	0.09±0.04	0.92±0.13

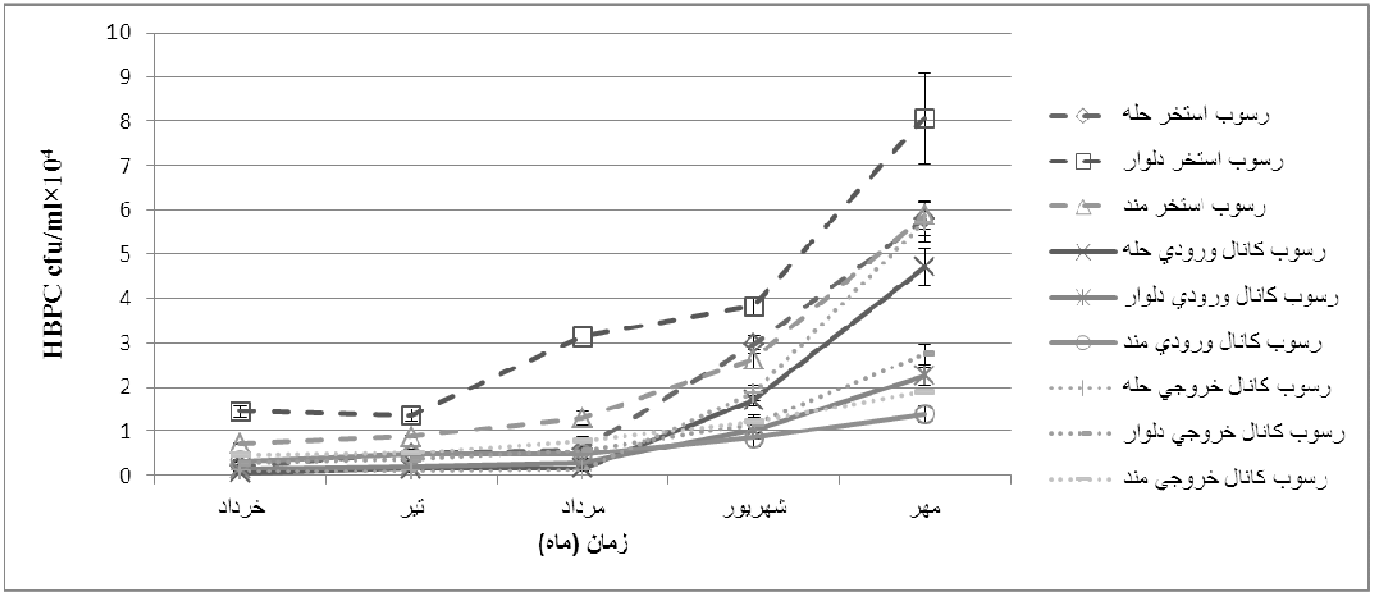
	مند	**0.33±0.02**	**0.47±0.13**	**0.49±0.13**	**0.86±0.2**	**1.39±0.18**	**0.02±0.001**	**0.15±0.07**	**0.19±0.07**	**0.28±0.06**	**0.45±0.004**
رسوب کانال خروجی	حله	**0.11±0.01**	**0.11±0.06**	**0.12±0.02**	**1.86±0.18**	**5.73±0.45**	**0.006±0.0002**	**0.09±0.006**	**0.12±0.01**	**0.36±0.01**	**0.53±0.02**
	دلوار	**0.29±0.07**	**0.36±0.08**	**0.56±0.10**	**1.16±0.20**	**2.74±0.22**	**0.07±0.03**	**0.17±0.05**	**0.25±0.06**	**0.45±0.09**	**1.00±0.13**
	مند	**0.45±0.02**	**0.52±0.08**	**0.78±0.08**	**1.23±0.07**	**1.89±0.03**	**0.18±0.001**	**0.23±0.05**	**0.35±0.01**	**0.42±0.02**	**0.51±0.05**



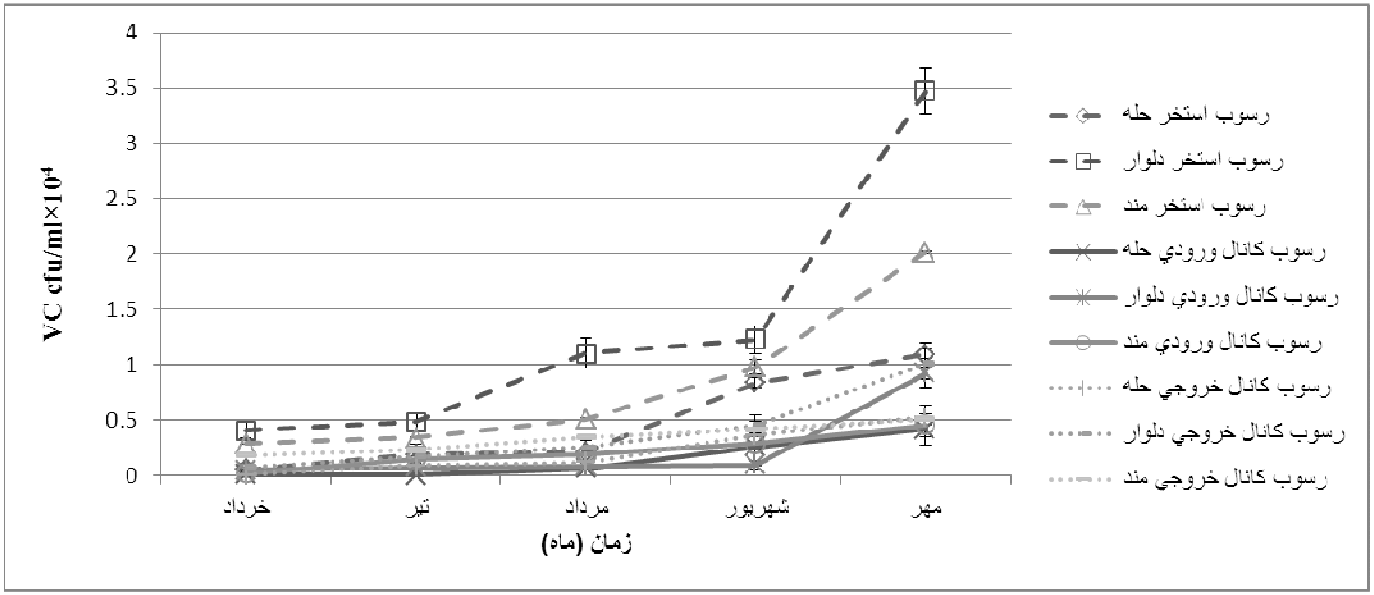
نمودار ۰-۶- روند تغییرات تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (**HBPC**) در دستگاه گوارش میگوی پرورشی سفید غربی – بوشهر ۱۳۸۹



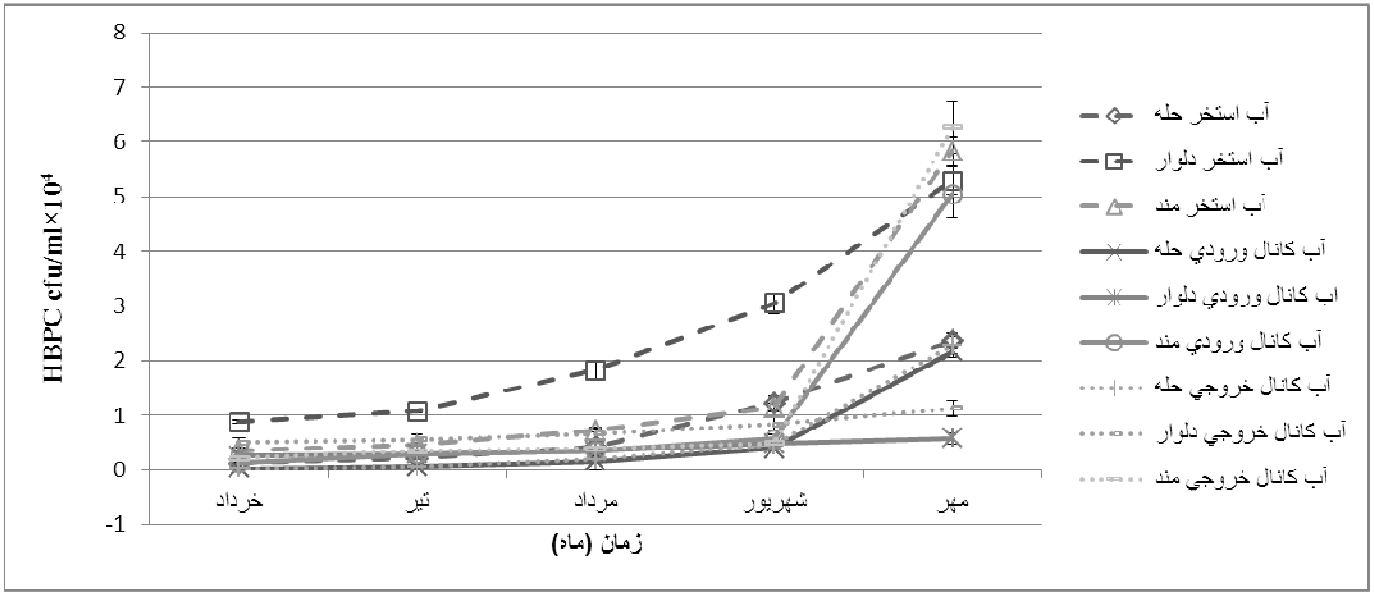
نمودار ۰-۷- روند تغییرات تعداد کل باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) در دستگاه گوارش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹



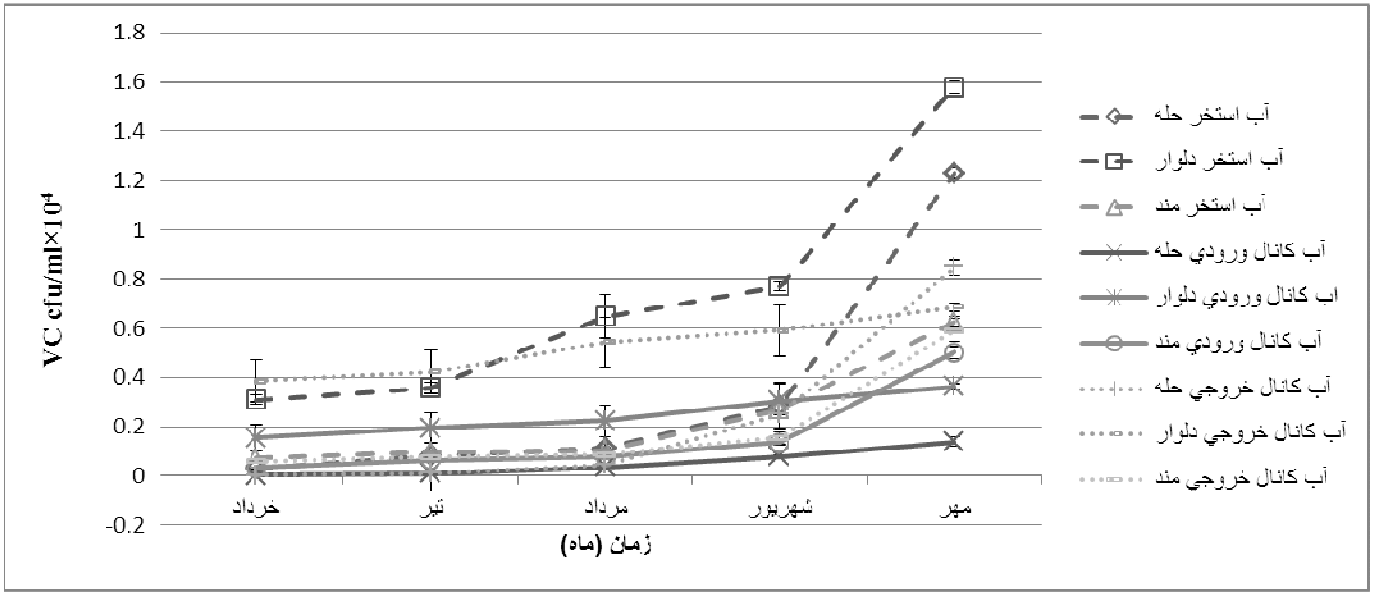
نمودار ۰-۸- روند تغییرات تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (**HBPC**) در رسوبات استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی –بوشهر ۱۳۸۹



نمودار ۰-۹- روند تغییرات تعداد کل باکتری های خانواده ویبریوناسه (VC) در رسوبات استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹



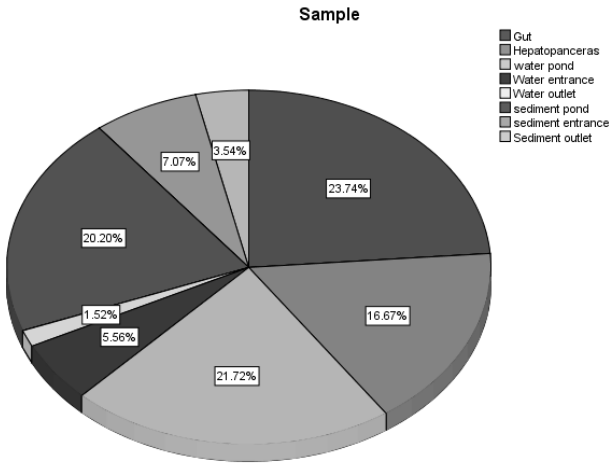
نمودار ۱۰-۰- روند تغییرات تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (**HBPC**) در آب استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی -بوشهر ۱۳۸۹



نمودار ۰-۱۱- روند تغییرات تعداد کل باکتری های خانواده ویبریوناسه (**VC**) در آب استخر، کانال ورودی و کانال خروجی محل پرورش میگوی پرورشی سفید غربی - بوشهر ۱۳۸۹

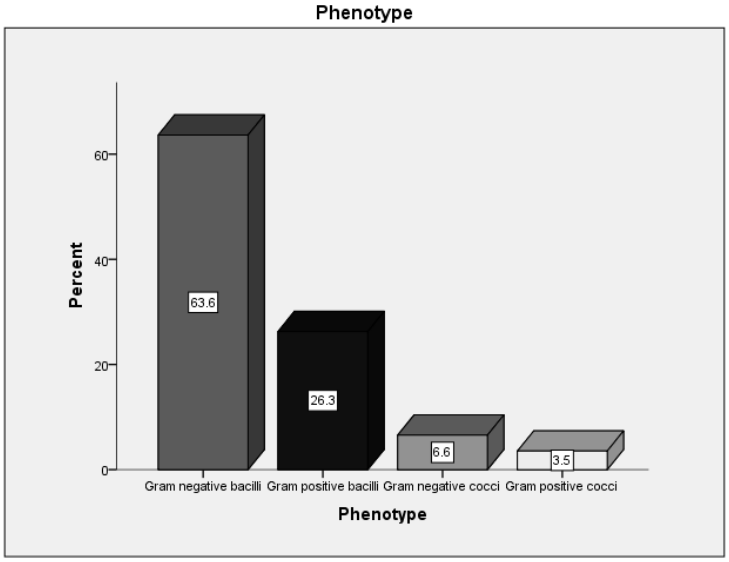
۴-۴- خالص سازی، شناسایی اولیه ونگهداری سویه های باکتری ها

از ۲۷۰ نمونه آب و رسوب (استخر، کانال ورودی، کانال خروجی) و ۳۰۰ نمونه دستگاه گوارش (روده و هپاتوپانکراس) میگو در مجموع بر اساس کلونی های غالب در هر کشت، ۱۹۸ سویه باکتریایی جداسازی و خالص سازی شددر نمودار ۰-۱۲ درصد فروانی باکتری های جداسازی شده بر اساس محل جداسازی آورده شده است. بیشترین نمونه های جداسازی شده به ترتیب از دستگاه گوارش (٪۴۰/۴۳)، رسوب (٪۳۰/۸۱) و آب (٪۲۸/۸۰) بودند (نمودار ۰-۱۲).



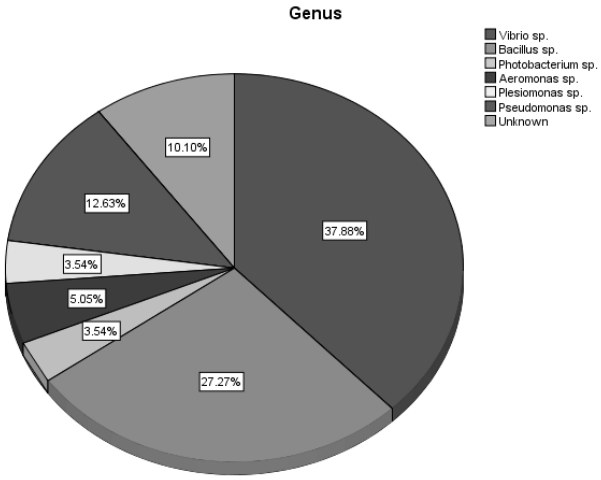
نمودار ۰-۱۲- درصد فراوانی سویه های باکتریایی جداسازی شده از آب، رسوب و دستگاه گوارش میگو

بر اساس رنگ آمیزی گرم باکتری های جداسازی شده شامل اشکال باسیل گرم منفی، باسیل گرم مثبت، کوکسی گرم منفی و کوکسی گرم مثبت بود (نمودار ۰-۱۳).



نمودار ۰-۱۳- درصد فراوانی باکتری های جداسازی شده از نظر مرفولوژی

با استفاده از تست های بیوشیمیایی سویه های باکتریایی جداسازی شده در حد جنس شناسایی شدند که بیشترین فراوانی مربوط به جنس *Vibrio* sp. (۳۷/۸۸٪) و *Bacillus sp.* (۲۷/۲۷٪) بود و کمترین آن متعلق به جنس های *Photobacterium* sp. و *Plesiomonas* sp. بود (نمودار ۰-۱۴).



نمودار ۰-۱۴- درصد فراوانی باکتری های جداسازی شده در حد جنس

آزمایشات برون تن

۴-۵- اثر ضد میکروبی مواد ممانعت کننده از رشد (**Bioassay**) بر روی باکتری پاتوژن میگو

۴-۵-۱- غربالگری اولیه

بر اساس نتایج حاصل از غربالگری اولیه باکتری های جداسازی شده، ۱۴ سویه دارای اثر ممانعت کننده رشد و آنتاگونیستی علیه *V. harveyi* پس از ۷۲ ساعت بودند (جدول ۰-۶، جدول ۰-۷) و (تصویر ۰-۳) البته برخی از باکتری ها نیز دارای اثر ممانعت کننده رشد بر روی *V. harveyi* بودند اما این اثر را تا ۷۲ ساعت حفظ نمی کردند (جدول ۰-۹).

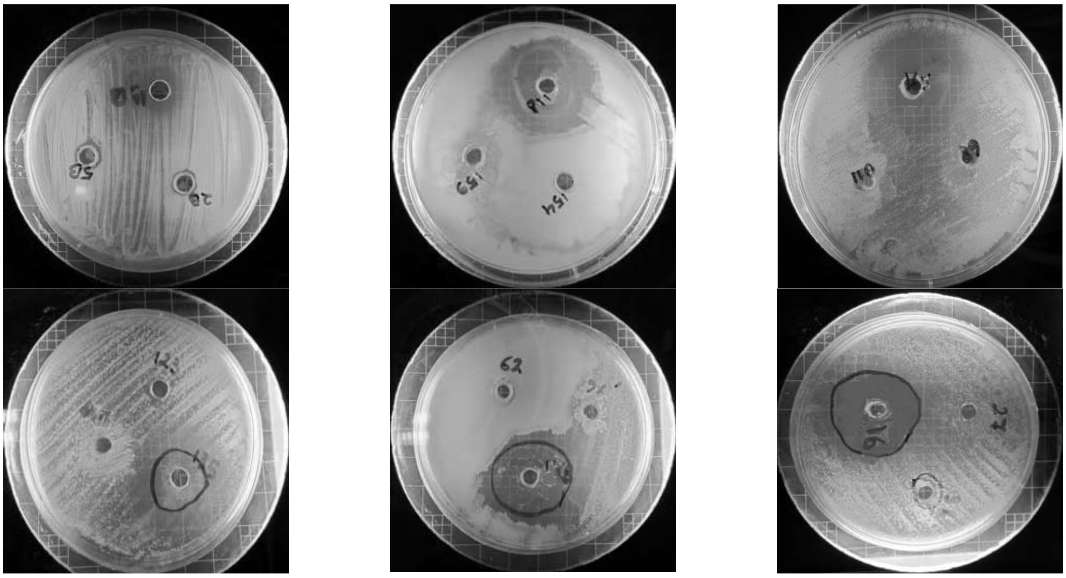
جدول ۰-۶- فراوانی باکتری های دارای اثر ممانعت کننده رشد بر روی ***V. harveyi*** پس از زمان های مختلف

هاله عدم رشد	منفی		مثبت	
زمان	فراوانی	درصد فراوانی	فراوانی	درصد فراوانی
۱۸ ساعت	۱۸۵	۹۳/۴	۱۳	۶/۶
۳۶ ساعت	۱۸۰	۹۰/۹	۱۸	۹/۱
۵۴ ساعت	۱۸۲	۹۱/۹	۱۶	۸/۱
۷۲ ساعت	۱۸۴	۹۲/۹	۱۴	۷/۱

جدول ۰-۷- باکتری های انتخابی از غربالگری اولیه

ردیف	کد باکتری	IZ*18h	IZ 36h	IZ 54h	IZ 72h	قطر هاله عدم رشد پس از ۵۴ ساعت	قطر هاله عدم رشد پس از ۷۲ ساعت
۱	**J069**	−	−	+	+	**17.52**	**17.52**
۲	**Ju 085**	−	+	+	+	**20.42**	**24.28**
۳	**Ju 100**	−	+	+	+	**22.91**	**22.91**
۴	**Ju 102**	−	+	+	+	**24.11**	**29.5**
۵	**Ju 104**	−	+	+	+	**11.23**	**11.23**
۶	**Ju 105**	+	+	+	+	**22.2**	**22.2**
۷	**Ju 112**	−	+	+	+	**17.03**	**20.62**
۸	**A 135**	−	+	+	+	**22.58**	**22.58**
۹	**A 138**	−	+	+	+	**30.41**	**30.41**
۱۰	**S 144**	−	+	+	+	**16.0**	**16.03**
۱۱	**S 147**	+	−	+	+	**26.14**	**26.14**

۱۲	**S 162**	–	–	+	+	**26.63**	**26.63**
۱۳	**S 165**	+	–	+	+	**27.7**	**27.7**
۱۴	**S 169**	–	+	+	+	**18.08**	**26.20**



تصویر ۰-۳- نمایی از غربالگری اولیه باکتری های جداسازی شده بر روی باکتری *V. harveyi*

غربالگری ثانویه

از میان ۱۴ سویه باکتریایی که دارای اثر آنتاگونیستی بر روی باکتری *V. harveyi* بودند، براساس انـدازه ی قطر هاله عدم رشد، ماندگاری اثر ضد میکروبی و رشد آسان، دوبـاکتری Ju102 و S169 انتخـاب شـدند (جـدول ۰-۸) که مورد شناسایی مولکولی و آزمایشات برون تن و درون تن قرارگرفتند.

جدول ۰-۸- باکتری های منتخب از غربالگری ثانویه

ردیف	کد باکتری	قطر هاله عدم رشد پس از ۷۲ ساعت بزرگتر از ۲۰ mm [۱]	پایداری هاله عدم رشد پس از ۱ هفته [۲]	نگهداری آسان		جمع امتیازات
				بقای باکتری در دمای ۸-۴ °C [۳]	بقای باکتری در دمای -۲۰ °C [۴]	
۱	J069	<۲۰ mm	_	_	+	۳
۲	Ju 085	24.28	_	+	+	۵
۳	Ju 100	22.91	_	+	+	۵
۴	Ju 102[۷۷]	29.5	+	+	+	۸
۵	Ju 104	<۲۰ mm	_	+	+	۴
۶	Ju 105	22.2	_	+	+	۵
۷	Ju 112	20.62	_	+	+	۴
۸	A 135	22.58	+	+	+	۷
۹	A 138	30.41	+	_	+	۷
۱۰	S 144	<۲۰ mm	_	+	+	۴
۱۱	S 147	26.14	_	+	+	۵
۱۲	S 162	26.63	_	+	+	۶
۱۳	S 165	27.7	_	_	+	۵
۱۴	S 169[۷۸]	26.20	+	+	+	۸

[۷۷] پس از شناسایی مولکولی سویه IS03 نامگذاری شد.

[1]امتیاز(۳)، [2] امتیاز (۲)، [3]امتیاز(۲)، [4]امتیاز(۲)

قطر هاله عدم رشد پس از ۷۲ ساعت کمتر از mm ۲۰امتیاز ۱، قطر هاله عدم رشد پس از ۷۲ ساعت < ۲۵امتیاز ۲، قطر هاله عدم رشد پس از ۷۲ ساعت بزرگتر از mm ۲۵امتیاز ۳، بقای باکتری در دمای $^{\circ}C$ ۸-۴ امتیاز ۱، بقای باکتری در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- امتیاز ۲

[*]هاله عدم رشد

[۷۸] پس از شناسایی مولکولی سویه IS02 نامگذاری شد.

جدول ۰-۹- نتایج حاصل از غربالگری ۱۹۸ ایزوله باکتریایی بر روی ***V.harveyi*** به روش انتشار آگار در چاهک

کد باکتری	مکان	نمونه	تاریخ	رنگ آمیزی گرم	جنس	IZ* 18h	IZ 36h	IZ 54h	IZ 72h	قطر هاله عدم رشد پس از ۵۴ ساعت	قطر هاله عدم رشد پس از ۷۲ ساعت
M 001	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 002	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 003	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 004	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 005	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 006	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 007	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 008	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 009	حله	روده	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 010	حله	رسوب کانال ورودی	خرداد	Gram negative cocci	*unknown*	–	–	–	–	0	0
M 011	حله	رسوب کانال	خرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus* sp.	–	–	–	–	0	0

		ورودی									
M 012	حله	آب استخر	خرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus* sp.	–	–	–	–	0	0
M 013	حله	آب استخر	خرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus* sp.	–	–	–	–	0	0
M 014	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 015	حله	آب استخر	خرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus* sp.	–	–	–	–	0	0
M 016	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 017	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 018	حله	آب استخر	خرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus* sp.	–	–	–	–	0	0
M 020	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 021	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 022	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Plesiomonas* sp.	–	–	–	–	0	0
M 023	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 024	حله	آب استخر	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 025	حله	آب کانال ورودی	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 026	حله	آب کانال ورودی	خرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio* sp.	–	–	–	–	0	0
M 027	حله	رسوب	خرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus* sp.	–	–	–	–	0	0

		استخر									
J019	حله	آب استخر	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
J028	دلوار	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J029	دلوار	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	–	–	–	–	0	0
J030	دلوار	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	–	–	–	–	0	0
J031	دلوار	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	–	–	–	–	0	0
J032	دلوار	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J033	دلوار	آب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0
J034	دلوار	آب استخر	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J035	دلوار	آب استخر	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J036	دلوار	آب استخر	تیر	Gram positive cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
J037	دلوار	روده	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	+	–	–	–	0	0
J038	مند	آب استخر	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
J039	مند	آب استخر	تیر	Gram negative cocci	*Unknown.*	–	–	–	–	0	0

J040	حله	رسوب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	−	−	0	0
J041	حله	روده	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	−	21.15	0
J042	حله	رسوب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J043	حله	رسوب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J044	حله	رسوب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	−	−	0	0
J045	حله	رسوب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J046	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J047	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J048	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J049	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0

J050	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J051	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J052	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J053	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	−	−	−	−	0	0
J054	حله	روده	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J055	حله	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	+	−	−	−	0	0
J056	حله	روده	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J057	حله	روده	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J058	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J059	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J060	حله	روده	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	+	−	11.74	0
J061	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	−	−	−	−	0	0
J062	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0

J063	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
J064	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
J065	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J066	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J067	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J068	حله	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Plesiomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
J069	حله	رسوب کانال ورودی	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	+	+	17.52	17.52
J070	حله	رسوب کانال ورودی	تیر	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	–	–	–	–	0	0
J071	حله	آب استخر	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
J072	حله	آب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0
J073	حله	آب استخر	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J074	حله	آب استخر	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
J075	حله	آب استخر	تیر	Gram positive cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
J076	حله	آب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0

J077	حله	آب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J078	حله	آب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J079	حله	آب استخر	تیر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
J080	حله	آب استخر	تیر	Gram negative cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J081	حله	آب استخر	تیر	Gram positive cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J181	حله	رسوباستخر	تیر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
J182	حله	رسوباستخر	تیر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
J183	مند	روده	تیر	Gram positive cocci	*Unknown*	−	−	−	−	0	0
J184	مند	روده	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J185	مند	هپاتوپانکراس	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J186	دلوار	رسوباستخر	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
J187	دلوار	رسوباستخر	تیر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju082	حله	آب استخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	+	+	−	−	0	0
Ju 083	حله	آب استخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 084	حله	آب کانال ورودی	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 085	حله	آب کانال	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	20.42	24.28

		ورودی									
Ju 086	حله	رسوب استخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 087	دلوار	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Plesiomonas sp.*	+	–	–	–	0	0
Ju 088	دلوار	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Plesiomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 089	دلوار	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 090	دلوار	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 091	دلوار	روده	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 092	دلوار	آب استخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 093	دلوار	آب استخر	مرداد	Gram positive cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
Ju 094	دلوار	آب استخر	مرداد	Gram positive cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0
Ju 095	دلوار	آب استخر	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 096	دلوار	روده	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0
Ju 097	مند	آب استخر	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0

Ju 098	مند	آب استخر	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 099	حله	رسوب کانال خارجی	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 100	حله	رسوب کانال ورودی	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	22.91	22.91
Ju 101	حله	آب کانال ورودی	مرداد	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 102	حله	رسوب استخر	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	24.11	29.5
Ju 103	حله	رسوب استخر	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 104	حله	رسوب استخر	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	11.23	11.23
Ju 105	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	+	+	+	+	22.2	22.2
Ju 106	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0

Ju 107	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	+	+	−	−	0	0
Ju 108	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 109	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 110	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram negative bacilli	*Plesiomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 111	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 112	حله	هپاتوپانکراس	مرداد	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	17.03	20.62
Ju 170	حله	رسوب استخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 171	حله	رسوب استخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 172	حله	آب کانال ورودی	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 173	حله	آب کانال	مرداد	Gram negative bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0

		ورودی									
Ju 174	حله	روده	مرداد	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 188	دلوار	رسوباستخر	مرداد	Gram positivebacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 189	دلوار	رسوباستخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 190	دلوار	رسوباستخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 191	دلوار	رسوباستخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 192	مند	رسوباستخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
Ju 193	مند	رسوباستخر	مرداد	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
A 113	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
A 114	حله	هپاتوپانکراس	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
A 115	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
A 116	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	−	−	−	−	0	0
A 117	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
A 118	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	+	+	−	−	0	0
A 119	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
A 120	حله	رسوب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	−	−	−	−	0	0

A 121	حله	رسوب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 122	حله	رسوب استخر	شهریور	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	–	–	–	–	0	0
A 123	حله	رسوب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
A 124	حله	آب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 125	حله	آب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Plesiomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
A 126	حله	آب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	–	–	–	–	0	0
A 127	حله	آب کانال خروجی	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
A 128	حله	آب کانال خروجی	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
A 129	حله	رسوب کانال خارجی	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
A 130	حله	رسوب کانال خارجی	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0

A 131	حله	رسوب استخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
A 132	حله	آب کانال خروجی	شهریور	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	−	−	−	−	0	0
A 133	حله	آب کانال ورودی	شهریور	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
A 134	حله	آب کانال ورودی	شهریور	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
A 135	حله	رسوب کانال ورودی	شهریور	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	22.58	22.58
A 136	حله	رسوب کانال ورودی	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	+	−	−	−	0	0
A 137	حله	رسوب کانال ورودی	شهریور	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
A 138	حله	رسوب کانال	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	+	+	+	30.41	30.41

		ورودی									
A 140	حله	رسوب کانال ورودی	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 141	مند	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	–	–	–	–	0	0
A 175	حله	روده	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 176	حله	هپاتوپانکراس	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 177	حله	هپاتوپانکراس	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 178	حله	رسوب کانال خارجی	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 179	حله	رسوباستخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
A 180	حله	رسوباستخر	شهریور	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
S 139	حله	رسوب کانال ورودی	مهر	Gram negative bacilli	*Plesiomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
S 142	مند	روده	مهر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	–	–	–	–	0	0

S 143	مند	روده	مهر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	–	–	–	–	0	0
S 144	مند	هپاتوپانکراس	مهر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	+	+	+	16.0	16.03
S 145	مند	هپاتوپانکراس	مهر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
S 146	مند	آب کانال ورودی	مهر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
S 147	مند	رسوب کانال ورودی	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	+	–	+	+	26.14	26.14
S 148	دلوار	روده	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	+	–	–	–	0	0
S 149	دلوار	روده	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	+	–	–	–	0	0
S 150	دلوار	روده	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
S 151	دلوار	روده	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
S 152	دلوار	روده	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
S 153	دلوار	روده	مهر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	–	–	–	–	0	0
S 154	دلوار	هپاتوپانکراس	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	–	–	–	–	0	0
S 155	دلوار	آب استخر	مهر	Gram positive cocci	*Unknown*	–	–	–	–	0	0

S 156	دلوار	آب استخر	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
S 157	دلوار	رسوب استخر	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
S 158	دلوار	رسوب کانال خارجی	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
S 159	دلوار	رسوب کانال ورودی	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
S 160	دلوار	آب کانال ورودی	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	+	−	−	−	0	0
S 161	حله	رسوب استخر	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
S 162	حله	رسوب استخر	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	+	+	26.63	26.63
S 163	مند	رسوب استخر	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
S 164	حله	رسوب استخر	مهر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	−	−	−	−	0	0

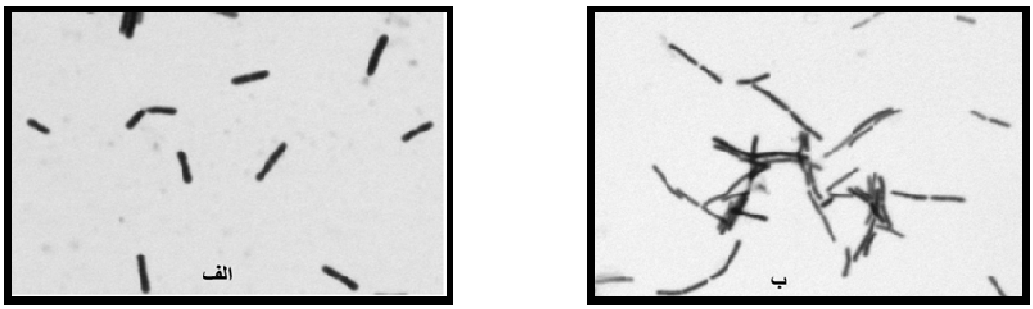
S 165	حله	رسوب استخر	مهر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	+	−	+	+	27.7	27.7
S 166	مند	رسوب کانال خارجی	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0
S 167	مند	هپاتوپانکراس	مهر	Gram negative bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
S 168	حله	رسوب کانال خارجی	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	−	−	−	0	0
S 169	حله	روده	مهر	Gram positive bacilli	*Bacillus sp.*	−	+	+	+	18.08	26.20
S 194	مند	رسوب استخر	مهر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
S 195	مند	رسوباستخر	مهر	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	−	−	−	−	0	0
S 196	مند	رسوب استخر	مهر	Gram negative bacilli	*Photobacterium sp.*	−	−	−	−	0	0
S 197	مند	رسوب استخر	مهر	Gram negative bacilli	*Aeromonas sp.*	−	−	−	−	0	0
S 198	مند	رسوب	مهر	Gram negative bacilli	*Vibrio sp.*	−	−	−	−	0	0

		استخر									

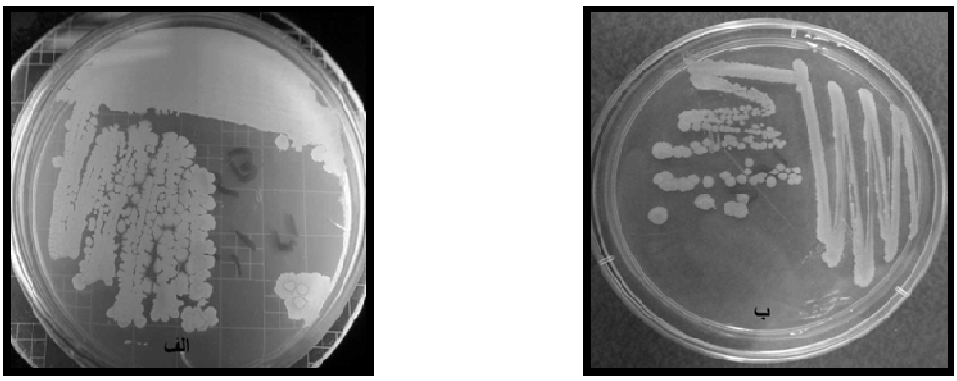
*هاله عدم رشد

۴-۶- شناسایی مولکولی باکتری های انتخابی

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز 16S rDNA باکتری های S 169 وJu 102 با استفاده از نـرم افـزار Blast و EZ taxon هر دو باکتری متعلق به شـاخه Firmicutes خـانواده باسیلاسـه و جـنس باسـیلوس بودنـد کـه بـاکتری S 169 دارای ۱۰۰ درصد مشابهت با باکتری *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* BGSC 3A28(T) بود و با نام *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* strain IS02 در بانـک جهـانی ژن بـا کـد GenBank: JN856456.1 ثبـت شـد همچنـین باکتری Ju 102 دارای ۹۹/۸۱۳ درصد مشابهت با باکتری *Bacillus vallismotis* DSM11031(T) بود که با نام *Bacillus vallismotis* IS03 در بانک جهانی ژن با کد GenBank: JQ085958.1 ثبت شد(تصویر ۰-۴ و تصویر ۰-۵).



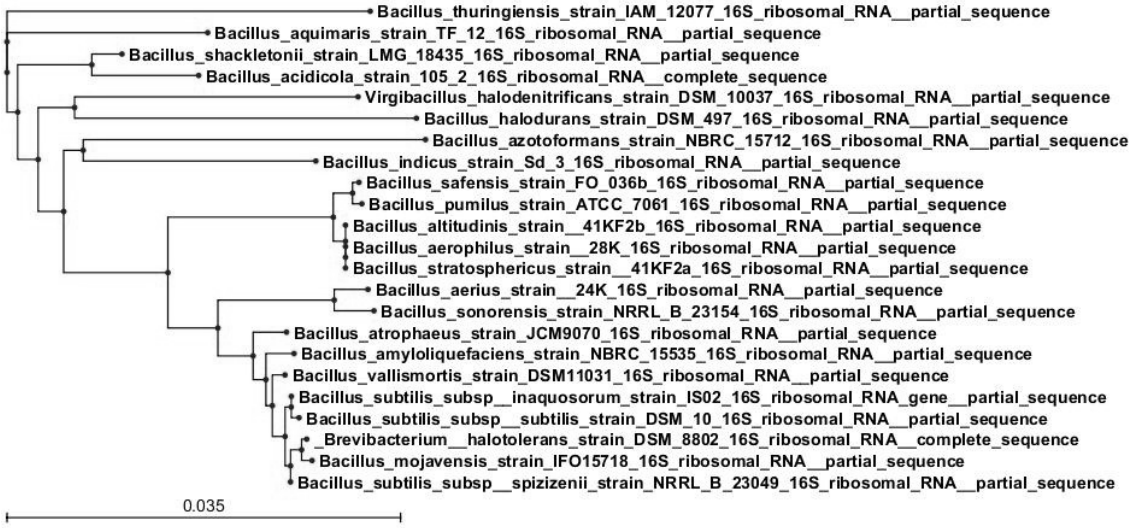
تصویر ۰-۴- رنگ آمیزی گرم کشت ۲۴ ساعته باکتری الف) **IS02** و ب) **IS03**



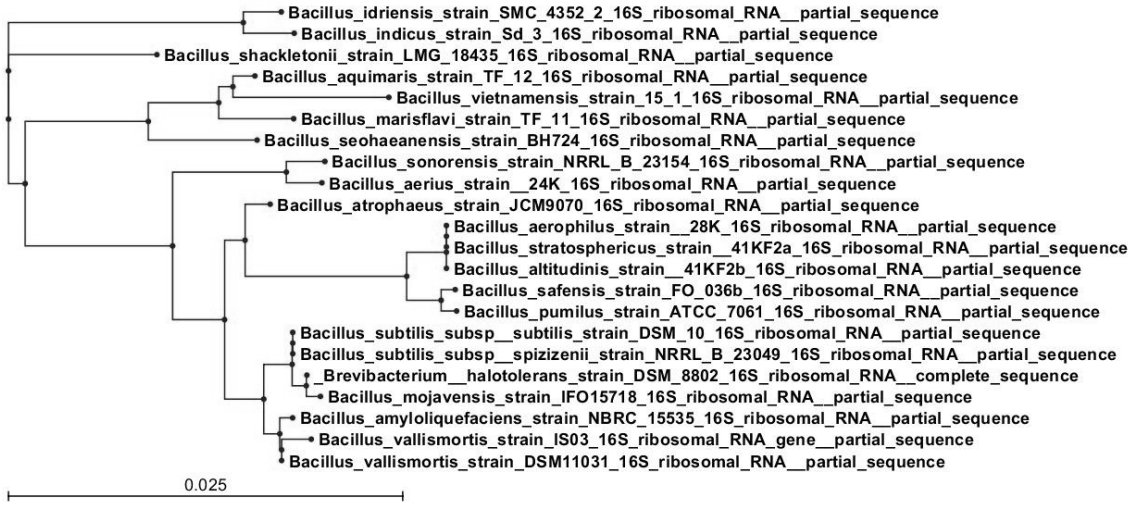
تصویر ۰-۵- نمایی از کلونی های باکتری الف) **IS02** و ب) **IS03**

۴-۷- درخت فیلوژنی باکتری های S 169 (IS02) وJu 102 (IS03)

با استفاده از نرم افزار Distance tree of results، CLC Sequence Viewer 6 و روش Neighbor Joining درخت فیلوژنی باکتری های S 169 و Ju 102 به فرم Rectangle رسم شد (تصویر ۰-۶، تصویر ۰-۷).



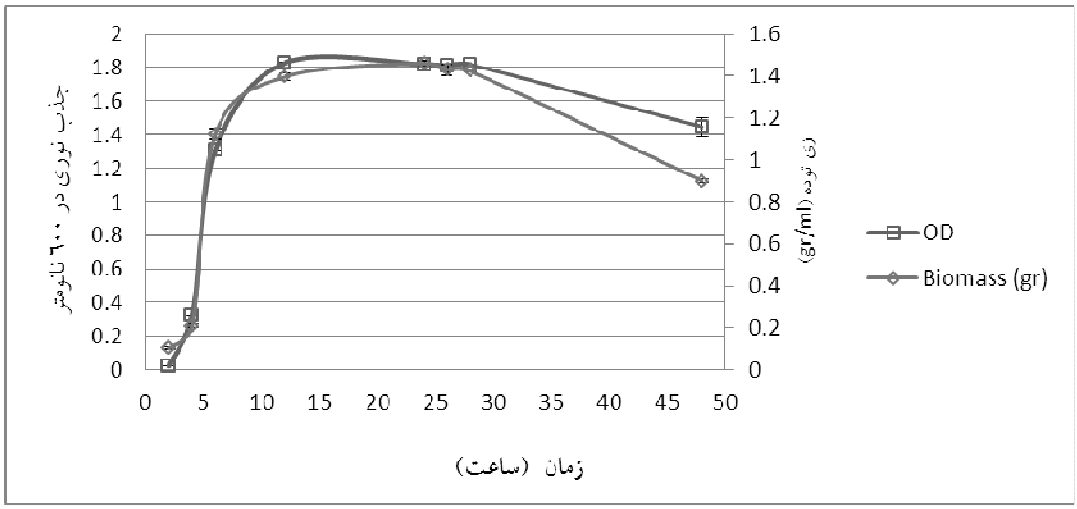
تصویر ۰-۶- درخت فیلوژنی باکتری *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain* IS02 به فرم Rectangle



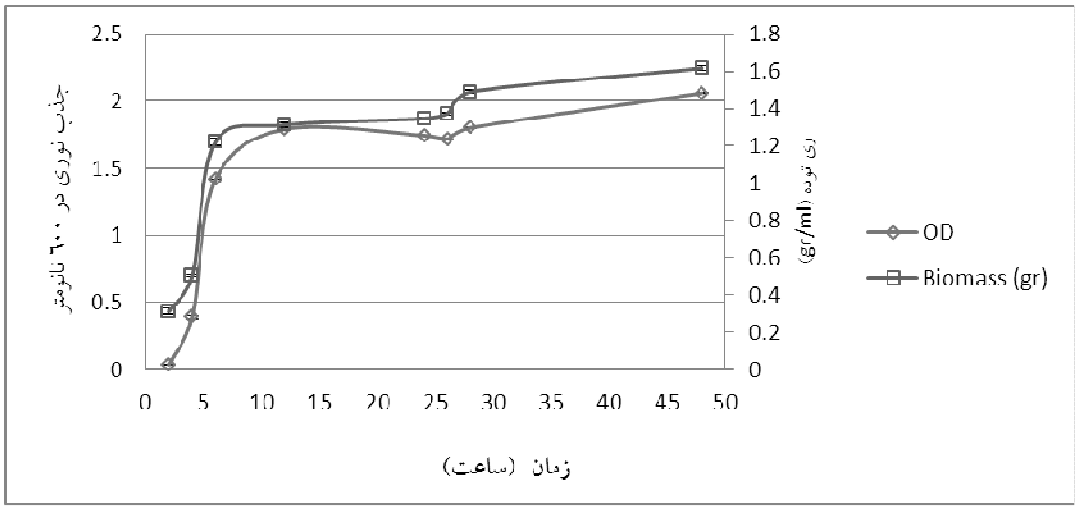
تصویر ۰-۷- درخت فیلوژنی باکتری *Bacillus vallismotis* IS03 به فرم Rectangle

۴-۸- سینتیک رشد و زی توده باکتری های انتخابی

بیشترین میزان زی توده باکتری IS02 ۲۸ ساعت پس از کشت و در باکتری IS03 ۵۰ ساعت پس از کشت بود. بر اساس آزمون همبستگی در باکتری IS02 همبستگی قوی بین زمان و زی توده باکتریایی (r =۰/۵۸۱) و همچنین میزان زی توده باکتریایی و جذب نوری (r =۰/۸۸۰) وجود دارد. در باکتری IS03 نیز همبستگی قوی بین زمان و زی توده باکتریایی (r =۰/۸۲۸) و همچنین بین میزان زی توده باکتریایی و میزان رشد باکتری ها (r =۰/۹۹۴) وجود دارد (نمودار ۰-۱۵، نمودار ۰-۱۶).



نمودار ۰-۱۵- نمودار رشد و توده زیستی باکتری **IS02** بر حسب زمان



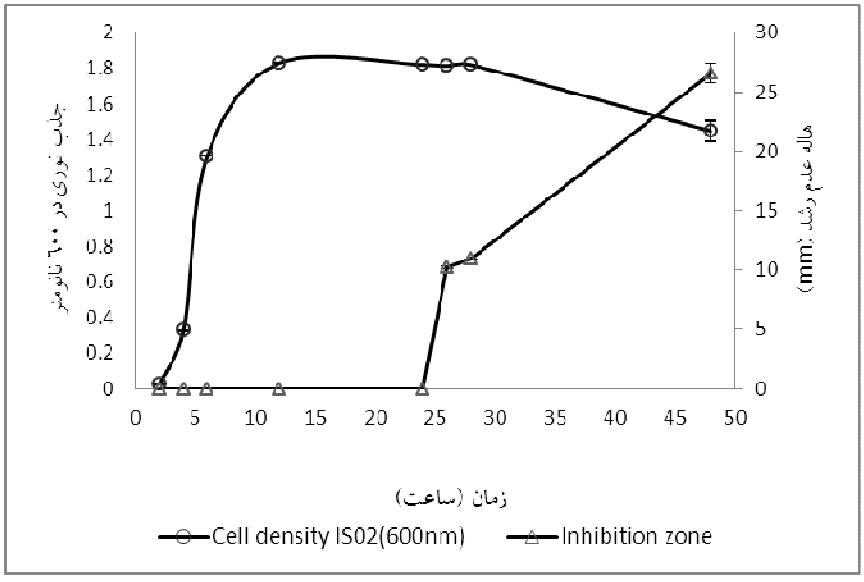
نمودار ۰-۱۶- نمودار رشد و توده زیستی باکتری **IS03** بر حسب زمان

۴-۹- بهترین زمان تولید ماده ضد میکروبی توسط باکتری های انتخابی

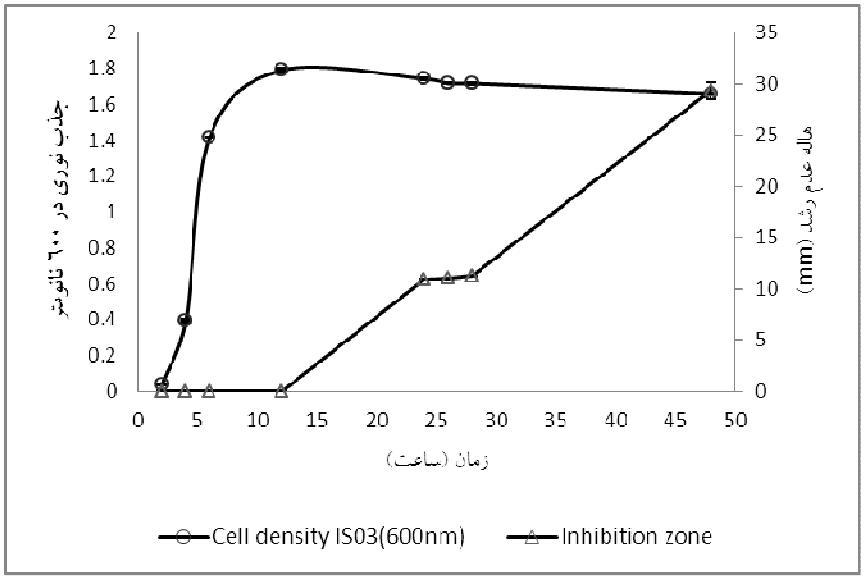
در طی پروسه تولید عصاره عاری از باکتری از محیط کشت باکتری ها pH عصاره ها انـدازه گیـری شـد که همواره در محدوده۷/۴۳ الی ۷/۸۳ برای باکتری IS02 و ۶/۳۱ الـی ۶/۹۹ بـرای بـاکتری IS03 بـود. بـر اسـاس نمودار ۰-۱۷ بیشترین میزان تولید مواد ضد میکروبی در باکتری IS02 در زمان حدود ۵۰ ساعت پس از کشت و در اواسط فاز سکون رشد می باشد و در باکتری IS03 نیز بیشترین تولید ماده ضد میکروبی در اواسط فاز سکون و حدود ۵۰ ساعت پس از کشت بود (نمودار ۰-۱۸).

همچنین بر اساس آزمون همبستگی پیرسون در باکتری IS02 همبستگی قوی بین زمان و میزان تولید مـاده ضد میکروبی (r =۰/۸۳۲) وجود دارد.

در باکتری IS03 نیز همبستگی قوی بین میزان تولید ماده ضد میکروبی (r =۰/۴۹۴) و میزان رشد بـاکتری ها برحسب جذب نوری (r =۰/۷۹۳) و همچنین بین میزان زی توده باکتریایی، میزان تولیـد مـاده ضـد میکروبـی (r =۰/۵۱۷) و میزان رشد باکتری ها (r =۰/۹۹۴) وجود دارد.



نمودار ۰-۱۷- نمودار میزان هاله عدم رشد باکتری **IS02** برحسب زمان در مقایسه با فازهای مختلف رشد

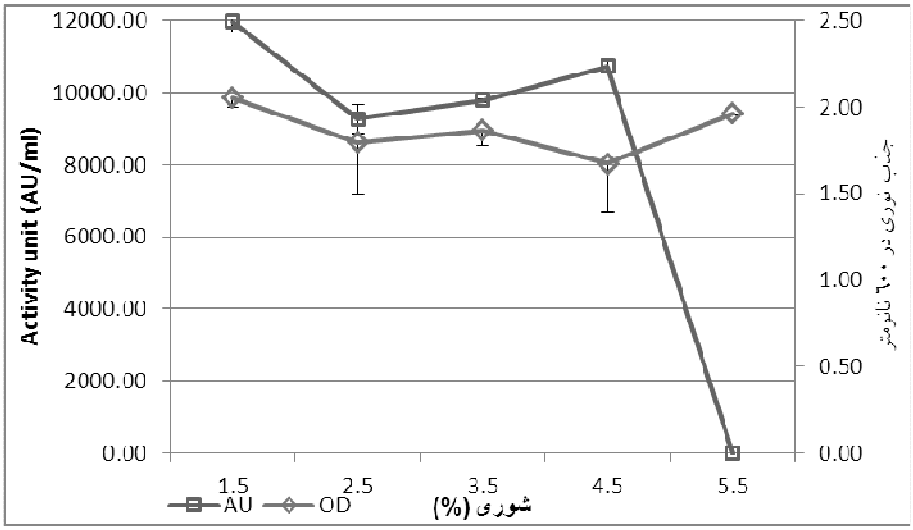


نمودار ۰-۱۸- نمودار میزان هاله عدم رشد باکتری **IS03** برحسب زمان در مقایسه با فازهای مختلف رشد

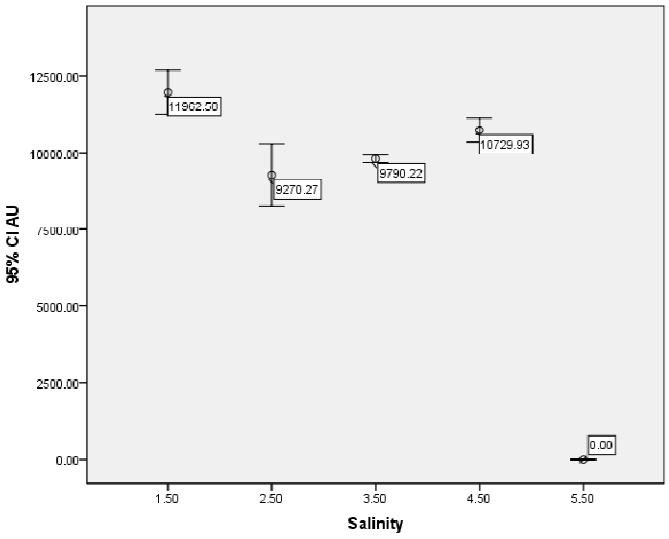
۴-۱۰- اثر غلظت های مختلف شوری بر تولید ماده ضد میکروبی باکتری **IS02**

بیشترین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 در شوری ppt ۱۵ (۲۹۱/۲± ۱۱۹۶۲/۵۸) بود ولی این باکتری خواص آنتی باکتریالش را تا شوری ppt ۴۵ به خوبی حفظ کرد (۱۵۶/۲۳±۱۰۷۲۹/۹۳) (نمودار ۰-۱۹) و حدود ۱۰ درصد از فعالیت ویژه آن کاهش یافت و در شوری ppt ۵۵ به صفر رسید (جدول ۰-۱۰) (تصویر ۰-۸).

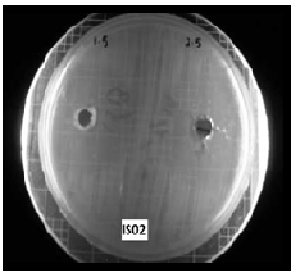
بر اساس آزمون آماری اختلاف معناداری بین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 در شوری ppt ۱۵ و ppt ۵۵ با سایر شوری های مورد آزمایش وجود دارد($p< 0.05$) (نمودار ۰-۲۰).

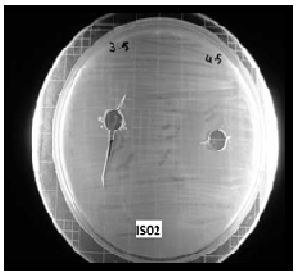


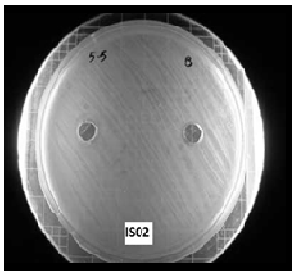
نمودار ۰-۱۹- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری **IS02** در شوری های مختلف



نمودار ۰-۲۰- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری **IS02** بر اساس گروه های مختلف شوری در سطح اطمینان ٪ ۹۵







تصویر ۰-۸- اثر غلظت های مختلف شوری بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS02**

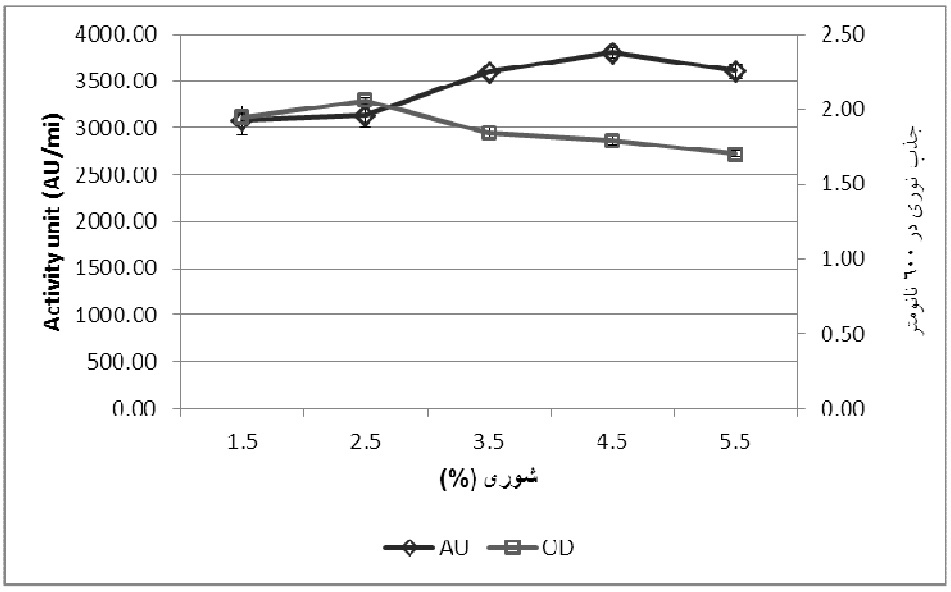
جدول ۰-۱۰- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS02 در شوری های مختلف

باکتری IS02 / شوری (٪)	1.5	2.5	3.5	4.5	5.5
24h	14.59	15.59	17.50	11.25	9.89
24h	14.32	15.67	17.47	11.32	9.93
24h	15.30	15.78	17.65	11.41	9.21
Mean	14.74	15.68	17.54	11.33	9.68
SD	0.51	0.10	0.10	0.08	0.40
48h	31.86	25.55	25.87	28.60	0.00
48h	31.91	24.12	25.72	27.78	0.00
48h	30.56	23.43	25.61	28.23	0.00
Mean	31.44	24.37	25.73	28.20	0.00
SD	0.77	1.08	0.13	0.41	0.00
Biomass	95.00	95.00	95.20	94.80	95.30
Biomass	95.00	94.75	94.98	93.60	95.30
Biomass	94.87	93.23	94.65	94.30	95.30
Mean	94.96	94.33	94.94	94.23	95.30
SD	0.08	0.96	0.28	0.60	0.00
OD	2.08	1.94	1.93	2.00	1.96
OD	2.08	1.99	1.90	1.49	1.96
OD	1.99	1.46	1.77	1.54	1.96
Mean	2.05	1.80	1.86	1.68	1.96
SD	0.06	0.30	0.09	0.28	0.00
AU	12121.10	9720.47	9842.21	10880.84	0.00
AU	12140.12	9176.43	9785.14	10568.87	0.00
AU	11626.52	8913.92	9743.30	10740.07	0.00
Mean	11962.58	9270.27	9790.22	10729.93	0.00
SD	291.19	411.38	49.65	156.23	0.00

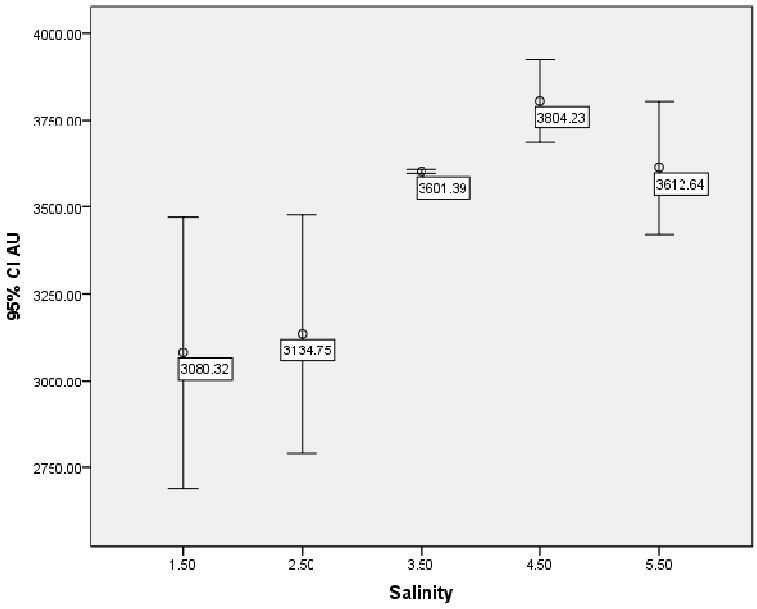
باکتری **IS03**:

بیشترین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS03 در شوری ۴۵ppt (۲/۲۷±۳۸۰۴/۲۳) بود ولی این باکتری خواص آنتی باکتریالش را تا شوری ۵۵ppt به خوبی حفظ کرد (۷۶/۶۸±۳۶۱۲/۶۴) (نمودار ۰-۲۱) و حدود ۵ درصد از فعالیت ویژه آن کاهش یافت ولی در شوری ۱۵ppt، ۲۵ و ۳۵ هم فعالیت ضد میکروبیش را حفظ کرد(جدول ۰-۱۱) (تصویر ۰-۹).

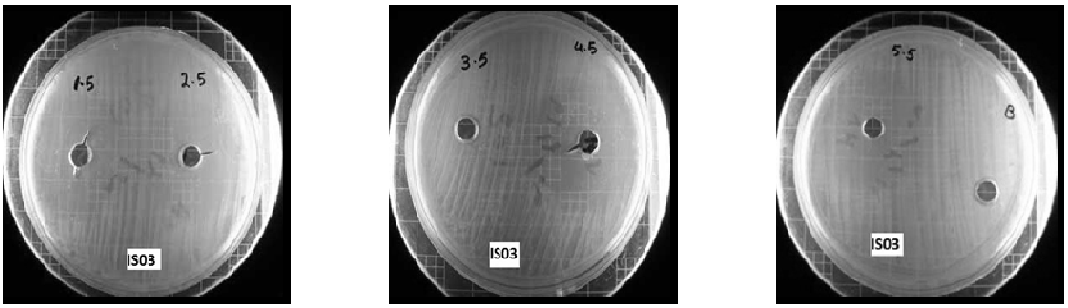
بر اساس آزمون آماری اختلاف معناداری بین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی در باکتری IS03 در شوری ۳۵ و ۵۵ ppt و همچنین ۱۵ و ۲۵ ppt وجود ندارد($p< 0.05$) (نمودار ۰-۲۲).



نمودار ۰-۲۱- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری **IS03** در شوری های مختلف



نمودار ۰-۲۲- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری **IS03** بر اساس گروه های مختلف شوری در سطح اطمینان ٪ ۹۵



تصویر ۰-۹- اثر غلظت های مختلف شوری بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS03**

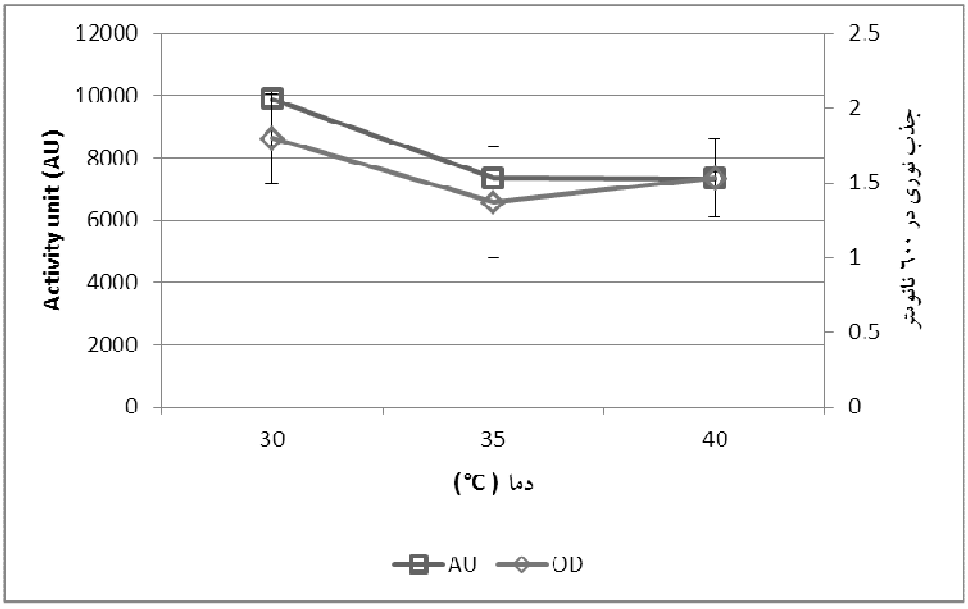
جدول ۰-۱۱- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری **IS03** در شوری های مختلف

باکتری IS03 / شوری (٪)	1.5	2.5	3.5	4.5	5.5
IZ 24h	13.50	24.00	18.91	19.21	14.69
IZ 24h	12.89	24.50	18.52	19.34	14.62
IZ 24h	13.34	23.87	17.81	18.91	14.57
Mean	13.24	24.12	18.41	19.15	14.63
SD	0.32	0.33	0.56	0.22	0.06
IZ 48h	29.77	30.08	33.09	35.19	33.68
IZ 48h	26.89	28.76	33.10	34.44	32.38
IZ 48h	28.23	27.55	33.06	35.21	33.50
Mean	28.30	28.80	33.08	34.95	33.19
SD	1.44	1.27	0.02	0.44	0.70
Biomass	95.30	97.60	94.90	95.00	97.10
Biomass	94.80	95.20	94.70	95.50	97.40
Biomass	95.10	94.60	93.80	95.60	97.30
Mean	95.07	95.80	94.47	95.37	97.27
SD	0.25	1.59	0.59	0.32	0.15
OD	1.98	2.08	1.87	1.77	1.68
OD	1.89	2.06	1.85	1.78	1.70
OD	1.97	2.04	1.80	1.82	1.72
Mean	1.95	2.06	1.84	1.79	1.70
SD	0.05	0.02	0.04	0.03	0.02
AU	3240.71	3274.45	3602.12	3830.72	3666.34
AU	2927.20	3130.76	3603.20	3749.07	3524.83
AU	3073.07	2999.04	3598.85	3832.90	3646.75
Mean	3080.32	3134.75	3601.39	3804.23	3612.64
SD	156.88	137.75	2.27	47.78	76.68

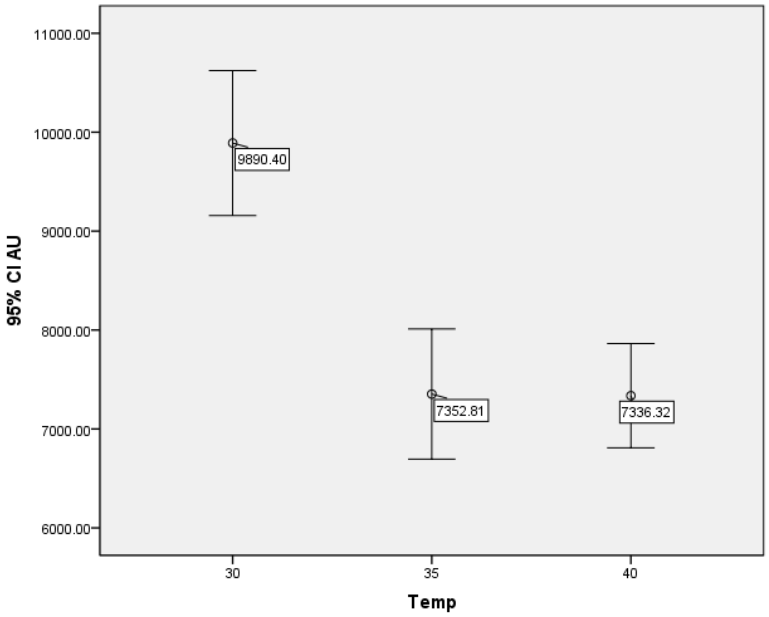
۴-۱۱- اثر دماهای مختلف بر تولید ماده ضد میکروبی

باکتری IS02 :

میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتریIS02 در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد (۲۹۴/۹۵ ± ۹۸۹۰/۴) بیشتر از دمای ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد (نمودار ۰-۲۳) و این روند در مورد رشد باکتری نیز به همین ترتیب است ولی در هر سه دمای مورد بررسی تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری IS02 صورت گرفت (نمودار ۰-۲۳). بر اساس آزمون آماری اختلاف معناداری بین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 در دماهای ۳۵ و ۴۰ وجود ندارد($p> 0.05$) (نمودار ۰-۲۴) (تصویر ۰-۱۰).



نمودار ۰-۲۳- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری **IS02** در دماهای مختلف



نمودار ۰-۲۴- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری **IS02** بر اساس گروه های مختلف دما در سطح اطمینان ۹۵ ٪

تصویر ۰-۱۰- اثر دما های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS02**

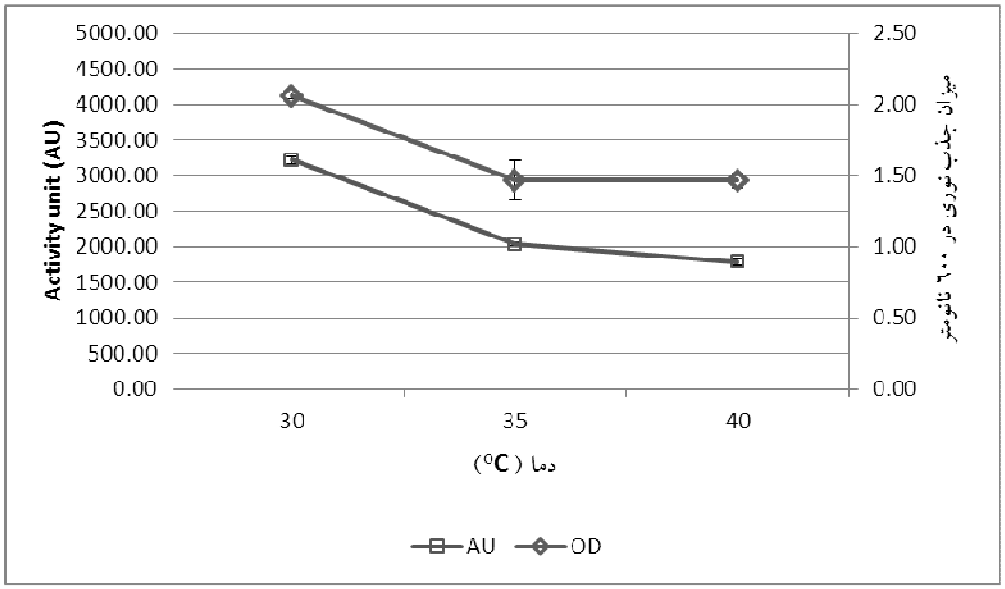
جدول ۰-۱۲- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری **IS02** دماهای مختلف

باکتری **IS02** / دما (°C)	**30**	**35**	**40**
IZ 48h	25.6	18.61	18.64
IZ 48h	25.5	19.37	19.6
IZ 48h	26.89	20	19.61
Mean	25.997	19.33	19.28
SD	0.7753	0.696	0.557
OD	1.9437	1.78	1.84
OD	1.9889	1.27	1.39
OD	1.4555	1.06	1.37
Mean	1.796	1.37	1.533
SD	0.2958	0.37	0.266
AU	9739.5	7080	7092
AU	9701.4	7369	7457
AU	10230	7609	7461
Mean	9890.4	7353	7336

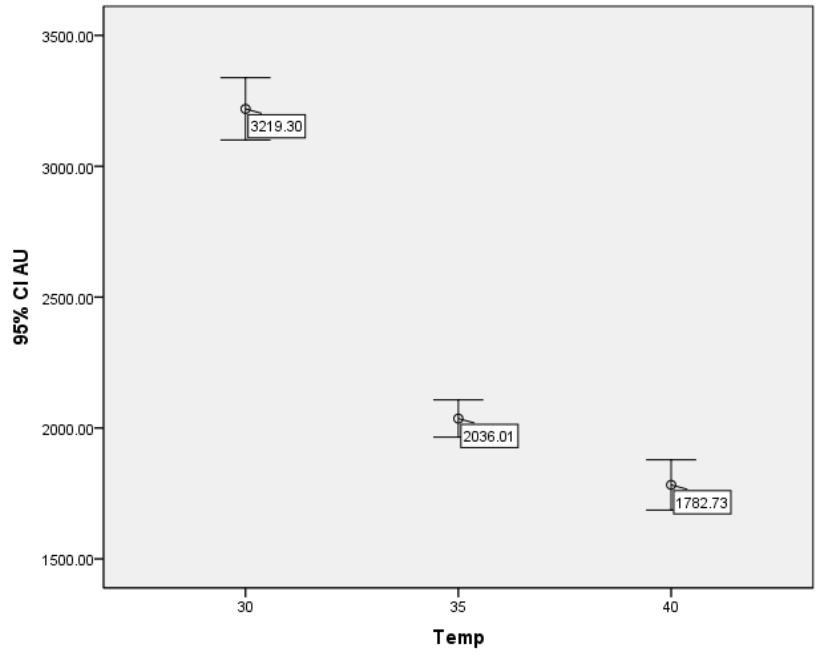
SD	294.95	264.8	212

باکتری IS03 :

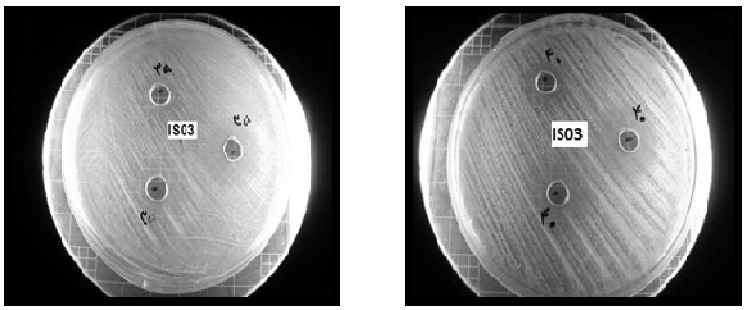
میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS03 در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد (۴۷/۸۱۵ ± ۳۲۱۹/۳) بیشتر از دمای ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد (جدول ۰-۱۳) و این روند در مورد رشد باکتری نیز به همین ترتیب است بر اساس آزمون آماری اختلاف معناداری بین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 در دماهای ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد وجود دارد($p< 0.05$) (نمودار ۰-۲۶). در دمای ۳۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS02** حدود ۳۶٪ کاهش یافت (نمودار ۰-۲۵) (تصویر ۰-۱۱).



نمودار ۰-۲۵- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری **IS03** در دماهای مختلف



نمودار ۰-۲۶- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری **IS03** بر اساس گروه های مختلف دما در سطح اطمینان ۹۵ ٪



تصویر ۰-۱۱- اثر دما های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS03**

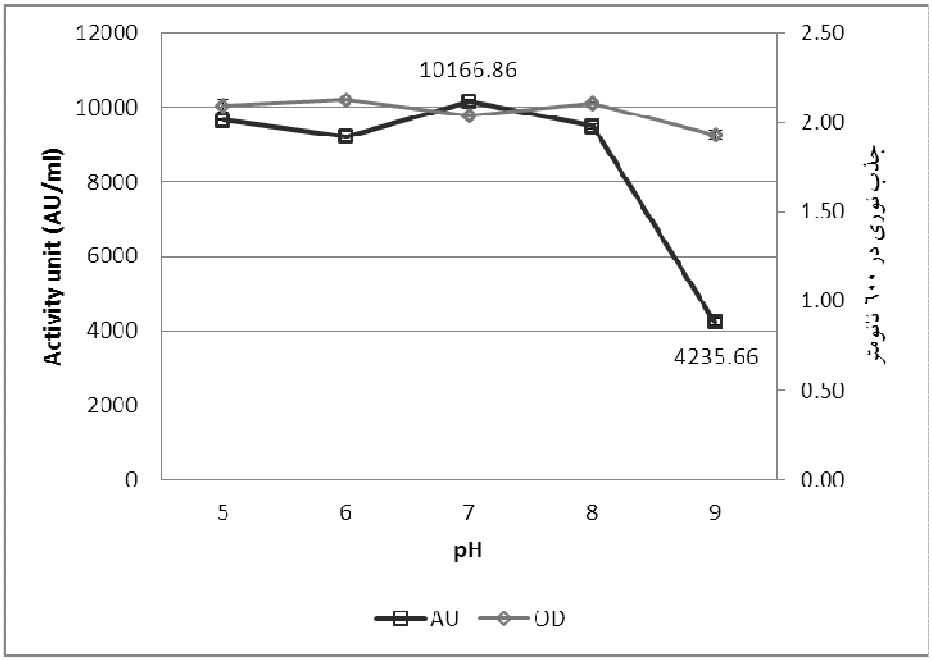
جدول ۰-۱۳- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری IS03 دماهای مختلف

باکتری **IS03** / دما (°C)	**30**	**35**	**40**
IZ 48h	29.30	18.61	16.02
IZ 48h	30.08	18.50	16.38
IZ 48h	29.34	19.00	16.73
Mean	29.57	18.70	16.38
SD	0.44	0.26	0.36
OD	2.08	1.44	1.49
OD	2.06	1.62	1.50
OD	2.04	1.34	1.41
Mean	2.06	1.47	1.47
SD	0.02	0.14	0.05

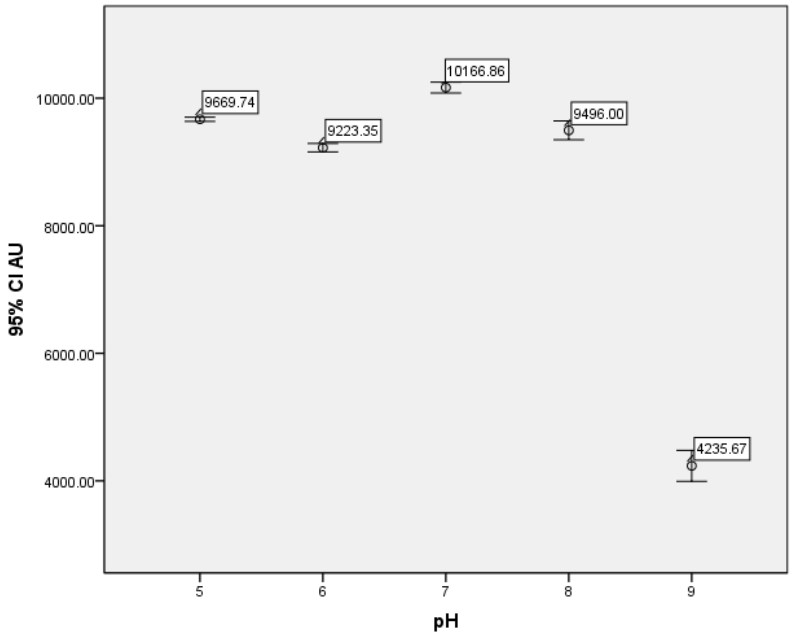
AU	3189.54	2025.85	1743.91
AU	3274.45	2013.88	1783.10
AU	3193.90	2068.30	1821.20
Mean	3219.30	2036.01	1782.73
SD	47.82	28.60	38.65

۴-۱۲- اثر **pH** های مختلف بر تولید ماده ضد میکروبی باکتری IS02 :

بیشترین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 در pH ۷ (۳۴/۵۲±۱۰۱۶۶/۸۶) و کمترین آن در pH ۹ (۹۷ /۸۳ ± ۴۲۳۵/۶۶) بود که حدود حدود ۵۸/۳۴ درصد از فعالیت ویژه آن کاهش یافت (جدول ۰-۱۴) و در ۲۴ ساعت اولیه پس از مواجهه با باکتری *V.harveyi* هیچ گونه خواص آنتی باکتریال نشان نداد ولی پس از ۴۸ ساعت اثر باکتریوسایدی بر روی*V.harveyi* داشت. این باکتری منتخب درpH های ۵، ۶ و ۸ نیز خواص ضد میکروبیش را حفظ کرد (نمودار ۰-۲۷) (تصویر ۰-۱۲). بر اساس آنالیز آماری اختلاف معناداری بین میزان فعالیت ویژه باکتری IS02 در pH ۹ با سایر pH های مورد آزمایش وجود دارد ($p< 0.05$) (نمودار ۰-۲۸) .باکتری IS02 در تمام رنج های اسیدیته مورد آزمایش رشد کرد (نمودار ۰-۲۷) ولی میزان رشد آن در pH ۹ اختلاف معناداری با سایر رنج های pH داشت ($p< 0.05$) (نمودار ۰-۲۸).



نمودار ۰-۲۷- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری **IS02** در **pH** های مختلف



نمودار ۰-۲۸- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری **IS02** بر اساس گروه های مختلف **pH** در سطح اطمینان ۹۵ ٪

تصویر ۰-۱۲- اثر **pH** های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS02**

جدول ۰-۱۴- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری **IS02** در **pH** های مختلف

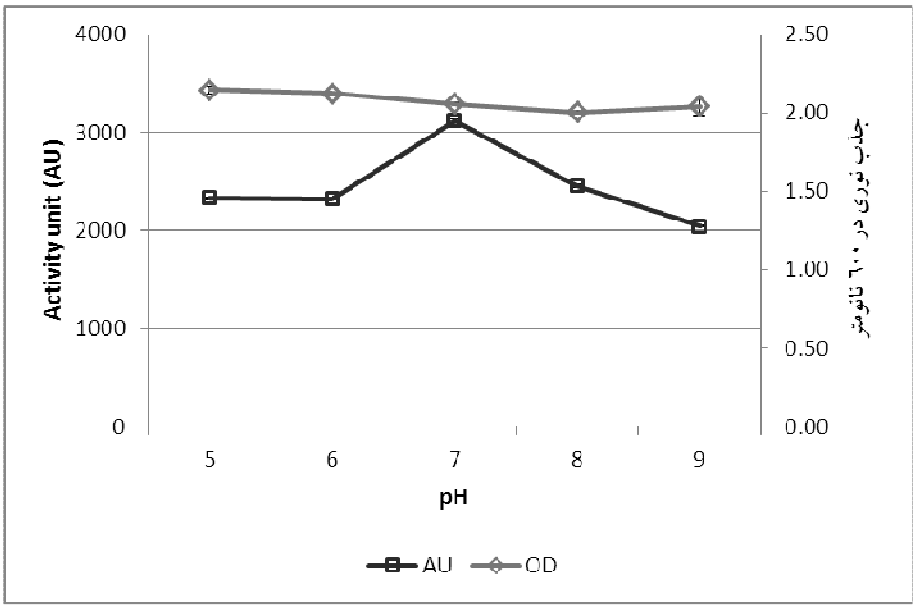
pH / باکتری IS02	5	6	7	8	9
24h	15.75	17.65	15.50	15.04	0.00
24h	15.61	17.56	15.64	15.07	0.00
24h	15.79	17.69	15.42	15.12	0.00
Mean	15.72	17.63	15.52	15.08	0.00
SD	0.09	0.07	0.11	0.04	0.00

48h	25.42	24.25	26.79	24.85	11.24
48h	25.38	24.31	26.62	24.89	11.32
48h	25.45	24.17	26.76	25.14	10.84
Mean	25.42	24.24	26.72	24.96	11.13
SD	0.04	0.07	0.09	0.16	0.26
OD	2.09	2.13	2.04	2.11	1.94
OD	2.13	2.12	2.04	2.12	1.95
OD	2.07	2.13	2.04	2.11	1.90
Mean	2.09	2.12	2.04	2.11	1.93
SD	0.03	0.01	0.00	0.01	0.03
AU	9671.01	9225.88	10192.22	9454.15	4276.25
AU	9655.79	9248.71	10127.55	9469.37	4306.68
AU	9682.42	9195.45	10180.81	9564.48	4124.07
Mean	9669.74	9223.35	10166.86	9496.00	4235.66
SD	13.36	26.72	34.52	59.79	97.83

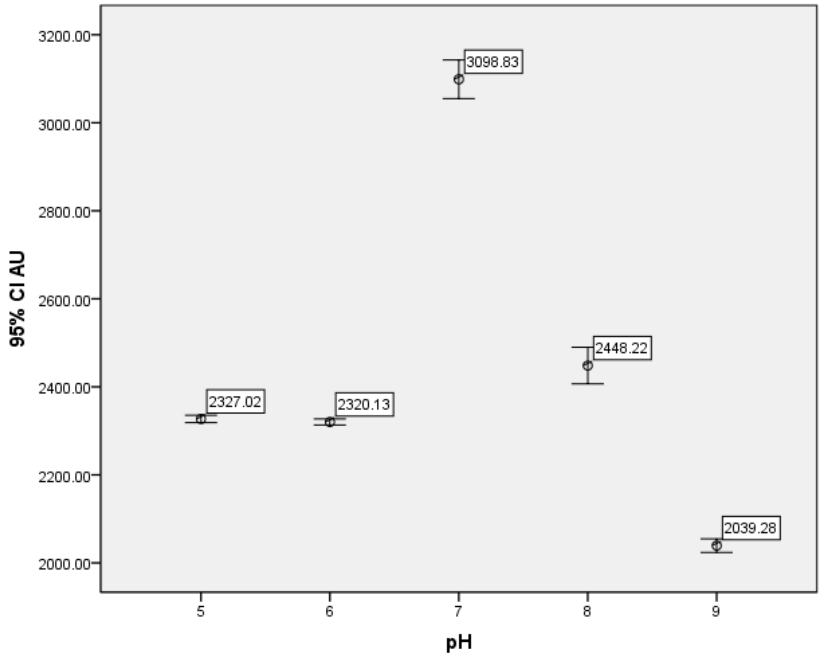
باکتری **IS03** :

بیشترین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری **IS02** در **pH** ۷ (۱۷/۷± ۳۰۹۸/۸۳) بود و کمترین آن در **pH** ۹ (۱۹/ ۶±۲۰۳۹/۲۸) که حدود ۳۴/۲ درصد فعالیت ویژه آن نسبت به **pH** ۷ کاهش یافت (نمودار۰-۲۹). بر اساس آنالیز آماری اختلاف معناداری بین میزان فعالیت ویژه باکتری **IS03** در **pH** ۷ با سایر **pH** های مورد آزمایش وجود دارد (**$p< 0.05$**) ولی بین **pH** ۵ و ۶ اختلاف معنی داری وجود ندارد(**$p> 0.05$**) (نمودار۰-۳۰).باکتری **IS03** در تمام رنج های اسیدیته مورد آزمایش رشد کرد (نمودار۰-۲۹،

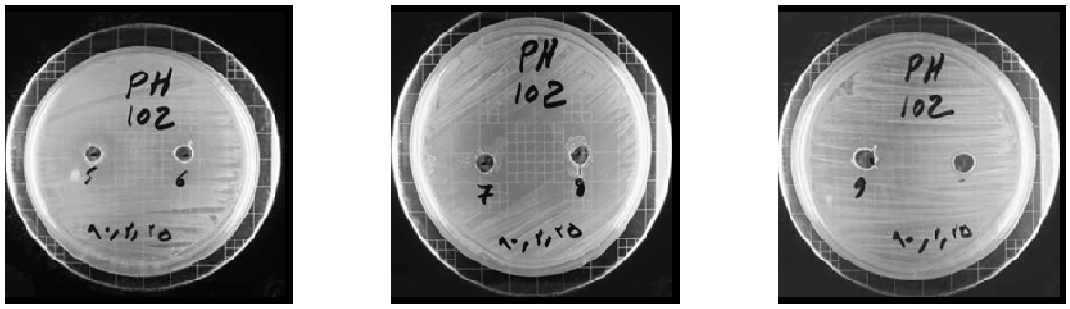
جدول ۰-۱۵) (تصویر ۰-۱۳) و میزان رشد آن در **pH** ۷ اختلاف معنـاداری بـا **pH** ۶، ۸ و ۹ نداشـت ($p>$ **0.05**) ولی با **pH** ۵ اختلاف معنی دار داشت ($p>$ **0.05**).



نمودار ۰-۲۹- میزان فعالیت ویژه و جذب نوری باکتری IS03 در pH های مختلف



نمودار ۰-۳۰- گروهبندی فعالیت ویژه باکتری IS03 بر اساس گروه های مختلف pH در سطح اطمینان ۹۵ ٪



تصویر ۰-۱۳- اثر **pH** های مختلف بر تولید مواد ضد میکروبی توسط باکتری **IS03**

جدول ۰-۱۵- میزان هاله عدم رشد ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، جذب نوری، زی توده و فعالیت ویژه باکتری **IS03** در **pH** های مختلف

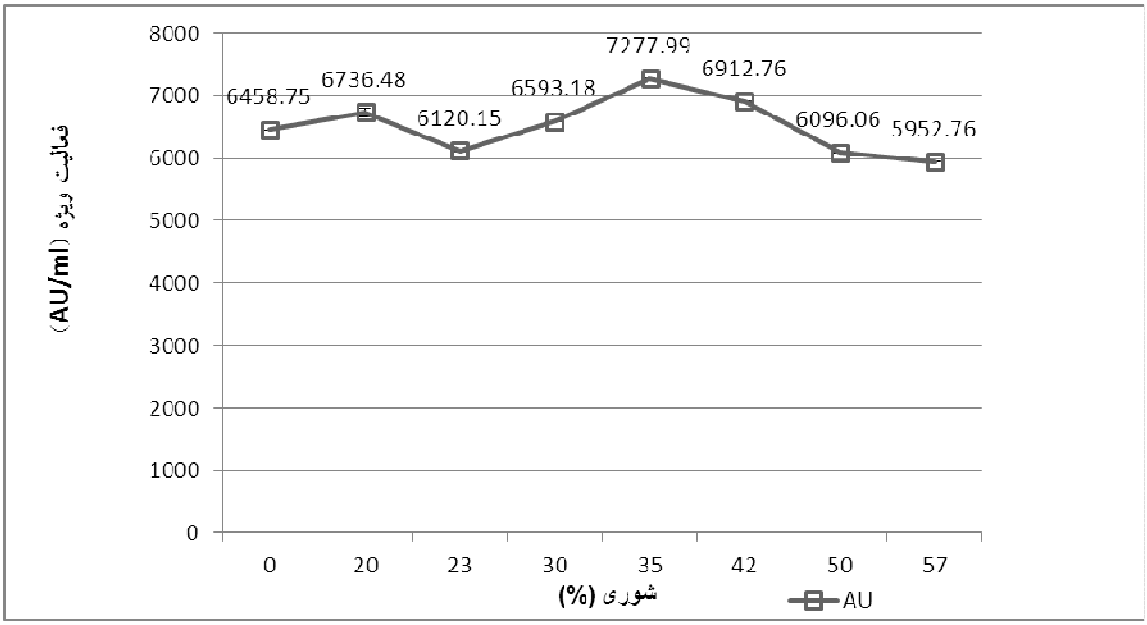
باکتری IS03 / pH	5	6	7	8	9
24h	18.10	19.58	24.23	22.38	17.27
24h	18.23	19.54	25.32	22.36	17.22
24h	17.92	19.65	24.89	22.43	16.96
Mean	18.08	19.59	24.81	22.39	17.15

SD	0.16	0.06	0.55	0.04	0.17
48h	21.35	21.31	28.34	22.62	18.75
48h	21.37	21.29	28.41	22.32	18.67
48h	21.41	21.34	28.65	22.53	18.78
Mean	21.38	21.31	28.47	22.49	18.73
SD	0.03	0.03	0.16	0.15	0.06
OD	2.17	2.12	1.99	2.00	2.01
OD	2.15	2.12	1.90	2.00	2.11
OD	2.12	2.12	1.93	2.01	2.00
Mean	2.14	2.12	1.94	2.01	2.04
SD	0.02	0.00	0.05	0.01	0.06
AU	2324.12	2319.77	3085.04	2462.37	2041.09
AU	2326.30	2317.59	3092.66	2429.71	2032.38
AU	2330.65	2323.03	3118.79	2452.57	2044.36
Mean	2327.02	2320.13	3098.83	2448.22	2039.28

۴-۱۳- ماندگاری ماده ضد میکروبی در غلظت های مختلف شوری

باکتری IS02:

بیشترین میزان کاهش در فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 به ترتیب در شوری ۵۷ppt (۳۵/۴۵ درصد)، ۲۳ppt(۳۳/۶۴ درصد) و۰ppt(۲۹/۹۶ درصد) بود (جدول ۰-۱۶) ولی مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS02 خواص آنتی باکتریال خود را بر روی باکتری *Vibrio harveyi* در تمام رنج های شوری مورد آزمایش به خوبی حفظ کردند (نمودار ۰-۳۱)



نمودار ۰-۳۱- میزان فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری **IS02** در شوری های مختلف

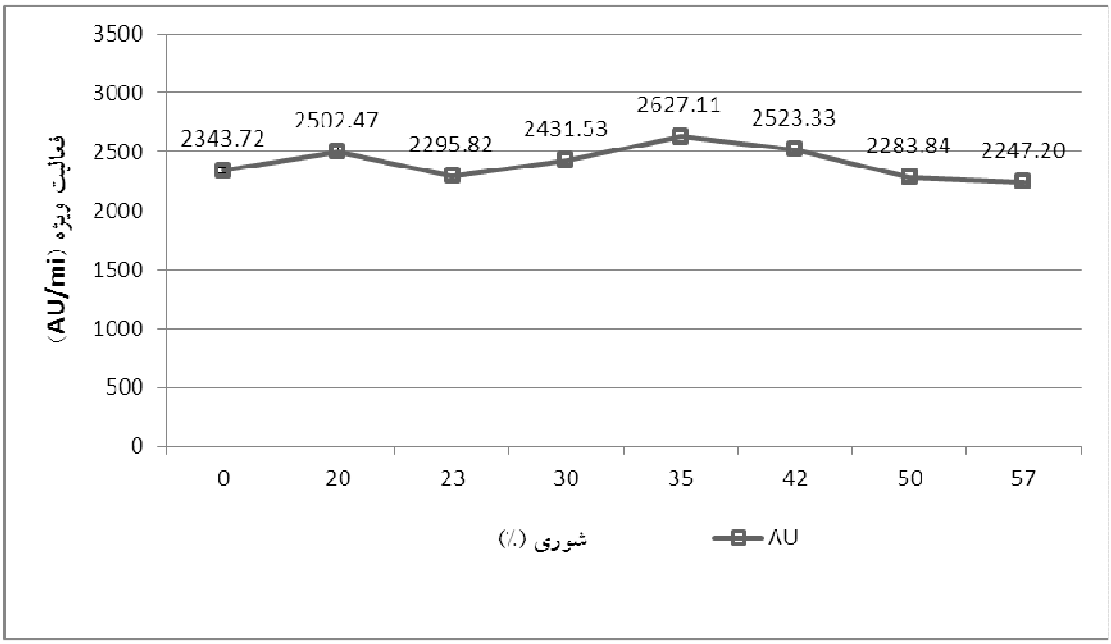
جدول ۰-۱۶- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری **IS02** در شوری های مختلف

باکتری **IS02** / شوری (ppt)	قطر هاله عدم رشد	فعالیت ویژه (AU/ml)	درصدماندگاری فعالیت
۰	16.99	6463.83	70.09
۰	16.97	6456.22	70.01
۰	16.97	6456.22	70.01
میانگین	16.98	6458.75	70.04
SD	0.01	4.39	0.05

۲۰	17.50	6657.85	72.19
۲۰	17.81	6775.79	73.47
۲۰	17.81	6775.79	73.47
میانگین	17.71	6736.48	73.05
SD	0.18	68.09	0.74
۲۳	16.08	6117.62	66.34
۲۳	16.08	6117.62	66.34
۲۳	16.10	6125.23	66.42
میانگین	16.09	6120.15	66.36
SD	0.01	4.39	0.05
۳۰	17.32	6589.37	71.45
۳۰	17.32	6589.37	71.45
۳۰	17.35	6600.79	71.58
میانگین	17.33	6593.18	71.49
SD	0.02	6.59	0.07
۳۵	19.12	7274.18	78.88
۳۵	19.12	7274.18	78.88
۳۵	19.15	7285.60	79.00
میانگین	19.13	7277.99	78.92
SD	0.02	6.59	0.07
۴۲	18.16	6908.95	74.92
۴۲	18.16	6908.95	74.92
۴۲	18.19	6920.36	75.04
میانگین	18.17	6912.76	74.96
SD	0.02	6.59	0.07
۵۰	16.01	6090.99	66.05
۵۰	16.01	6090.99	66.05
۵۰	16.05	6106.20	66.21
میانگین	16.02	6096.06	66.10
SD	0.02	8.79	0.10
۵۷	15.64	5950.22	64.52
۵۷	15.64	5950.22	64.52
۵۷	15.66	5957.83	64.60
میانگین	15.65	5952.76	64.55
SD	0.01	4.39	0.05

باکتری **IS03**:

بیشترین میزان کاهش در فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS03 در شوری ppt ۵۷ (۲۸/۶۲ درصد) بود (جدول ۰-۱۷) ولی مواد ضد میکروبی عصاره باکتری IS03 خواص آنتی باکتریال خود را بر روی باکتری *Vibrio harveyi* در تمام رنج های شوری مورد آزمایش به خوبی حفظ کردند(نمودار ۰-۳۲).



نمودار ۰-۳۲- فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری **IS03** در شوری های مختلف

جدول ۰-۱۷- میزان ماندگاری مواد ضد میکروبی عصاره باکتری **IS03** در شوری های مختلف

باکتری **IS03** / شوری (ppt)	قطر هاله عدم رشد	فعالیت ویژه (AU/ml)	درصد ماندگاری فعالیت
۰	21.69	2361.13	75.00
۰	21.27	2315.41	73.55

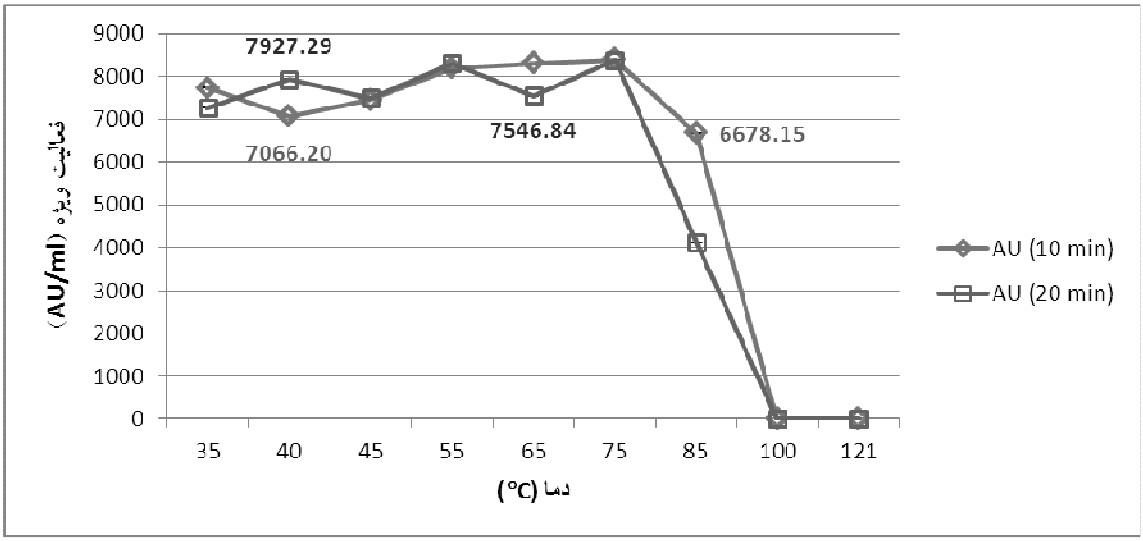
۰	21.63	2354.60	74.79
میانگین	21.53	2343.72	74.45
SD	0.23	24.73	0.79
۲۰	22.50	2449.31	77.80
۲۰	22.81	2483.05	78.87
۲۰	23.66	2575.04	81.79
میانگین	22.99	2502.47	79.49
SD	0.60	65.07	2.07
۲۳	21.08	2294.73	72.89
۲۳	21.10	2296.91	72.96
۲۳	21.09	2295.82	72.93
میانگین	21.09	2295.82	72.93
SD	0.01	1.09	0.03
۳۰	22.34	2431.89	77.25
۳۰	22.32	2429.71	77.18
۳۰	22.35	2432.98	77.28
میانگین	22.34	2431.53	77.24
SD	0.02	1.66	0.05
۳۵	24.13	2626.75	83.44
۳۵	24.15	2628.92	83.51
۳۵	24.12	2625.66	83.40
میانگین	24.13	2627.11	83.45
SD	0.02	1.66	0.05
۴۲	23.18	2523.33	80.15
۴۲	23.16	2521.15	80.08
۴۲	23.20	2525.51	80.22
میانگین	23.18	2523.33	80.15
SD	0.02	2.18	0.07
۵۰	21.03	2289.29	72.72
۵۰	21.01	2287.11	72.65
۵۰	20.90	2275.14	72.27
میانگین	20.98	2283.84	72.54
SD	0.07	7.62	0.24
۵۷	20.64	2246.83	71.37
۵۷	20.66	2249.01	71.44
۵۷	20.63	2245.74	71.33
میانگین	20.64	2247.20	71.38
SD	0.02	1.66	0.05

۴-۱۴- ماندگاری ماده ضد میکروبی در دماهای مختلف

باکتری IS02:

درصد ماندگاری فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری **IS02** در دمای ۴۰ و ۸۵ درجه پس از ۱۰ دقیقه به ترتیب۷۶/۶۲ و ۷۲/۴۱ درصد بود(جدول ۰-۱۸)که نسبت به سایر دماها کمتر بود ولی در دمای ۷۵ درجه به بیشترین میزان (۹۱/۱) رسید و همچنین در دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه پس از ۱۰ دقیقه به صفر رسید (نمودار ۰-۳۳).

فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی این باکتری پس از ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰، ۵۵ و ۷۵ درجه بیشتر از دمای ۴۵ و ۶۵ درجه بود (جدول ۰-۱۸) و در دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه پس از ۲۰ دقیقه به صفر رسید (نمودار ۰-۳۳)



نمودار ۰-۳۳- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری **IS02** در دماهای مختلف در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه

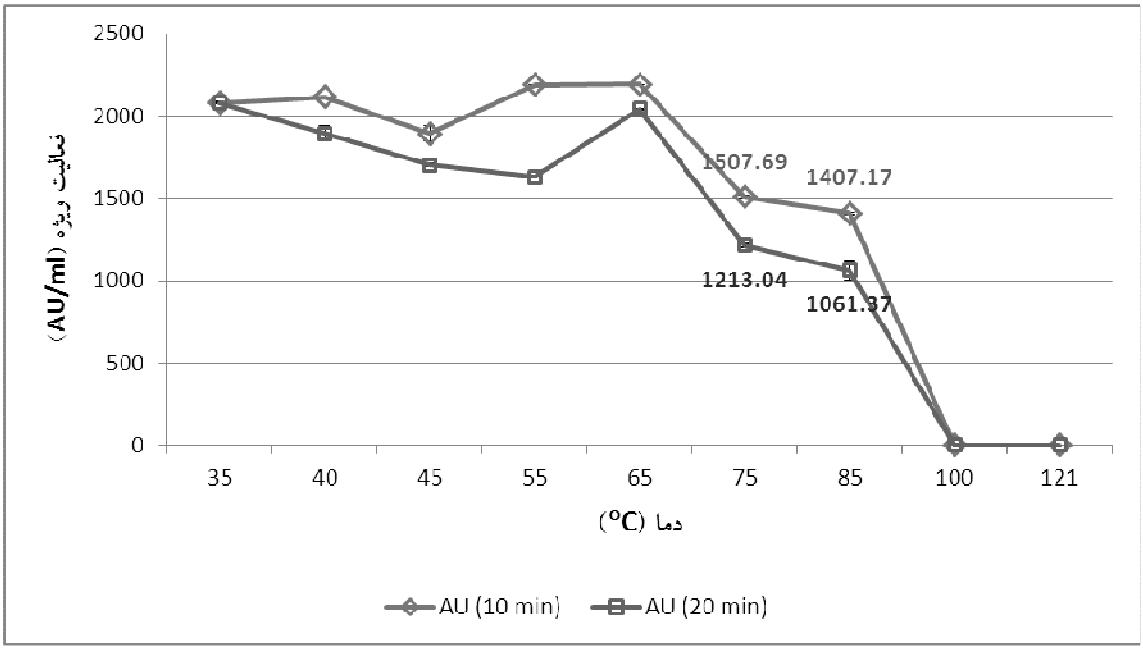
جدول ۰-۱۸- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری **IS02** در دماهای مختلف

باکتری IS02 / دما(°C)	قطر هاله عدم رشد(۱۰دقه یقه)	فعالیت ویژه	درصد ماندگاری فعالیت(۱۰دقه یقه)	قطر هاله عدم رشد(۲۰دقیقه)	فعالیت ویژه	درصد ماندگاری فعالیت(۲۰دقه یقه)
۳۵	20.33	7734.53	83.87	19.09	7262.77	78.75
۳۵	20.32	7730.72	83.83	19.09	7262.77	78.75
۳۵	20.34	7738.33	83.91	19.08	7258.96	78.71
میانگین	20.33	7734.53	83.87	19.09	7261.50	78.74
SD	0.01	3.80	0.04	0.01	2.20	0.02
۴۰	18.57	7064.94	76.61	20.82	7920.95	85.89
۴۰	18.56	7061.13	76.57	20.86	7936.16	86.06
۴۰	18.59	7072.54	76.69	20.83	7924.75	85.93
میانگین	18.57	7066.20	76.62	20.84	7927.29	85.96
SD	0.02	5.81	0.06	0.02	7.92	0.09
۴۵	19.56	7441.58	80.69	19.66	7479.62	81.11
۴۵	19.59	7452.99	80.82	19.70	7494.84	81.27
۴۵	19.58	7449.19	80.78	19.67	7483.43	81.15
میانگین	19.58	7447.92	80.76	19.68	7485.97	81.17
SD	0.02	5.81	0.06	0.02	7.92	0.09
۵۵	21.56	8202.48	88.94	21.85	8312.81	90.14
۵۵	21.54	8194.87	88.86	21.84	8309.00	90.10
۵۵	21.51	8183.45	88.74	21.85	8312.81	90.14
میانگین	21.54	8193.60	88.85	21.85	8311.54	90.13
SD	0.03	9.57	0.10	0.01	2.20	0.02
۶۵	21.82	8301.39	90.02	19.82	7540.50	81.77
۶۵	21.81	8297.59	89.98	19.87	7559.52	81.97
۶۵	21.83	8305.20	90.06	19.82	7540.50	81.77
میانگین	21.82	8301.39	90.02	19.84	7546.84	81.83
SD	0.01	3.80	0.04	0.03	10.98	0.12
۷۵	22.05	8388.90	90.97	22.05	8388.90	90.97
۷۵	22.05	8388.90	90.97	22.05	8388.90	90.97
۷۵	22.08	8400.31	91.09	22.01	8373.68	90.80
میانگین	22.06	8392.70	91.01	22.04	8383.82	90.91
SD	0.02	6.59	0.07	0.02	8.79	0.10
۸۵	17.57	6684.49	72.48	10.84	4124.07	44.72
۸۵	17.57	6684.49	72.48	10.84	4124.07	44.72
۸۵	17.52	6665.46	72.28	10.82	4116.46	44.64
میانگین	17.55	6678.15	72.41	10.83	4121.53	44.69
SD	0.03	10.98	0.12	0.01	4.39	0.05
۱۰۰	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
۱۰۰	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
۱۰۰	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
میانگین	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

باکتری**IS03**:

در صد ماندگاری فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری **IS03** در دمای ۷۵ و ۸۵ درجه پس از ۱۰ دقیقه به ترتیب ۴۷/۸۹ و۴۴/۳۳ درصد بود (جدول ۰-۱۹) که نسبت به سایر دماها حدود ۶۰ درصد کاهش داشت و همچنین در دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه پس از ۱۰ دقیقه به صفر رسید (نمودار ۰-۳۴).

فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی این باکتری پس از ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ الی ۵۵ درجه حدود ۴۰ الی ۵۰ درصد کاهش داشت ولی در دمای ۶۵ درجه افزایش و مجدداً در دمای ۷۵ و ۸۵ درجه کاهش یافت(جدول ۰-۱۹) و درنهایت در دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه پس از ۲۰ دقیقه به صفر رسید (نمودار ۰-۳۴)



نمودار ۰-۳۴- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری **IS03** در دماهای مختلف در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه

جدول ۰-۱۹- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری **IS03** در دماهای مختلف

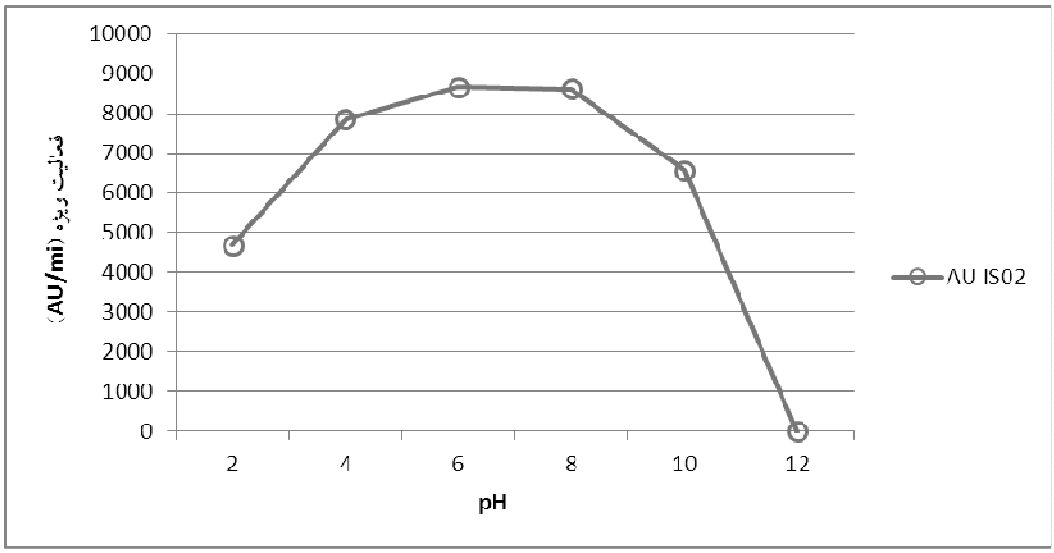
باکتری IS03 / دما(°C)	قطر هاله عدم رشد(۱۰دقیقه)	فعالیت ویژه	درصد ماندگاری فعالیت(۱۰د قیقه)	قطر هاله عدم رشد(۲۰دقیقه)	فعالیت ویژه	درصد ماندگاری فعالیت(۲۰د قیقه)
۳۵	19.01	2069.39	65.73	19.09	2078.10	66.01
۳۵	19.20	2090.08	66.39	19.08	2077.01	65.98
۳۵	19.11	2079.74	66.06	19.09	2077.56	65.99
میانگین	19.11	2079.74	66.06	19.09	2077.56	65.99
SD	0.09	10.34	0.33	0.01	0.54	0.02
۴۰	19.43	2115.11	67.19	17.80	1937.68	61.55
۴۰	19.40	2111.85	67.08	16.98	1848.41	58.71
۴۰	19.42	2113.48	67.13	17.39	1893.04	60.13
میانگین	19.42	2113.48	67.13	17.39	1893.04	60.13
SD	0.02	1.63	0.05	0.41	44.63	1.42
۴۵	17.80	1937.68	61.55	15.59	1697.10	53.91
۴۵	16.98	1848.41	58.71	15.58	1696.01	53.87
۴۵	17.39	1893.04	60.13	15.76	1715.60	54.50
میانگین	17.39	1893.04	60.13	15.64	1702.90	54.09
SD	0.41	44.63	1.42	0.10	11.01	0.35
۵۵	20.10	2188.05	69.50	15.06	1639.40	52.07
۵۵	20.10	2188.05	69.50	14.90	1621.99	51.52
۵۵	20.10	2188.05	69.50	14.93	1625.25	51.63
میانگین	20.10	2188.05	69.50	14.96	1628.88	51.74
SD	0.00	0.00	0.00	0.09	9.26	0.29
۶۵	20.15	2193.49	69.67	18.80	2046.53	65.01
۶۵	20.14	2192.40	69.64	18.71	2036.74	64.70
۶۵	20.15	2192.95	69.66	18.76	2042.18	64.87
میانگین	20.15	2192.95	69.66	18.76	2041.82	64.86
SD	0.00	0.54	0.02	0.05	4.91	0.16
۷۵	13.78	1500.07	47.65	11.10	1208.33	38.38
۷۵	13.88	1510.95	47.99	11.10	1208.33	38.38
۷۵	13.89	1512.04	48.03	11.23	1222.48	38.83
میانگین	13.85	1507.69	47.89	11.14	1213.04	38.53
SD	0.06	6.62	0.21	0.08	8.17	0.26
۸۵	12.99	1414.07	44.92	10.13	1102.73	35.03
۸۵	12.97	1411.89	44.85	9.14	994.96	31.60
۸۵	12.82	1395.56	44.33	9.98	1086.40	34.51

میانگین	12.93	1407.17	44.70	9.75	1061.37	33.71
SD	0.09	10.11	0.32	0.53	58.08	1.84
۱۰۰	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
۱۰۰	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
۱۰۰	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
میانگین	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

۴-۱۵- ماندگاری ماده ضد میکروبی در **pH** های مختلف

باکتری IS02:

ماندگاری اثر ماده ضد میکروبی باکتری **IS02** بر روی باکتری *V.harveyi* در pH اسیدی ۲ و قلیایی ۱۲ به کمترین میزان رسید (نمودار۰-۳۵) و میزان فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی در محیط بسیار قلیایی به صفر و در محیط بسیار اسیدی حدود ۵۰ درصد کاهش داشت (جدول ۰-۲۰).



نمودار۰-۳۵- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری **IS02** در **pH** های مختلف

جدول ۰-۲۰- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری IS02 در pH های مختلف

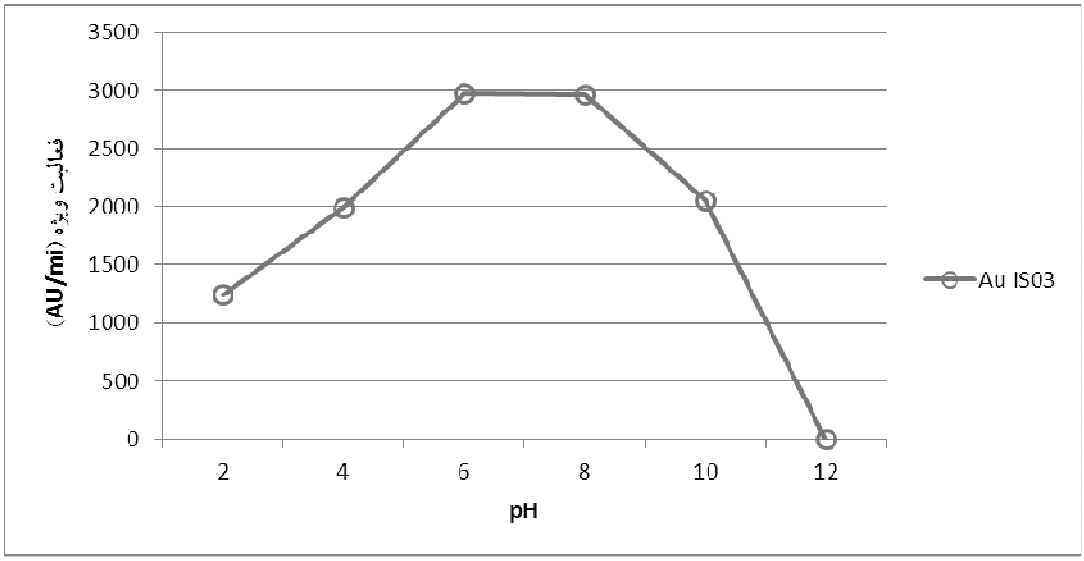
باکتری **IS02** / pH	قطر هاله عدم رشد	فعالیت ویژه (AU/ml)	درصد ماندگاری فعالیت
۲	12.33	4690.93	50.87
۲	12.31	4683.33	50.78
۲	12.28	4671.91	50.66
میانگین	12.31	4682.06	50.77
SD	0.03	9.57	0.10
۴	20.65	7856.27	85.19
۴	20.69	7871.49	85.35
۴	20.67	7863.88	85.27
میانگین	20.67	7863.88	85.27
SD	0.02	7.61	0.08
۶	22.72	8643.80	93.73
۶	22.75	8655.21	93.85
۶	22.78	8666.62	93.98
میانگین	22.75	8655.21	93.85
SD	0.03	11.41	0.12
۸	22.61	8601.95	93.28
۸	22.67	8624.78	93.52
۸	22.71	8639.99	93.69
میانگین	22.66	8622.24	93.50
SD	0.05	19.15	0.21
۱۰	17.25	6562.74	71.16
۱۰	17.23	6555.13	71.08
۱۰	17.31	6585.57	71.41
میانگین	17.26	6567.82	71.22
SD	0.04	15.84	0.17
۱۲	0.00	0.00	0.00
۱۲	0.00	0.00	0.00

۱۲	0.00	0.00	0.00
میانگین	0.00	0.00	0.00
SD	0.00	0.00	0.00

باکتری **IS03**:

میزان ماندگاری فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی باکتری **IS03** در **pH** های اسیدی ۲ و ۴ کمتر از **pH** ۶ و ۸ بود (جدول ۰-۲۱) و همچنین فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی این باکتری در**pH** بسیار قلیایی ۱۲ به صفر رسید (نمودار ۰-۳۶).

نمودار ۰-۳۶- میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی عصاره باکتری **IS03** در **pH** های مختلف



جدول ۰-۲۱- میزان ماندگاری مواد ضدمیکروبی عصاره باکتری **IS03** در **pH** های مختلف

باکتری **IS03** / pH	قطر هاله عدم رشد	فعالیت ویژه (AU/ml)	درصد ماندگاری فعالیت
۲	11.21	1220.30	38.76
۲	11.82	1286.70	40.87
۲	11.19	1218.12	38.69
میانگین	11.41	1241.71	39.44
SD	0.36	38.98	1.24
۴	18.42	2005.17	63.69
۴	18.41	2004.08	63.66
۴	18.21	1982.31	62.97
میانگین	18.35	1997.18	63.44
SD	0.12	12.90	0.41
۶	27.42	2984.89	94.81
۶	27.35	2977.27	94.57
۶	27.21	2962.03	94.09
میانگین	27.33	2974.73	94.49
SD	0.11	11.64	0.37
۸	27.22	2963.12	94.12
۸	27.21	2962.03	94.09
۸	27.23	2964.21	94.16
میانگین	27.22	2963.12	94.12
SD	0.01	1.09	0.03
۱۰	18.90	2057.42	65.35
۱۰	18.86	2053.06	65.21
۱۰	18.87	2054.15	65.25
میانگین	18.88	2054.88	65.27
SD	0.02	2.27	0.07
۱۲	0.00	0.00	0.00
۱۲	0.00	0.00	0.00

۱۲	0.00	0.00	0.00
میانگین	0.00	0.00	0.00
SD	0.00	0.00	0.00

۴-۱۶- پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های انتخابی و باکتری هدف (***Vibrio harveyi***)

با مقایسه پروفایل آنتی بیوگرام باکتری های منتخب (جدول ۰-۲۲) با جداول استاندارد نتایج ذیل بدست آمد:

باکتری IS02 نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین حساس، اکسی تتراسایکلین حساس، استرپتومایسین نیمه حساس، تری متوپریم سولفامتوکسازول حساس و اریترومایسین حساس می باشد.

باکتری IS03 نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین حساس، اکسی تتراسایکلین حساس، استرپتومایسین مقاوم، تری متوپریم سولفامتوکسازول حساس و اریترومایسین حساس می باشد.

باکتری *V.harveyi* PTCC 1755 نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین حساس، اکسی تتراسایکلین حساس، استرپتومایسین مقاوم، تری متوپریم سولفامتوکسازول حساس و اریترومایسین مقاوم می باشد.

جدول ۰-۲۲- پروفایل آنتی بیوگرام باکتری های منتخب و باکتری *V.harveyi*

آنتی بیوتیک / باکتری	IS02	IS03	*V.harveyi* PTCC 1755
تتراسایکلین (30µg)	29.6	31.06	27.13

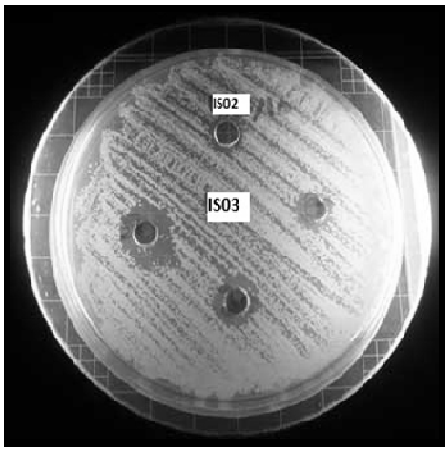
اکسی تتراسایکلین(30µg)	29.24	29.52	27.07
استرپتومایسین (15µg)	11.8	8.45	0
تری متوپریم سولفامتوکسازول (1.25/23.75 µg)	41.93	38.28	24.85
اریترومایسین (15µg)	31.23	31.3	15.19

۴-۱۷- اثر آنتاگونیستی باکتری های انتخابی بر یکدیگر و بر روی سویه های باسیلوسی

عصاره هر دو باکتری IS02 و IS03 بر روی یکدیگر اثر آنتاگونیستی داشتند ولی اثر بازدارندگی از رشد عصاره باکتری IS03 بر باکتری IS02 بیشتر از عصاره باکتری IS02 بر باکتری IS03 بود (جدول ۰-۲۳، جدول ۰-۲۴).

جدول ۰-۲۳- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری **IS02** بر باکتری **IS03**

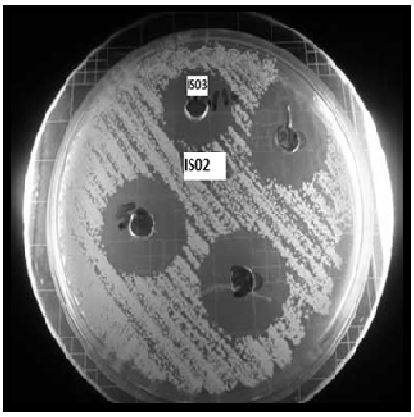
قطر هاله عدم رشد / حجم عصاره **IS02**	10µl	20µ	30µl	50µl
IS03	6.44	6.84	8.23	11.13



تصویر ۰-۱۴- نمایی از اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری **IS02** بر باکتری **IS03**

جدول ۰-۲۴- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری **IS03** بر باکتری **IS02**

قطر هاله عدم رشد / حجم عصاره **IS03**	10µl	20µ	30µl	50µl
IS02	17.43	18.21	19.71	20.36



تصویر ۰-۱۵- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری **IS02** بر باکتری **IS03**

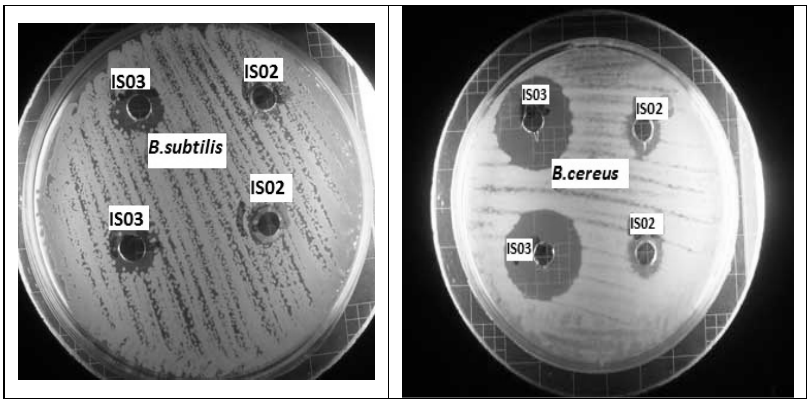
هر دو باکتری IS02 و IS03 دارای اثر آنتاگونیستی بر روی باکتری *B.cereus* بودند ولی اثر آنتاگونیستی باکتری IS03 دو برابر باکتری IS02 بود و همچنین باکتری IS02 بر روی باکتری *B.subtilis* اثر ممانعت کننده از رشد نداشت ولی باکتری IS03 دارای اثر آنتاگونیستی بر روی این باکتری بود(جدول ۰-۲۵، جدول ۰-۲۶).

جدول ۰-۲۵- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS02 بر باکتری های *B.cereus* و *B.subtilis*

نام باکتری / قطر هاله عدم رشد (mm)	*B.cereus*	*B.subtilis*
1	9.59	0
2	9.4	0
3	9.72	0
میانگین	9.57	0

جدول ۰-۲۶- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری IS03 بر باکتری های *B.cereus* و *B.subtilis*

نام باکتری / قطر هاله عدم رشد (mm)	*B.cereus*	*B.subtilis*
1	20.54	10.93
2	20.53	9.83
3	21.33	9.83
میانگین	20.80	10.20



تصویر ۰-۱۶- اثر آنتاگونیستی مقادیر مختلف عصاره باکتری **IS02** و **IS03** بر باکتری های ***B.cereus*** و ***B.subtilis***

۴-۱۸- ماده موثره باکتری های انتخابی

۴-۱۸-۱- توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی توسط باکتری های انتخابی

با توجه به این که pH محیط کشت ۴۸ ساعته حاوی باکتری های منتخب در محدوده خنثی اندازه گیری شد بنابراین اثر آنتی باکتریال عصاره این محیط های کشت ناشی از موادی غیر از اسید می باشد که این مواد می

توانند دارای ماهیت پروتئینی بوده و از باکتریوسین ها یا شبه باکتریوسین ها باشند و یـا متابولیـت هـای ثانویـه بـا ماهیت غیر پروتئینی مترشحه از این باکتری ها و یا کمپلکسی از هر دو باشد.

۴-۱۸-۱-۱- روش رسوب دهی پروتئین ها توسط آمونیوم سولفات

در این روش پس از ترسیب پروتئین ها توسط سولفات آمونیوم سه فاز تشکیل شد که اثـر مهارکننـدگی هر سه فاز بر روی باکتری اندیکاتور (*V. harveyi*) صورت گرفت (جدول ۰-۲۷). این سه فاز عبارتنـد از: ۱) فـاز سبک رویی که حاوی لیپیدها و سایر مواد سبک موجود در محیط است و در بسیاری مواقع لیپوپروتئین هایی بـا خواص ضد میکروبی در این فاز به دام می افتند. ۲) فاز آبی که مایع حاصل از سانتریفیوژ پروتئین هـای رسـوب داده شده با سولفات آمونیوم است و ۳) رسوب که حاوی پروتئین های ترسیب شده است.

جدول ۰-۲۷- بررسی اثر ضدمیکروبی فازهای حاصل از استخراج مواد ضدمیکروبی باکتری های منتخب توسط رسوب دهی با سولفات آمونیوم بر روی باکتری ***V. harveyi***

باکتری منتخب	IS02	IS03

نمونه / قطر هاله (mm)	۱[1]	۲[2]	۳[3]	۴[4]	۵[5]	۱	۲	۳	۴	۵
تکرار۱	۹/۲۸	۱۱/۶۴	۱۳/۲۷	۲۳/۷۸	۰	۰	۱۲/۲	۲۳/۶۵	۲۹/۴۷	۰
تکرار۲	۹/۲۷	۱۰/۱۵	۱۳/۸۶	۲۴/۶	۰	۰	۱۲/۳	۲۳/۵۶	۲۸/۶۳	۰
تکرار۳	۹/۲۶	۱۰/۳۷	۱۳/۷	۲۴/۳۴	۰	۰	۱۱/۰۴	۲۳/۲۴	۲۸/۶۶	۰
میانگین	۹/۲۷	۱۰/۷۲	۱۳/۶۱	۲۴/۴۲	۰	۰	۱۱/۸۵	۲۳/۴۸	۲۸/۹۲	۰
انحراف معیار	۰/۰۱	۰/۸	۰/۳	۰/۴	۰	۰	۰/۷	۰/۲۹	۰/۵۷	۰

[1] فاز سبک رویی

[2] فاز آبی حاصل از سانتریفیوژ پروتئین های رسوب داده شده با سولفات آمونیوم

[3] فاز رسوب در بافر پتاسیم فسفات

[4] عصاره فاقد سلول محیط کشت ۴۸ ساعته

[5] سولفات آمونیوم اشباع ۷۰ درصد به عنوان شاهد

۴-۱۸-۱-۲- تعیین میزان فعالیت زیستی فراکسیون های جداسازی شده

در هر مرحله برای هر فراکشن، مقادیر فعالیت زیستی (Activity unit)، فعالیت کل (Total activity)، غلظت پروتئین (Protein Concentration)، پروتئین کل (Total protein)، فعالیت ویژه (Specific activity)، درصد راندمان (Percent Yield)، درصد بازیافت (Recovery percent) و ضریب تخلیص (Purification fold) مطابق با فرمول های ذیل محاسبه و ثبت گردید (جدول ۰-۲۸،

جدول ۰-۲۹) با توجه به حساسیت بیشتر روش برادفورد در نتایج نهایی از اطلاعات به دست آمده از این روش استفاده شد.

$$Recoverypercent = \frac{Totalproteinoffraction}{Totalproteinofcrudeextract} \times 100$$

Total protein = Total volume (ml)×Fraction protein concentration (mg/ml)

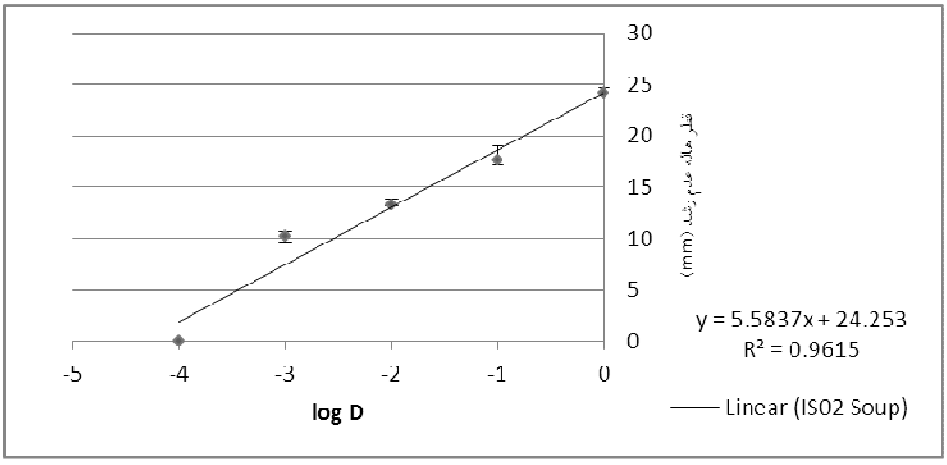
Total activity=Total volume (ml)×Activity(U/ml)

$$Specific\ activity = \frac{fraction\ activity\ (U/ml)}{Protein\ \text{concentration}\ (mg/ml)}$$

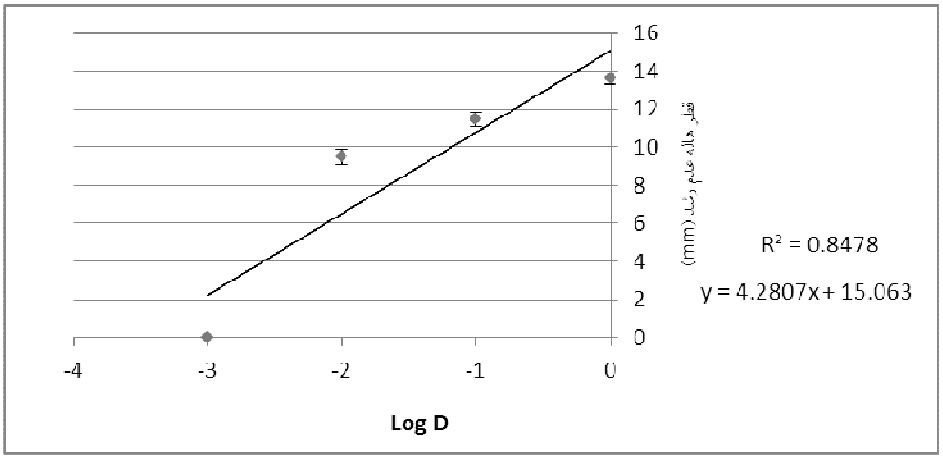
$$Purificationfactor\ (fold) = \frac{Specificactivityofpurifiedfraction}{Specificactivityofcrudeextract}$$

$$PercentYeild = \frac{Final\ AU}{Initial\ AU} \times 100$$

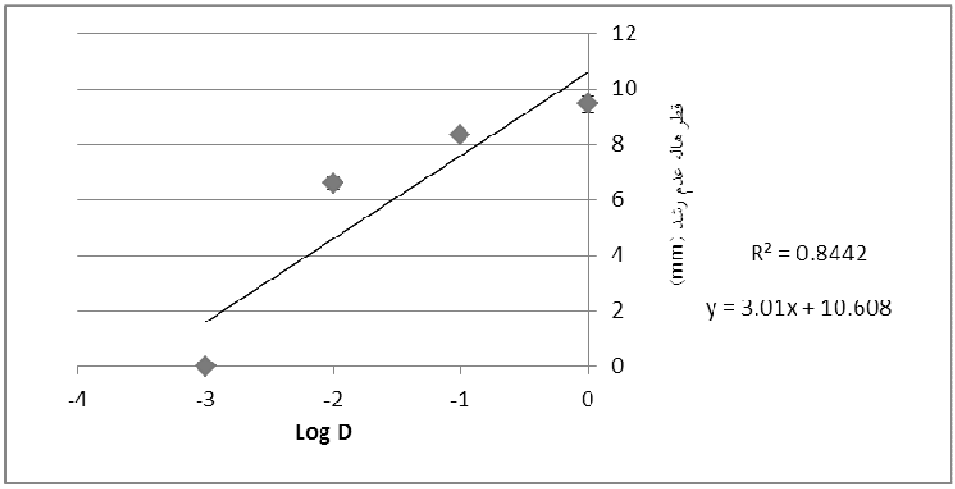
میزان فعالیت زیستی فراکشن ها مطابق با روش ارائه شده در فصل مواد و روش ها به شرح ذیل محاسبه گردید:



نمودار ۰-۳۷ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف عصاره باکتری**IS02** بر روی باکتری *Vibrio harveyi*

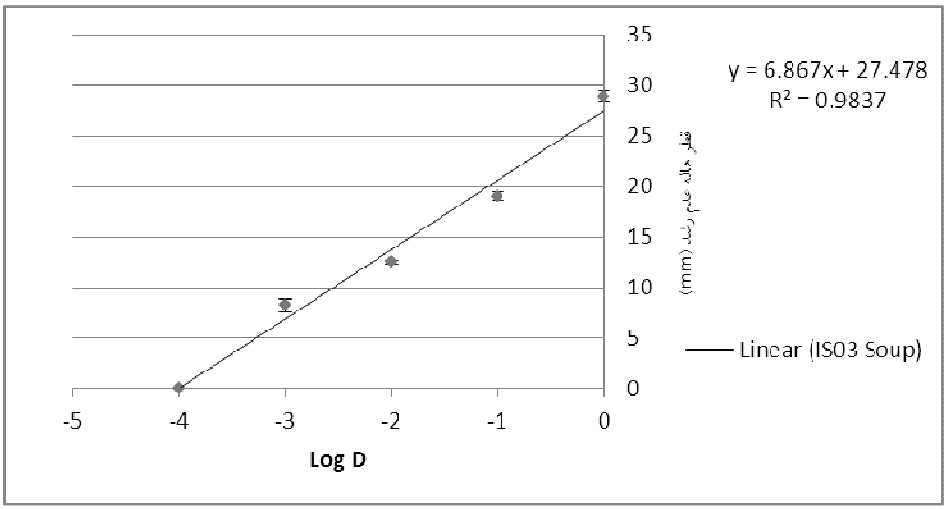


نمودار ۰-۳۸ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از ترسیب با آمونیوم سولفات عصاره باکتری**IS02** بر روی باکتری *Vibrio harveyi*

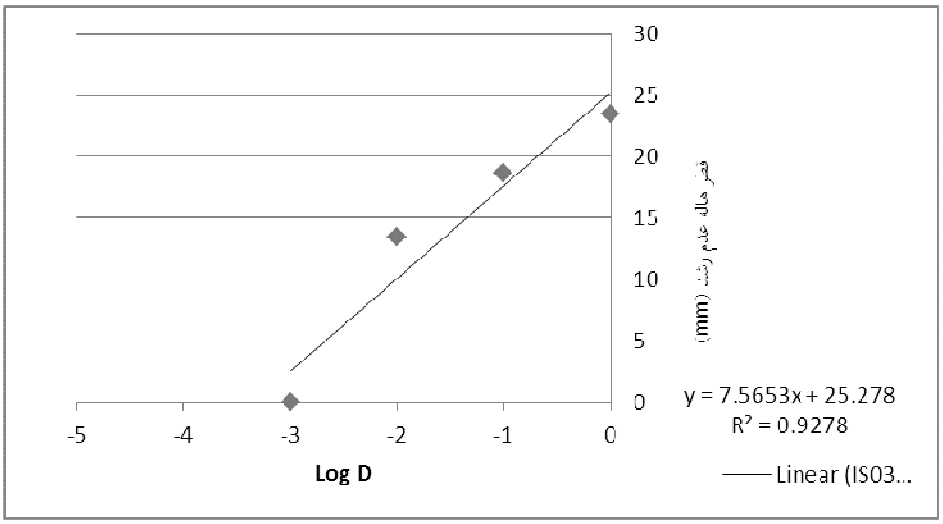


نمودار ۰-۳۹ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از دیالیز عصاره باکتری**IS02** بر روی باکتری *Vibrio harveyi*

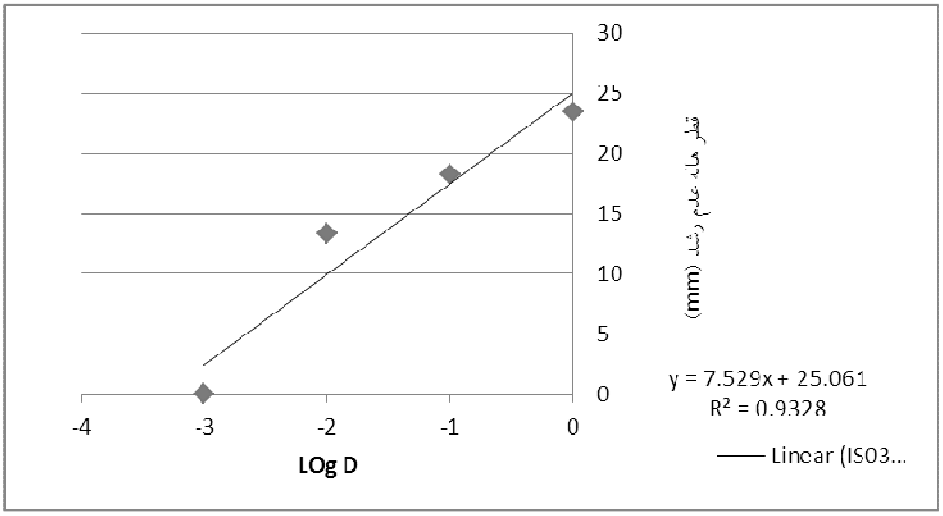
باکتری **IS03** :



نمودار ۴۰-۰- قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف عصاره باکتری**IS03** بر روی باکتری *Vibrio harveyi*



نمودار ۰-۴۱ - قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از ترسیب با آمونیوم سولفات باکتری**IS03** بر روی باکتری *Vibrio harveyi*



نمودار ۰-۴۲ -قطر هاله عدم رشد لگاریتم رقت های مختلف سوسپانسیون حاصل از دیالیز عصاره باکتری IS03 بر روی باکتری *Vibrio harveyi*

۴-۱۸-۱-۳- روش دیالیز

جدول ۰-۲۸ -داده های حاصل از مراحل مختلف استخراج پروتئین از عصاره باکتری **IS02**

باکتری **IS02**	**Culture liquid**	**Before diyalysis**	**After Dialysis**
حجم نمونه **(ml)**	30	17.202	18.261
فعالیت زیستی **(unit/ml)**	13833.12	6437.31	4845.36
فعالیت کل	414993.61	110734.61	88481.15
غلظت پروتئین **(mg/ml)**	0.3894		0.2305
پروتئین کل **(mg)**	11.682		4.21
فعالیت ویژه**(U/ml)**	35524.19		21021.09

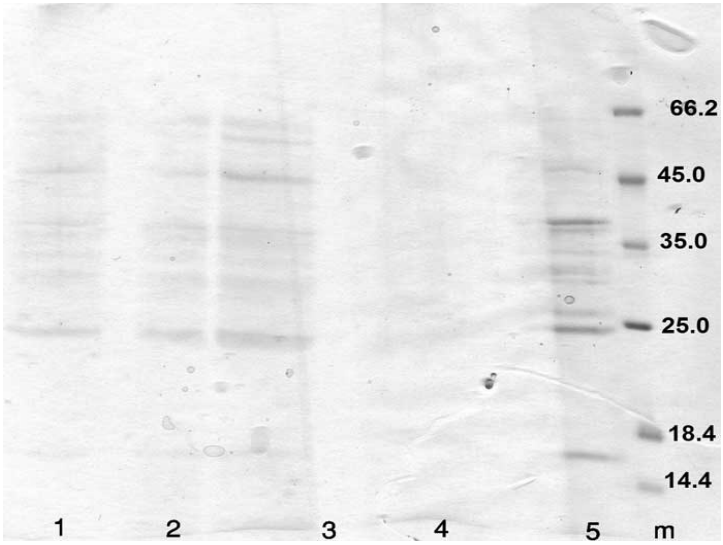
درصد راندمان	100	46.54	35.03
درصد بازیافت	100		36.03
ضریب تخلیص	1		0.592

جدول ۰-۲۹ -داده های حاصل از مراحل مختلف استخراج پروتئین از عصاره باکتری **IS03**

باکتری **IS03**	**Culture liquid**	**Before diyalysis**	**After Dialysis**
حجم نمونه **(ml)**	30	16.026	17.016
فعالیت زیستی **(unit/ml)**	3148.18	6118.69	11212.66
فعالیت کل	94445.34	98058.12	190794.56
غلظت پروتئین **(mg/ml)**	0.54	-	0.49
پروتئین کل **(mg)**	16.323	-	8.3820816
فعالیت ویژه**(U/ml)**	5786.03	-	22762.19
درصد راندمان	100	194.36	356.16
درصد بازیافت	100	-	51.35
ضریب تخلیص	1	-	3.93

۴-۱۸-۱-۴- الکتروفورزیس به روش **SDS-PAGE**

در نتایج حاصل از الکتروفورزیس باکتری IS02 هیچ باندی نشانولی مواد حاصل از دیالیز باکتری IS03 دو باند مشخص شد که باند اول در محدوده وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون و باند دوم در محدوده وزن مولکولی ۴۵-۳۵ کیلو دالتون بود (تصویر ۰-۱۷).



تصویر ۰-۱۷- ژل الکتروفورزیس عصاره باکتری **IS03**

۱: عصاره باکتری **IS03** نگهداری شده در دمای $-20^{\circ}C$

۲: عصاره باکتری **IS03** نگهداری شده در دمای $4^{\circ}C$

۳: عصاره باکتری **IS03** لئوفلیزه

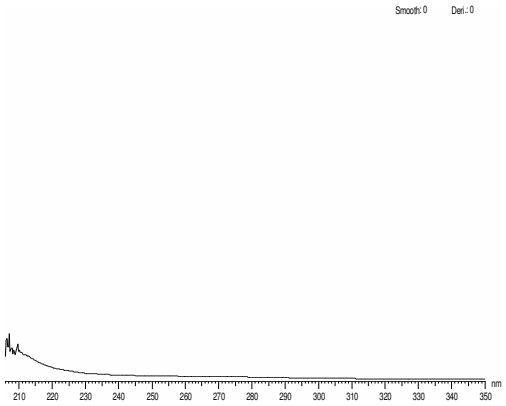
۴: عصاره باکتری **IS03** ترسیب شده با سولفات آمونیوم

۵: عصاره باکتری **IS03** دیالیز شده

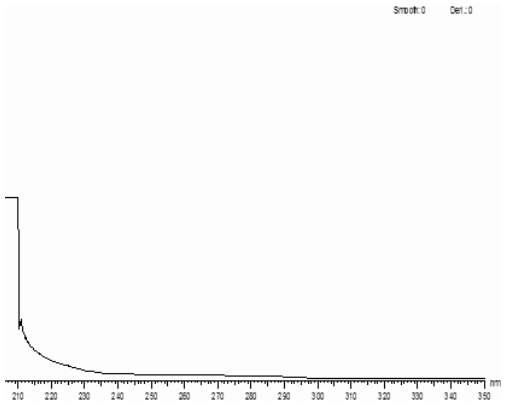
m: مارکر

۴-۱۸-۱-۵- طیف سنج ماورای بنفش نمونه های تهیه شده

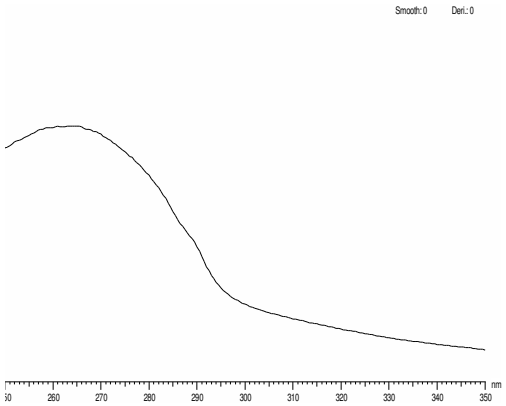
بر اساس نمودار طیف سنجی نمونه باکتری IS02 و IS03 در حلال های استونیتریل، دی کلرومتان، هگزان، کلروفرم و متانول بهترین طیف مشاهده شده برای هر دو باکتری در متانول و هگزان بود که نمودار آن ها در ذیل آورده شده است(نمودار ۰-۴۵، نمودار ۰-۴۶، نمودار ۰-۴۹، نمودار ۰-۵۰). عصاره باکتری IS02 در کلروفرم و عصاره باکتری IS03 در دی کلرومتان حل نشد.



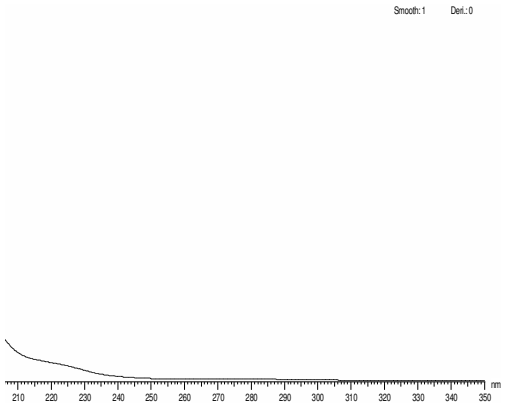
نمودار ۰-۴۳- طیف نوری عصاره باکتری **IS02** در دی کلرومتان



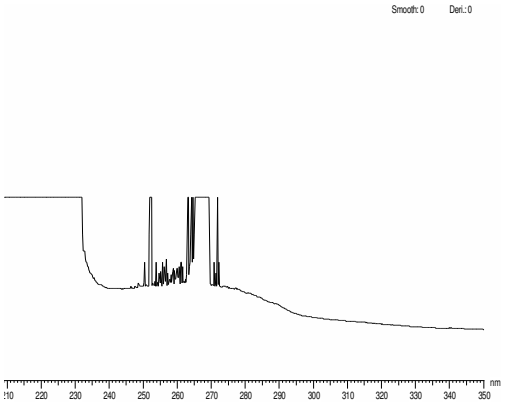
نمودار ۰-۴۴- طیف نوری عصاره باکتری **IS02** در استونیتریل



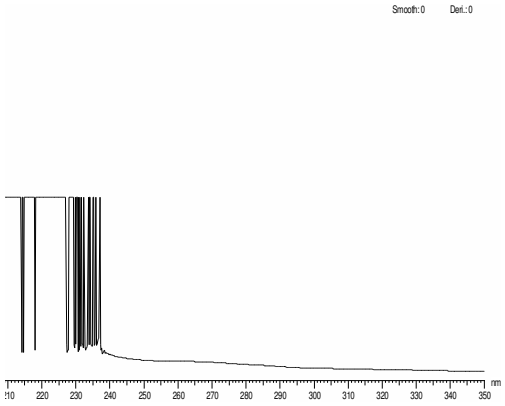
نمودار ۰-۴۵- طیف نوری عصاره باکتری **IS02** در متانول



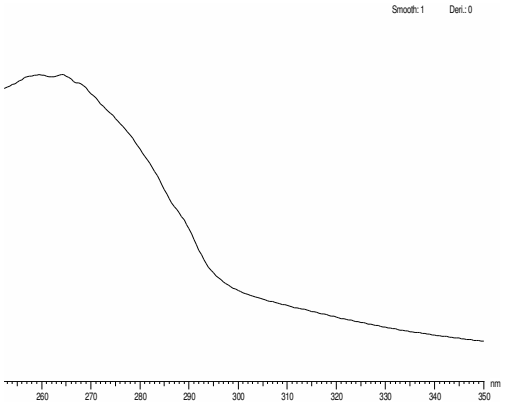
نمودار ۰-۴۶- طیف نوری عصاره باکتری **IS02** در هگزان



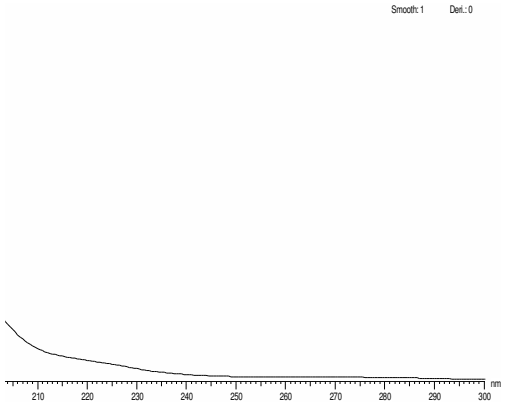
نمودار ۰-۴۷- طیف نوری عصاره باکتری **IS03** در استونیتریل



نمودار ۰-۴۸- طیف نوری عصاره باکتری IS03 در کلروفرم



نمودار ۰-۴۹- طیف نوری عصاره باکتری **IS03** در متانول



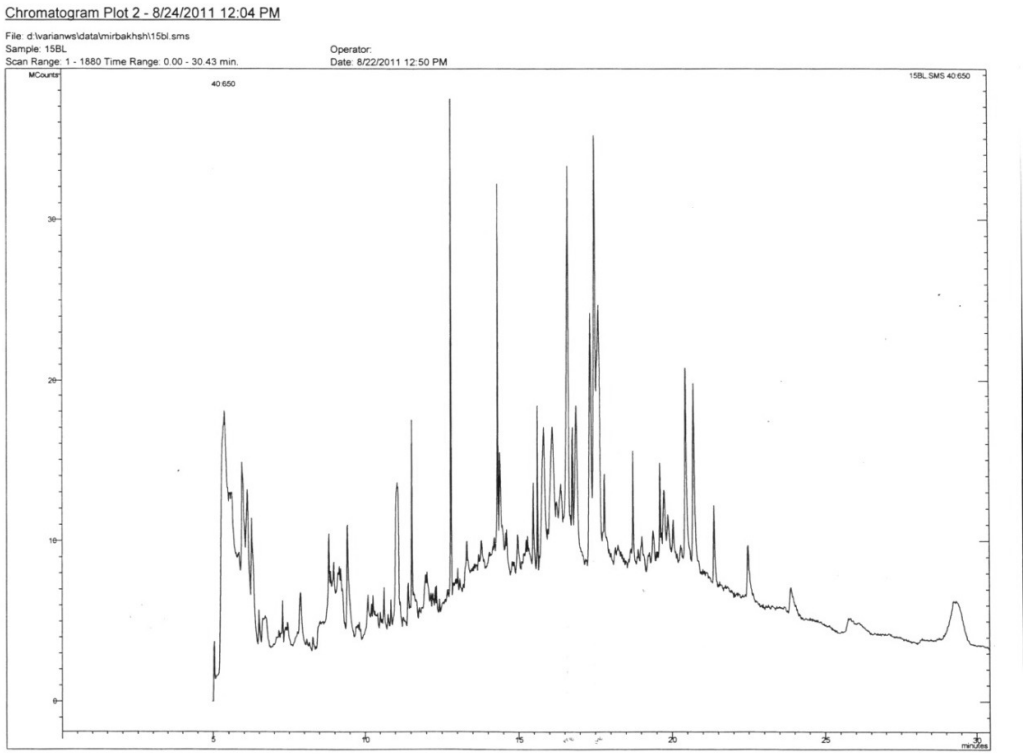
نمودار ۰-۵۰- طیف نوری عصاره باکتری **IS03** در هگزان

۴-۱۸-۲- بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی با ماهیت غیرپروتئینی توسط باکتری های انتخابی

۴-۱۸-۲-۱- گاز کروماتوگرافی جرمی(**GC-MS**) عصاره باکتری های منتخب

باکتری IS02 :

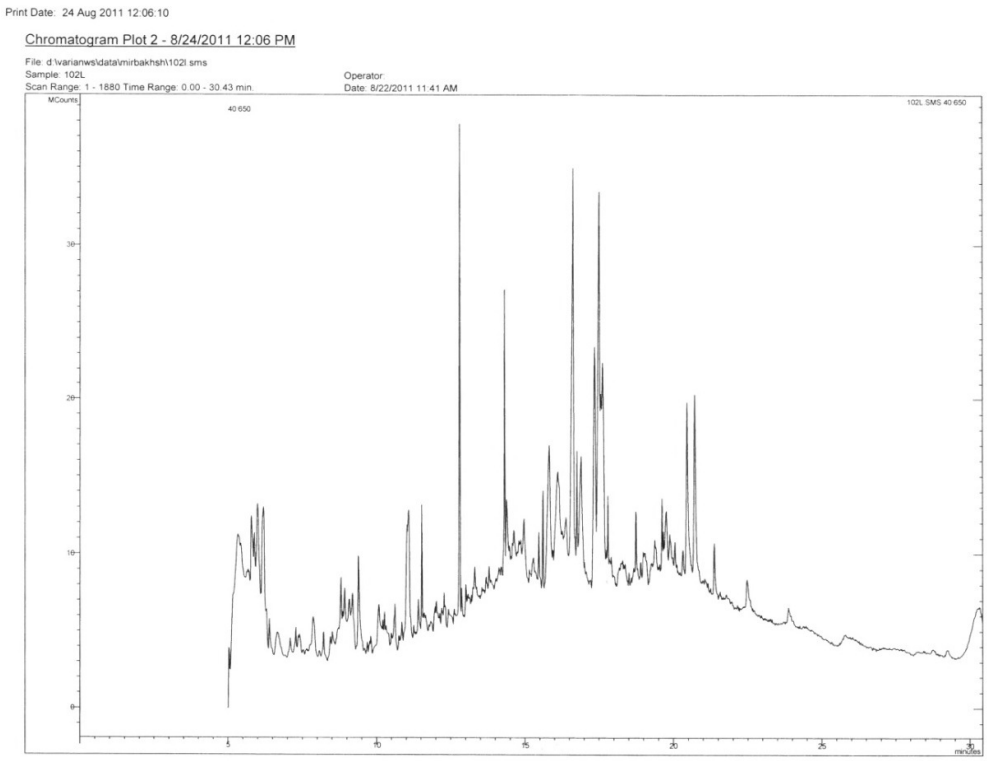
بر اساس نمودار کروماتوگرام (نمودار ۰-۵۱) بزرگترین پیک با احتمال ۹۰ درصد مربوط به ماده شیمیایی Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl با درصد خلوص ۶۷٪ و میزان ۰/۴۲۴ درصد می باشد و پیک بعدی مربوط به (Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl با درصد خلوص ۶۹٪ و میزان ۰/۸۸۸ درصد می باشد.



نمودار ۰-۵۱- کروماتوگرام عصاره باکتری **IS02**

باکتری IS03 :

بر اساس نمودار کروماتوگرام (نمودار ۰-۵۲بزرگترین پیک با احتمال ۹۰ درصد مربوط به ماده شیمیایی Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl با درصد خلوص ۶۷٪ و میزان ۰/۴۲۴درصد می باشد و پیک بعدی با احتمال ۹۰ درصد مربوط به ماده شیمیایی(Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl با درصد خلوص ۶۸٪ و میزان ۱/۰۱درصد می باشد.



نمودار ۰-۵۲- کروماتوگرام عصاره باکتری IS03

فصل پنجم

بحث

بحث

چهل درصد تولید آبزیان جهان از آبزی پروری بدست می آید که ارزشی حدود ۷۸ میلیارد دلار دارد (FAO, 2007). به دلیل صید بی رویه از آب های جهانی و افزایش تقاضا برای غذاهای دریایی تولیدات آبزی پروری اهمیت فزاینده ای یافته است. یکی از عواملی که نقش مهمی در کاهش این تولیدات دارد بیماری های ناشی از گونه های ویبریو (*Vibrio spp.*) و ائروموناس (*Aeromonas spp.*) می باشد. در صنعت آبزی پروری و به ویژه سیستم های پرورش میگوی متراکم، از داروهای ضد میکروبی برای پیشگیری از بروز بیماری ها و افزایش شاخص های رشد (Phillips, et al., 2004; Wierup, 2001; Witte, 2000) استفاده می شود که این امر سبب افزایش سویه های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج به خصوص در آسیا گشته است (Karunasagar, et al., 1994; Moriarty, 1999).

امروزه توجه زیادی به کاربرد پروبیوتیک ها به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها و مواد ضد میکروبی شیمیایی در پرورش آبزیان شده است و محصولات تجاری بسیاری به ویژه در صنعت تکثیر و پرورش میگو در دسترس است که این محصولات در برابر شوری و دمای بالای آب که خاص استان های جنوب کشور می باشد از کارایی لازم برخوردار نمی باشند و همچنین ورود آن ها به آب مراکز تکثیر و پرورش میگو در واقع مساوی است با معرفی یک جنس یا گونه باکتری جدید به اکوسیستم های آبی پیرامون که سبب برهم زدن تعادل اکوسیستم های میکروبی می گردد. شواهد روشنی مبنی بر این که پروبیوتیک های جداسازی شده از فلور بدن یا زیستگاه یک آبزی بهتر از سایر سویه های پروبیوتیکی باشند وجود ندارد اما از نظر علمی و با بهره گیری از دانش اکولوژی میکروبی بهترین مکان برای جستجوی یک پروبیوتیک مفید فلور بدن یا زیستگاه آن جانور (آبزی) می باشد (Verschuere, et al., 2000). لذا در این پروژه با جداسازی، شناسایی و غربالگری سویه های باکتریایی بومی که دارای قابلیت های کاربردی به عنوان پروبیوتیک هستند از دستگاه گوارش میگو و زیست بوم آن صورت گرفت.

بر اساس نتایج حاصل از شمارش باکتری ها در طی فصل پرورش در سایت های منتخب، اختلاف معنی داری بین میزان تعداد کل باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری (p=0.883) و باکتری های خانواده ویبریوناسه در سه سایت وجود ندارد (p=0.162)، بنابراین دوز پروبیوتیکی که در سایت ها مورد استفاده

قرار می گیرد در شرایط معمول یکسان خواهد بود. البته میانگین فراوانی باکتری ها در سایت مند کمتر از سایت های حله و دلوار بود که این امر می تواند ناشی از جدید بودن استخرهای این سایت نسبت به دو سایت دیگر باشد. همچنین بیشترین میزان فراوانی باکتری های هتروتروف و خانواده ویبریوناسه در دستگاه گوارش میگوها و نمونه های آب و رسوب در ماه مهر دیده شد که به دلیل افزایش وزن میگو ها و به تبع ازدیاد مواد دفعی در بستر استخرها امری طبیعی بوده و در ماه های آخر نیاز به تجویز میزان بیشتری پروبیوتیک به استخرها می باشد.

میگوهای مورد بررسی در محدوده وزنی (۱۷/۰۷-۰/۲۵)گرم بود بنابراین استفاده از این باکتری های منتخب درمحدوده وزنی مذکور می تواند مناسب باشد.

بر اساس مطالعات Zobell و Uphan (۱۹۴۴) بیش از ۸۰ درصد باکتری های دریایی گرم منفی هستند (ZoBell & Upham, 1944). در این پژوهش نیز از مجموع ۵۷۰ نمونه مورد آزمایش، ۱۹۸ ایزوله باکتریایی بر اساس شکل کلونی و غالب بودن آن ها جداسازی گردید که ۶۳/۶ درصد آن ها باسیل گرم منفی و ۲۶/۳ در صد آن ها باسیل گرم مثبت بودند و طبق گزارشات موجود در زمینه میکروبیولوژی دریاها اکثر این باکتری های گرم منفی متعلق به جنس ویبریوناسه می باشند که از باکتری های غالب دستگاه گوارش سخت پوستان از جمله میگو محسوب می شوند (Direkbusarakom, et al., 1997). در این تحقیق نیز از بین باکتری های جداسازی و شناسایی شده به ترتیب جنس .*Vibrio* sp و .*Bacillus* sp بیشترین فراوانی را داشتند.

آزمایشات برون تن

۵-۱- غربالگری اولیه

تحقیقات صورت گرفته بر روی پروبیوتیک ها به غربالگری پروبیوتیک هایی که علیه پاتوژن ها عمل می کنند ، متمرکزشده است و شاید علت آن مشکلاتی باشد که باکتری های پاتوژن در محیط زیست آبزیان ایجاد می نمایند و بیشتر این پژوهش ها به بررسی فعالیت ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی می پردازند (Chythanya, et al., 2002; Hjelm, et al., 2004; Sugita & Shibuga, 1996). در حال حاضرچهار روش رایج برای غربالگری مواد در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد : روش کشت دو لایه[۱]، روش انتشار در آگار (گوده)[۲]،

[۱] Double layer method

[۲] well diffusion method

روش کشت متقاطع[۳] و روش انتشار از دیسک[۴]، که هر یک از این روش ها مزایا و معایبی دارند ((Aditya Kesarcodi-Watson, et al., 2008; Aditya Kesarcodi-Watson, et al., 2009). طبق گزارش Paulo و همکارانش روش انتشار در آگار حساسیت بیشتری نسبت به روش انتشار از دیسک دارد زیرا در روش انتشار از دیسک، به دلیل رسوب مواد نامحلول در آب و یا جذب مواد ضد میکروبی کاتیونیک به گروه های هیدروکسیل کاغذ دیسک می تواند مانع از انتشار مواد ضد میکروبی به آگار گردد (Paulo, 2007). در این مطالعه برای انتخاب پروبیوتیکی که در محیط زیست آبزی و دستگاه گوارش قادر به تولید مواد ضد میکروبی باشد از روش انتشار در آگار استفاده شد. یکی از مسائل مهمی که در انتخاب پروبیوتیک در پرورش آبزیان باید در نظر گرفته شود اثرات متابولیت های حاصل از پروبیوتیک بر محیط زیست آبی و در مورد کف زیان رسوبات بستر محل پرورش می باشد زیرا کیفیت آب و بستر محل پرورش تاثیر مستقیم بر شاخص های رشد و سلامت آبزی دارد در حالیکه این تاثیر محیط زیست بر شاخص های رشد و سلامت در مورد جانوران خشکی زی بدین شدت نمی باشد (Aditya Kesarcodi-Watson, et al., 2008). اگرچه باکتری های دارای توانایی کلونیزاسیون بوده و پژوهش های انجام گرفته به ویژه بر روی پروبیوتیک های مورد استفاده در جاندرارا خشکی زی به توانایی اتصال باکتری ها به روده تمرکز کرده است امّا باکتری هایی که عضو گذرا و موقت روده می باشند نیز دارای آثار مفیدی بروی میزبان آبزی و محیط پیرامون آن می باشند (Isolauri, et al., 2004). علاوه بر این، پروبیوتیک می تواند فقط از یک طریق عمل کند و نیازی نیست که حتماً توانایی اتصال به مخاط و تولید مواد ضد میکروبی را به صورت توام داشته باشد.

لذا در این پژوهش غربالگری بر اساس بررسی اثرات متابولیت های ضد میکروبی بر روی باکتری پاتوژن میگو صورت گرفت. با توجه به هدف این مطالعه که انتخاب پروبیوتیک بومی بود در آزمون های برون تن و درون تن انجام شده از باکتری پاتوژن *V.harveyi* سویه IS01 (GenBank accession number GU974342.1) و PTCC 1755 که بومی بوده و از میگوهای بیمار مراکز تکثیر و پرورش میگوی استان بوشهر جداسازی و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفته بود استفاده گردید (Mirbakhsh, Ghaednia, Afsharnasab, & Yeganeh, 2012).

---

[۳] Cross - streak method

[۴] Disk diffusion method

از مجموع ۱۹۸ سویه جداسازی شده، طی غربالگری اولیه فقط ۱۴ سویه توانایی تولید متابولیت های ضد میکروبی علیه ویبریو هاروی را داشته و این اثر را تا حداقل تا ۷۲ ساعت حفظ کردند از بین این سویه ها ۱۰ ایزوله متعلق به جنس باسیلوس (۷۱/۴۳٪) بودند که تائیدی بر قابلیت باسیلوس ها در تولید طیف وسیعی از متابولیت ها است (**Abriouel, et al., 2011; Bairagi, et al., 2004; Jose Luis Balcazar, et al., 2007; Cladera-Olivera, et al., 2004; Olivier Decamp, Moriarty, & Lavens, 2008; Duitman, Hamoen, & Rembold, 1999**).

در طی غربالگری ثانویه که با هدف انتخاب پروبیوتیکی با بیشترین هاله عدم رشد علیه ویبریو هاروی، ماندگاری هاله عدم رشد تا یک هفته، آسانی نگهداری باکتری در یخچال و فریزر انجام شد دو باکتری انتخاب شدند که باکتری S 169 از روده و باکتری Ju 102 از رسوبات بستر استخر جداسازی شده بودند. هاله ممانعت از رشد باکتری S 169 (IS02) و باکتری Ju 102 (IS03) بر روی باکتری ویبریو هاروی (PTCC 1755) به ترتیب ۲۶/۲۰ و ۲۹/۵ میلی متر بود که قابل قیاس با هاله ممانعت از رشد دو آنتی بیوتیک رایج درصنعت پرورش میگو یعنی دیسک تتراسیکلین (۲۷/۰۴ میلی متر) و اکسی تتراسایکلین (۲۷/۱۳ میلی متر) بر این باکتری بود که نشانگر قابلیت بالای این دو باکتری و عصاره آن ها به عنوان جایگزین این رو آنتی بیوتیک می باشد. کوتاه بودن فاز آغاز رشد[۵] یکی از شاخص های یک پروبیوتیک مناسب می باشد (**V. N. Gordon, 2004**) که هر دو باکتری منتخب دارای این ویژگی بودند. طبق گزارش Delgado و همکاران (۲۰۰۵) آغاز تجمع مواد فعال زیستی در طی فاز لگاریتمی رشد باکتری اتفاق می افتد و بیشترین تیتر در محیط کشت اغلب در فاز سکون دیده می شود و تولید این متابولیت ها گاه تا ۴۸ ساعت طول می کشد و سپس متوقف شده و به مرور زمان کاهش می یابد (Delgado, et al., 2005) در این پژوهش نیز بیشترین میزان تولید ماده ضدمیکروبی در باکتری IS02 و IS03 در فاز ایستایی بود و بر اساس آزمون همبستگی پیرسون در باکتری IS02 و IS03 همبستگی قوی بین زمان و زی توده باکتریایی وجود داشت که نشان دهنده تولید مناسب زی توده باکتریایی در طی فرایند رشد می باشد.

۵-۲- اثر شوری، دما و اسیدیته بر تولید ماده ضد میکروبی

با توجه به این که حداکثر و حداقل دمای آب در طول دوره پرورش میگو به ترتیب ۳۴°C و ۲۶°C و بیشترین و کمترین میزان شوری آب در طی دوره پرورش۵۶ppt و ۴۱ ppt می باشد همچنین نوسانات pH در

[۵] Lag phase

محدوده (۸/۲۶-۷/۳۶)،آزمون های سینتیک رشد باکتری های منتخب و ماندگاری ماده ضد میکروبی آن ها در این گستره از دما، شوری و pH انجام گرفت.

اثر شوری بر تولید ماده ضد میکروبی

تولید متابولیت های باکتریایی به خصوص باکتریوسین ها نتیجه مجموعه فاکتورهای مختلف به ویژه فاکتورهای محیطی مانند اسیدیته و دما است (Delgado, et al., 2005; Rajaram, et al., 2010). در بررسی که توسط Gordon و همکاران (۱۹۹۸، ۲۰۰۵) بر روی باکتریوسین تولید شده از جمعیت های *E.coli* موجود در نمونه های کلینیکی و محیطی صورت گرفته است میزان تولید باکتریوسین از ۱۰ الی ۸۰ درصد متغیر بود و بستگی به محل یا میزبانی که باکتری از آن جداسازی شده، رژیم غذایی میزبان، تغییرات دمایی و نوع باکتریوسین داشته است (Gillor, Etzion, & Riley, 2008; D. Gordon, Riley, & Pinou, 1998; D. M. Gordon, Oliver, & Littlefield-Wyer, 2007). Ansari و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند بیشترین میزان تولید مواد آنتی باکتریال توسط باکتری *B. subtilis* KIBGE در NaCl ۰/۵ درصد می باشد و با افزایش درصد نمک تولید این مواد کاهش می یابد (Ansari, Aman, Siddiqui, Iqbal, & Qader, 2012). فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی مترشحه از باکتری IS02 در شوری های مختلف ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ppt با هم اختلاف معنی داری نداشتند ($p>0.05$) ولی در شوری ppt ۵۵ علی رغم رشد خوبی که باکتری داشت، فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی به صفر رسید و احتمالاً این شوری مانع از بیان ژن و تولید این مواد ضد میکروبی می گردد. باکتری IS02 تا شوری ۴۵ppt فعالیتش را در محل تکثیر و پرورش میگو می تواند حفظ کند و با توجه به این که از روده جداسازی شده و در شوری(۱۵الی ۲۵) نیز فعالیت خوبی دارد قابل استفاده در سایت پرورش میگوی وانامی در شمال کشور نیز می باشد.

فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS03 در شوری ۴۵ppt بیشتر از سایر شوری ها بود ولی برخلاف باکتری IS02 خواص آنتی باکتریالش را تا شوری ۵۵ppt به خوبی حفظ کرد. میزان رشد این باکتری در شوری۵۵ ppt کمی کاهش داشت ولی میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی افزایش نشان داد. بنابراین در مواقعی شوری آب استخر ها بیش از ۴۵ ppt است می توان از باکتری IS03 استفاده نمود.

اثر دما بر تولید ماده ضد میکروبی

دما یکی از فاکتور های مهم در تولید متابولیت های باکتریایی به خصوص باکتریوسین ها می باشد (Gillor, et al., 2008). Aasen و همکاران (۲۰۰۰) اعلام نمودند که بیشترین میزان تولید باکتریوسین Sakacin P توسط باکتری *Lactobacillus sakei* در دمای ۲۰ درجه است (Aasen, et al., 2000). طبق گزارش Ansari و همکاران (۲۰۱۲) نیزبیشترین میزان تولید باکتریوسین و فعالیت ضد باکتریایی باکتری *B. subtilis* KIBGE در دمای ۳۷ درجه می باشد (Ansari, et al., 2012).در این پژوهش نیز بیشترین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی و رشد باکتریIS02 و IS03 در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بود.

اثر اسیدیته بر تولید ماده ضد میکروبی

طبق یافته های تحقیقاتی بسیاری از پژوهشگران متابولیت های باکتریایی از جمله باکتریوسین و بیوسورفکتانت توسط سویه های باسیلوس به ویژه *B. subtilis* درpH خنثی و گاه قلیایی بیشتر از pH <۴ می باشد، به عنوان مثال باکتری *B. subtilis* KIBGE در pH ۷ بیشترین میزان باکتریوسین را تولید می کند (Ansari, et al., 2012; Barlow et al., 2007; Khalil, Djadouni, Elbahloul, & Omar, 2009; Suwansukho, Rukachisirikul, Kawai, & H-Kittikun, 2008). در این پژوهش بیشترین میزان فعالیت ویژه مواد ضد میکروبی باکتری IS02 در pH ۷ بود و کمترین آن در pH ۹ بود و در pH ۵ علی رغم رشد کمتر نسبت به سایر اسیدیته ها از فعالیت آنتی باکتریال خوبی برخوردار بود..

با توجه به این که باکتری های منتخب در گستره دما، شوری و اسیدیته آب و رسوب مراکز پرورش میگو قابلیت تولید مواد آنتی باکتریال را دارند بنابراین هر دو باکتری از نظر سازگاری با شرایط اکولوژیک منطقه، قابلیت بکارگیری به عنوان یک پروبیوتیک مناسب در این صنعت را دارا می باشند.

۵-۳- ماندگاری ماده ضد میکروبی در دما، شوری و اسیدیته های مختلف

گزارشات زیادی در رابطه با میزان ماندگاری متابولیت های باکتریایی به ویژه باکتریوسین ها در شرایط مختلف وجود دارد به عنوان مثال بر اساس یافته های Jung و همکاران (۲۰۰۸)، باکتریوسین تولید شده از *B. thuringiensis* گستره دمایی از ۴ تا ۱۰۰ درجه را به خوبی تحمل می کند ولی در دمای ۱۲۱ درجه فعالیت آن به صفر می رسد (Jung, et al., 2008). Ghanbari و همکاران گزارش کردند سویه ای از *B. cereus* جداشده از ماهی باکتریوسینی تولید می کند که در pH ۴ الی ۹ و دمای ۸۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه فعال است (Ghanbari, Rezaei, Soltani, & Shah-Hosseini, 2009). در گزارشی دیگر ماندگاری باکتریوسین جداسازی شده از باکتری *B.*

amyloliquefaciences خمیر سویای تخمیر شده در اسیدیته ۱۲-۲ و دمای ۸۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه اعلام گشته است و همچنین این باکتریوسین در دمای ۱۰۰ درجه پس از ۱۵ دقیقه غیرفعال می شود (Lim, et al., 2011). در این پژوهش فعالیت ویژه مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری IS02 و IS023 در رنج وسیعی از شوری بود و کمترین میزان آن در شوری ppt ۵۷ مشاهده شد همچنین مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط IS02 در دمای ۸۵ درجه پس از ۱۰ و ۲۰ دقیقه کمترین میزان فعالیت زیستی را داشت و در دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه این میزان به صفر رسید. فعالیت زیستی مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری IS03 در دمای ۷۵ و ۸۵ درجه پس از ۱۰ و ۲۰ دقیقه کمترین میزان را داشتند ولی در دمای ۶۵ درجه بیشترین میزان فعالیت ویژه را نشان دادند و مانند باکتریIS02 در دمای ۱۰۰ و ۱۲۱ درجه فعالیت ویژه به صفر رسید.

مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری های IS02 و IS03 در pH ۱۲ به صفر رسید و در pH ۲ کاهش داشت ولی در سایر رنج های pH فعالیت ویژه خوبی داشتند.

لذا با توجه به ماندگاری مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری های منتخب در گستره وسیعی از دما، شوری و اسیدیته می توان با تولید مواد ضد میکروبی حاصل از این باکتری ها به صورت محلول عاری از سلول و یا پودر لئوفلیزه شده در مقیاس نیمه صنعتی و در آینده صنعتی به عنوان مکمل غذایی در تهیه غذای میگو و یا جایگزین آنتی بیوتیک در مراکز و مزارع استفاده نمود.

۵-۴- شناسایی مولکولی باکتری های انتخابی

امروزه، مصرف کنندگان و مراجع قانونی نیاز به روش های حساس و قابل اعتماد برای تشخیص و شناسایی محتوای میکروبی پروبیوتیک های مورد استفاده در صنعت آبزی پروری دارند (McCartney, 2002). روش های مرسوم که بر پایه خصوصیات فنوتیپی نیازهای رشد، پروفایل تخمیر و مطالعات سرولوژی است دارای یک سری نقایصی می باشد و امروزه تکنیک های انگشت نگاری مولکولی مختلف و ماکرهای ژنتیکی متعددی در تشخیص زیرگونه ها و سویه استفاده می شوند (Fasoli et al., 2003; Huys et al., 2006). روش های مولکولی مانند سکانس ژن 16S rDNA و پروب های الیگونوکلئوتید را می توان برای نامگذاری و شناسایی صحیح پروبیوتیک ها در حد سویه استفاده کرد (Yeung, Sanders, Kitts, Cano, & Tong, 2002). تشخیص قابل

اعتماد پروبیوتیک ها نیازمند روش های مولکولی با قدرت تمایز بالای تاکسونومیک و در ارتباط با کتابخانه های به روز دنیا است.

در این پژوهش نیز برای اولین بار در صنعت آبزی پروری به شناسایی مولکولی باکتری های با قابلیت پروبیوتیکی بر اساس سکانس ژن 16S rDNA پرداخته شد و هر دو باکتری متعلق به جنس *Bacillus* sp. بودند. بر اساس نظر Priest (۱۹۹۳) سویه هایی مانند *Bacillus licheniformis* (Weigmann1898) و *B. Subtilis* (Ehrenberg 1835) پراکنش جهانی داشته و فلور غالب اکوسیستم دریایی می باشند. باسیلوس ها عمدتاً در رسوبات بیشتر از ستون آب می باشند و در سطوح پایین تر، اسپور باسیلوس ها بیش از ۸۰ درصد فلور هتروتروف را تشکیل می دهند (Priest, 1993). گزارشات بسیاری از حضور باسیلوس ها در رسوبات وجود دارد (Siefert et al., 2000) بنابراین آنها براحتی توسط آبزیان کف زی مثل میگو به عنوان غذا خورده می شوند (Rengpipat, Phianphak, Piyatiratitivorakul, & Menasveta, 1998). بر اساس یافته های پژوهش حاضر دو باکتری انتخابی از رسوب و روده میگو جداسازی شده اند که با یافته های سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد. همچنین یکی از باکتری ها *B. subtilis* می باشد که پراکنش جهانی دارد و سویه آن *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* strain IS02 می باشد که بر اساس آنالیز های پیشرفته به عنوان تاکسون جدیدی از باسیلوس در سال ۲۰۰۹ معرفی شده است و یک لیپوپپتید شبیه به سورفکتین تولید می کند (Connor et al., 2010; Rooney, Price, Ehrhardt, Swezey, & Bannan, 2009)

و باکتری دیگر *Bacillus vallismotis* IS03 می باشد که برای اولین بار این گونه در حوزه آبزی پروری جداسازی و شناسایی شده است و اولین بار در سال ۱۹۹۶ از خاک کوه های آریزونا جداشده است. همچنین از نظر فیلوژنی قرابت نزدیکی با *B. subtilis* دارد(Ivanova et al., 1999). بر اساس گزارشات موجود از این باکتری می توان برای زیست پالایی و به عنوان پروبیوتیک استفاده کرد و طبق یافته های Zhoa و همکاران (۲۰۱۰) عصاره بوتانلی مایع حاصل از کشت *Bacillus vallismotis* Z 185 محتوی مخلوطی از ترکیبات ضدقارچی قوی علیه *Fusarium graminearum* است که از آن ها می توان در پیشگیری و درمان بیماری های گیاهی استفاده کرد (Zhao et al., 2010). Zheong و همکاران (۲۰۰۸) اعلام کردند متابولیت های باکتری *Bacillus vallismotis* BIT-33 با منشا دریایی دارای خواص ضد سرطانی بوده و در درمان سرطان کولون مفید است (Jeong, Park, Kim, Kim, & Lee, 2008).

هر دو باکتری جزو لیست پروبیوتیک های ایمن معرفی شده توسط کمیته ایمنی در غذای اروپا می باشند(Barlow, et al., 2007).

۵-۵- تعیین ماده موثره باکتری های انتخابی

باکتری ها متابولیت های متنوعی را تولید می کنند (Demain, 1998) که در این پژوهش با توجه به خواص آنتی باکتریال عصاره فاقد سلول کشت باکتری های IS02 و IS03 به بررسی ماهیت این مواد ضد میکروبی پرداخته شد. در طی پروسه تولید عصاره عاری از باکتری از محیط کشت باکتری ها pH عصاره ها اندازه گیری شد که همواره در محدوده۷/۴۳ الی ۷/۸۳ برای باکتری IS02 و ۶/۳۱ الی ۶/۹۹ برای باکتری IS03 بود و نشانگر این مساله بود که اثر آنتی باکتریال آن ها ناشی از تولید اسید نمی باشد. در مرحله با دو فرض آزمایشات انجام شد : ۱) مواد آنتی باکتریال ماهیت پروتئینی دارند (باکتریوسین یا شبه باکتریوسین هستند) ۲) مواد آنتی باکتریال ماهیت غیر پروتئینی دارند.

۵-۵-۱- ماهیت پروتئینی مواد ضد میکروبی

روش رسوب دهی پروتئین ها توسط آمونیوم سولفات

در مطالعه Sharma و همکاران (۲۰۱۱) از روش رسوب دهی پروتئین ها توسط آمونیوم سولفات، ژل فیلتراسیون و SDS-PAGE برای استخراج و تخلیص باکتریوسین سویه ای از باکتری *B. subtilis* استفاده شد که در کلیه مراحل فعالیت زیستی مواد تخلیص شده افزایش داشت(Sharma, et al., 2011) .

در باکتری IS02، قطر هاله عدم رشد رسوب حل شده در بافر پتاسیم فسفات (mm ۰/۳±۱۳/۶۱) بود که بسیار کمتر از قطر هاله عدم رشد عصاره عاری از سلول این باکتری بود (mm ۰/۴±۲۴/۴۲) و نشان دهنده عدم کارایی این روش در استخراج مواد ضد میکروبی این باکتری بود.

در باکتری IS03، قطر هاله عدم رشد عصاره عاری از سلول این باکتری (mm ۰/۵۷±۲۸/۹۲) بود که پس از رسوب دهی با آمونیوم سولفات اندکی کاهش (mm ۰/۲۹±۲۳/۴۸) نشان داد.

دیالیز

درصد بازیافت مواد پروتئینی در باکتری IS02 ۳۶/۰۳ درصد و در باکتری IS03 ۵۱/۳۵ درصد بود. علی رغم میزان مناسب پروتئین در نمونه های دیالیز شده باکتری IS02 نسبت به عصاره خام باکتریایی، فعالیت ویژه ۴۰/۸ درصد و فعالیت زیستی ۶۵ درصد کاهش نشان داد که نقش متابولیت های غیر پروتئینی در فعالیت زیستی این باکتری می باشد زیرا در طی مراحل تخلیص و حذف سایر متابولیت ها فعالیت زیستی کاهش داشته است. ولی در مورد باکتری IS03 میزان فعالیت ویژه و فعالیت زیستی به ترتیب ۴ و ۳/۵ برابر میزان آن در عصاره خام باکتریایی افزایش نشان داد.

الکتروفورزیس به روش SDS-PAGE

از این روش به منظور تعیین خلوص پروتئین ها در عصاره خام، عصاره حاصل از ترسیب با آمونیوم سولفات و دیالیز باکتری IS02 و IS03 استفاده شد(با ۳ تکرار).

باکتری IS02 هیچ باندی نشان نداد که می تواند ناشی از دو دلیل باشد: ۱) ژل تهیه شده با توجه به وزن مولکولی مواد پروتئینی موجود در نمونه ها مناسب نبوده است ۲) میزان پروتئین کم بوده است. البته با توجه به این که طبق گزارشات موجود باکتری های خانواده باسیلاسه به خصوص جنس باسیلوس باکتریوسین های با وزن مولکولی کم (۱۰-۰/۷۷ kDa) نیز تولید می کنند که به تغییرات دما و pH مقاوم می باشند (Abriouel, et al., 2011) دلیل اول بیشتر محتمل است به خصوص طبق نتایج حاصل از بخش های پیشین پژوهش عصاره عاری از سلول این باکتری به تغییرات دما و pH مقاومت خوبی داشت. بر اساس یافته های Xie و همکاران (۲۰۰۹)، *B. subtilis* سویهٔ LFB 112 جداسازی شده از گیاهان بومی چین، ترکیب شبه باکتریوسینی فعالی را تولید می کنند که بر روی بسیاری از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بیماریزای حیوانات اهلی مانند اشریشیا کلی، سالمونلا پولوروم، سودوموناس ائرو جینوزا، پاستورلا مولتوسیدا، کلاستریدیوم پرفرینجز، میکروکوکوس لوتئوس، استرپتوکوکوس بویس، استافیلوکوکوس اورئوس اثر ضد میکروبی دارد و بر اساس SDS – PAGE ، ملکول فعال آن ۶/۳ KDa است (Xie, et al., 2009). Yang و همکارانش (۲۰۰۷) گزارش نمودند *B. subtilis* سویهٔ Myp1 جداسازی شده از سویای تخمیری کره شبه باکتریوسینی تولید می کند که بر روی طیف وسیعی از

باکتری های گرم مثبت، مخمرها و قارچ ها مؤثر است. این ماده بـه حـرارت و اسـیدیتهٔ ۱۰- ۶ مقـاوم اسـت و وزن مولکولی تقریبی آن طبق روش tricin - SDS - PAGE حدود ۲/۴ KDa بود (Yang & Chang, 2007).

در نتایج حاصل از الکتروفورزیس مواد حاصل از دیالیز باکتری IS03 دو باند به صورت واضـح مشـخص شد که باند اول محدوده وزن مولکـولی ۲۵ کیلـو دالتـون و بانـد دوم در محـدوده وزن مولکـولی ۴۵-۳۵ کیلـو دالتون بود. بر اساس طبقه بندی باکتریوسین های باسیلوسی توسط Abriouel و همکاران (۲۰۰۹)، پلی پپتید هـای دارای خواص ضد میکروبی که وزن مولکولی آن ها (۳۰-۱۰ kDa) است به دلیل عدم وجود اطلاعاتی در زمینه توالی اسیدآمینه یا ژن آن ها در گروه مواد شبه باکتریوسینی قرار می گیرند و پـروتئین هـای بـزرگ (۳۰<kDa) دارای خاصیت فسفولیپازی بوده و در گروه III قرار می گیرند (Abriouel, et al., 2011) بنابراین باند اول کـه وزن مولکـولی بـین ۳۰-۱۰ کیلـو دالتـون دارد مربـوط شـبه باکتریوسـین هـا باشـد و بانـد دوم مربـوط بـه گـروه III باکتریوسین های باسیلوسی است.

Hammami و همکاران (۲۰۰۹) در عصاره *B. subtilis* سویهٔ K_1B جدا شده از ریزوسفر گیـاه سـالم بـادام تلخ شبه باکتریوسین Bac 14B را شناسایی کردند که خواص آنتی باکتریال علیه اگروبـاکتریوم تومفاسـینس دارد و وزن مولکولی آن در حدود ۲۱KDa می باشد و به حرارت ۱۰۰ درجه بـه مـدت ۲ سـاعت مقـاوم اسـت، ایـن باکتری و شبه باکتریوسینش در کنترل زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (Hammami, et al., 2009).

یکی دیگر از مواد میکروبی ناشناخته از *B. subtilis* LEF -1 جدا شده از مخازن نفتی برزیل تولید می شـود این ماده ضدمیکروبی مقاوم به پروتئاز ولی حساس به حرارت اتوکلاو است و وزن مولکولی آن براسـاس روش دیالیز ۱۲ KDa – ۳/۵ تخمین زده شده است (Korenblum et al., 2005).

اگرچه باکتریوسین های متعددی از سویه هـای باسـیلوس تولیـد مـی شـوند امـا هنـوز تحـت آزمـایش و ارزشیابی هستند و از مهمترین مشکلات کاربرد باکتریوسین ها در صنایع غذایی فقدان GRAS بـرای گونـه هـای باسیلوس به غیر از *B. licheniformis* و *B. subtilis* و همچنین هزینه بالای تولید در مقیاس صـنعتی آن هـا مـی باشد (Abriouel, et al., 2011).

طیف سنجی ماورای بنفش مواد ضد میکروبی

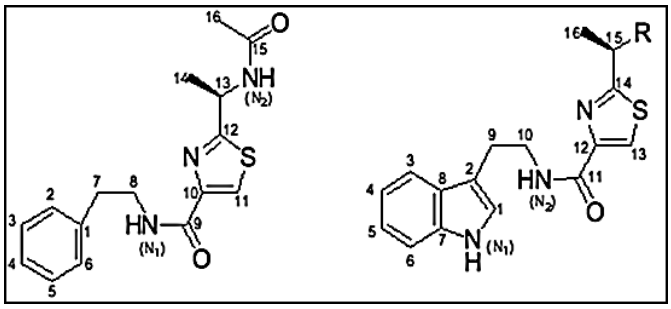
طیف سنجی مطالعه اثر متقابل پرتوی الکترومغناطیس با ماده (برای مثال ماکرومولکول حیاتی) بدون در نظر گرفتن آثار شیمیایی آن ماده است. یکی مهمترین کاربردهای طیف سنجی فرا بنفش و مرئی در ماکرومولکول های حیاتی، تشخیص مواد از نظر کمی و کیفی است. به منظور تشخیص پروتئین ها از دو طول موج در محدوده ۲۳۰ nm و ۲۸۰ nm استفاده می شود. طول موج در محدوده ۲۳۰-۱۸۰ nm [۶] مربوط به گروه های پپتیدی و در محدوده ۳۰۰-۲۴۰ nm [۷] علاوه بر طول موج های بالا مربوط به حلقه های آروماتیک اسید آمینه های تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین است همچنین پیوندهای دی سولفیدی بین دو اسید آمینه سیستئین نیز در ناحیه حدود ۲۶۰ nm جذب دارد. اسید آمینه های لیزین، آلانین و متیونین در طول موج پایین جذب دارند و از نظر آزمایشی و تجربی اندازه گیری در این ناحیه مشکل است. طیف جذبی گروه های پپتیدی و اسید آمینه های قابل تیتر آروماتیک تابع محیط است و اثر محیط سبب تغییر در طول موج، جذب و پهن شدن پیک ها می شود به عنوان مثال با کاهش قطبیت حلال طول موج به سمت نور قرمز پیش می رود و اگر طیف پروتئینی با قطبیت حلال خیلی تغییر کند گویای این مطلب است که اسید آمینه در سطح قرار دارد (Campbell & Dwek, 1984).

در نمونه IS02 و IS03 طیف حاصل در حلال قطبی (متانول) به ترتیب ۲۶۵ nm و ۲۶۳ nm بود و با توجه به موارد اشاره شده احتمالاً طیف حاصل مربوط به وجود اسید های آمینه آروماتیک و پیوندهای دی سولفیدی است. با توجه به نتایج مرحله قبل و طبقه بندی باکتریوسین های باسیلوسی طبق نظر Abriouel اگر باکتریوسین IS02 از انواع با وزن مولکولی کم می باشند شاید مربوط به زیر گروه I-4 باشد که در ساختمان آن یک پپتید حلقوی و پل سولفیدی وجود دارد و مورد اصلاحات پس از ترجمه ای قرار می گیرند (مانند سوبتیلوزین A با وزن مولکولی ۳/۳۹ kD) (Abriouel, et al., 2011; Stein, Dusterhus, Stroh, & Entian, 2004; Sutyak, et al., 2008) البته تعیین ساختار پروتئین ها و یا پپتید ها نیاز به دستگاه هایی مانند MALDI-TOF mass spectrometry دارد.

[۶] Far UV range

[۷] Near UV range

در پژوهشی از باکتری *B. vallismortis* C89 جداسازی شده از اسفنج دریایی، مواد فعال زیستی گوناگونی را شناسایی کرده اند که دارای خواص ضد میکروبی قوی بوده و موثر در کنترل زیستی دینوفلاژله *Cochlodinium polykrikoides* عامل کشند قرمز می باشد و با توجه به ساختار مواد فعال زیستی جداسازی شده از باکتری *B.vallismortis* C89 (تصویر ۰-۱) و مقایسه آن با نتایج حاصل از آزمایشات این پژوهش می توان مواد فعال زیستی جداشده از *B. vallismortis* IS03 را مشابه با سویه C89 دانست البته این امر نیاز به آزمایشات تکمیلی دقیق دارد (Z. Li, 2009; "Study on the Bioactive Compounds of Bacillus Vallismortis C89 Associated with Sponge Dysidea Avara," 2012).



Neobacillamide A (5), bacillamide C (6) (R=O,OH,NHAc)

تصویر ۰-۱- ساختار مواد فعال زیستی جداسازی شده از ***B. vallismortis* C89**

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری های انتخابی بر روی سویه های باسیلوسی

باکتریوسین ها یک گروه ناهمگن از مواد ضد میکروبی پروتئینی هستند که از انواع باکتری ها تولید می شوند (M.A. Riley & J.E. Wertz, 2002; M.A. Riley & J.E. Wertz, 2002). آن ها بصورت ویژه بر روی باکتری های هم خانوادهٔ باکتری تولید کننده مؤثرهستند البته بسیاری ازآنها دامنهٔ فعالیت وسیع تری را دارا می باشند (Jack, et al., 1995). بر اساس یافته های این پژوهش باکتری IS03 بر روی تعداد بیشتری از باکتری های هم خانواده اش نسبت به باکتری IS02 اثر بازدارنده داشت و این آزمون نیز احتمال باکتریوسین بودن مواد ضد میکروبی این باکتری را افزایش می دهد.

۵-۵-۲- ماهیت غیرپروتئینی مواد ضد میکروبی

در دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی، اجزای یک مخلوط به ترتیب توسط یک ستون کروماتوگرافی از هم جدا می‌شوند و پس از حذف گاز حاصل، وارد منبع یونش طیف سنج جرمی می‌گردند و سپس بواسطه تولید میدان های الکتریکی پر قدرت، اقدام به شناسایی کمی و کیفی اجزای مخلوط بر اساس نسبت بار الکتریکی به جرم آنها می گردد. از روش طیف سنجی به طور وسیعی در تجزیه ترکیبات آلی، بیولوژیک، پلیمری حاوی نانو ذرات طلا، فلورین‌ها و ترکیبات شاخه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌توان ساختار ترکیبات بیولوژیک در محلول را بررسی کرد (۲۰۰۳). بر اساس یافته های Pandey (۲۰۱۰) آنالیز کروماتوگرافی جرمی عصاره اتیل استاتی باکتری *V. parahaemolyticus* متابولیت های مختلفی مانند: اندول، تترا متیل پیرازین، فنیل استیک اسید و سایر ترکیبات فنلی را نشان داد (Pandey, Naik, & Dubey, 2010). پژوهشگران زیادی اثر آنتی باکتریال و ضد قارچی متابولیت های باکتریایی مختلف مانند: فنیل استیک اسید، pyrrolidine carboximidamide، pyrrolopyrazines، tetramethyl pyrazine و ترکیبات فنلی را گزارش کرده اند (Chaudhary, et al., 2006; Farzaliev, et al., 2009; Y. Kim, et al., 2004). بر اساس گزارشات موجود بسیاری از ترکیبات پیرولوپیرازین دارای خواص ضد میکروبی می باشند مانند: آنتی بیوتیک برموپیرلی[۸] جداسازی شده از *Pseudomonas bromoutilis* دریایی و کلروپیرول[۹] جداسازی شده از باکتری *Pseudomonas pyrrocinia* که پیرول نیترین[۱۰] نامیده می شود و دارای خواص قارچی علیه قارچ های درماتوفیت به ویژه اعضای جنس *Trychophyton* و بسیاری از قارچ های پاتوژن گیاهی مانند *Rhizoctonia solani* و *Fusarium sambucinum* و *Pyrenophoratritici repentis* است. نام تجاری این آنتی بیوتیک در ژاپن PYRO-ACE است و به منظور درمان عفونت های درمافیتی سطحی استفاده می شود (Bhakuni & Rawat, 2005).

بر اساس نمودار کروماتوگرام بزرگترین پیک در آنالیز کروماتوگرافی جرمی عصاره فاقد سلول باکتری های IS02 و IS03 ماده شیمیایی tetradecamethyl Cycloheptasiloxane و سپس Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) می باشد و در هر دو باکتری بیشترین درصد پیک ها مربوط به Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) می باشد و با توجه به خواص آنتی باکتریال اثبات شده

[۸] Bromo pyrrole

[۹] Chloropyrrole

[۱۰] Pyrrolnitrin

pyrrolopyrazines این احتمال وجود دارد که بخشی از خواص آنتی باکتریال باکتری های انتخابی مربوط به این متابولیت باکتریایی باشد.

اثر آنتاگونیستی باکتری های انتخابی بر یکدیگر

با توجه به این که باکتری IS03 دارای اثر ممانعت از رشد بر روی باکتری IS02 می باشد لذا احتمال استفاده همزمان دو باکتری در شرایط درون تن نمی باشد.

پیشنهاد ها

۱- بررسی دقیق تر مواد موثره باکتری ها به ویژه باکتری *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* strain IS02

۲- ارزشیابی اثر سویه های باکتریایی پروبیوتیکی منتخب بر میگوی پا سفید در شرایط درون تن

۳- بهینه سازی رشد و تولید مواد آنتی باکتریال توسط روش Response surface method و Taguchi

۴- بررسی تولید پروبیوتیک های باکتریایی و مواد ضد میکروبی آن ها در سایر گونه های میگوهای مورد استفاده در سیستم تکثیر و پرورش میگوی ایران

۵- بررسی روش های مختلف تولید محصولات پروبیوتیکی به اشکال گرانوله، پودر یا مایع و به کارگیری آن ها در صنعت تکثیر و پرورش میگوی ایران

۶- امکان سنجی بکارگیری این باکتری ها در تهیه واکسن علیه بیماری لکه سفید

۷- تدوین دستورالعمل استاندارد برای مراحل جداسازی تا انتخاب یک پروبیوتیک مناسب در کلیه صنایع به خصوص پرورش دام، طیور و آبزیان

۸- در بخش صنعت نیز می توان تولید انبوه باکتری های پروبیوتیکی منتخب و تولیدات زیستی حاصل از آن ها را جهت استفاده در صنعت پرورش میگو پیشنهاد نمود.

۹- همچنین پیشنهاد می شود، در تولید محصولات پروبیوتیکی به ویژه در عرصه آبزی پروری همانند فرایند تولید داروها تحقیقات پایه و کاربردی کامل انجام شود.

تشکر و قدردانی

از همکارانم در پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات شیلات ایران و مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران :

آقایان دکتر خسرو آئین جمشید ، آقای دکتر عباسعلی مطلبی، آقای صمد راستی ، آقای غلامحسین فقیه، آقای دکتر شکیب شمسیان، آقای کامبوزیا خورشیدیان، آقای قاسم غریبی، خانم پریسا حسین خضری، خانم سهیلا امیدی، آقای آرش حق شناس، خانم ژیلا رنجبری، آقای دکتر محمد رضا مهرابی، آقای دکتر جلیل ذریه زهرا، آقای دکتر عیسی شریف پور، آقای مهندس رضا آذربایجانی، خانم مهندس لاله پارسا یگانه و آقای دکتر رضا غفوری

برای حمایت های علمی و پژوهشی که در طول اجرای پروژه داشتند سپاسگزارم

همچنین از پرسنل امور اداری، حراست و تدارکات پژوهشکده میگوی کشور که در روند اجرای پروژه همواره حضوری فعال داشتند کمال تشکر را دارم.

فهرست منابع

۱- استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹ : سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام-راهنمای الزامات کلی برای آزمون ، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۲- استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷، سال ۱۳۸۶، آیین کارآزمون های میکروبیولوژی آب، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۳- استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸، سال ۱۳۸۶، نمونه برداری از آب برای آزمون های میکروبیولوژی-آیین کار، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۴- استاندارد ملی ایران ۷۲۲۳، سال ۱۳۸۲، آب - جستجو و شناسایی ویبریوکلرا –روش آزمون میکروبیولوژی، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۵- حسن نیا . م.ر، ۱۳۸۱. نقش باکتری پسودوموناس فلورسنس در توسعه کشت جلبک ، مجله علمی شیلات ایران ، شماره ۲ ، سال یازدهم. صفحات ۱ – ۱۶

۶- حسن نیا. م.ر، احمدی. م.ر، رضویلر. و، ۱۳۸۱. بررسی اثر باکتری *Pseudomonas fluorescence* بر بازماندگی لاروهای میگوی سفید هندی، پژوهش و سازندگی، شماره ۱۵، صفحات ۹۴ – ۹۸

۷- حسن نیا. م.ر، عزیزمحسنی. ف، یگانه. و، گنجور. م.س، بررسی برخی از اعضای خانواده ویبریوناسه (*Vibrionaceae*)به عنوان پروبیوتیک در پرورش میگو، مجله علمی شیلات ایران، شماره ۴ ، سال پانزدهم. صفحات ۲۱ – ۳۲

۸- عملکرد معاونت تکثیر وپرورش آبزیان. ۱۳۸۰-۱۳۸۳. اداره کل شیلات استان بوشهر.

9.Aasen I.M., Moretro T., Katla T., Axelsson L.and Storro I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol,* 53(2): 159-166.

10. Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N.and Galvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev,* 35(1): 201-232.

11. Adabi M., Jabbari M.and Lari A.R. 2009. Distribution of sulfamethoxazole trimethoprim constin in *Vibrio cholerae* isolated from patients and environment in Iran. *Afr J Microbiol Res,* 5(20): 3181-3185.

12. Akinbowale O.L., Peng H.and Barton M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol,* 100(5): 1103-1113.

13. Ansari A., Aman A., Siddiqui N.N., Iqbal S.and Qader S.A.u. 2012. Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. *Pak J Pharm Sci,* 25(1): 195-201.

14. Asaduzzaman S.M.and Sonomoto K. 2009. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J Biosci Bioeng,* 107: 475-487.

15. Austin B., Stuckey L.F., Bertson P.A.W., Effendi I.and Griffith D.R.W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginoyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmoniioda Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis,* 18: 93-96.

16. Avendaño R.E.and Riquelme C.E. 1999. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research,* 30(11-12): 893-900.

17. Bairagi A., Sakar Ghosh K., Sen S.K.and Ray A.K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International,* 10: 109-121.

18. Bairagi A., Sarkar Ghosh K., Sen S.K.and Ray A.K. 2004. Evaluation of the nutritive value of Leucaena leucocephala leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, Labeo rohita (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research,* 35: 436-446.

19. Balcazar J.L. 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. *National Center for Marine and. Aquaculture Research*.

20. Balcázar J.L., Blas I.d., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D.and Múzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet MIicrobiol,* 114(3-4): 173-186.

21. Balcazar J.L., Rojas-Luna T.and Cunningham D.P. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Invertebr Pathol,* 96(2): 147-150.

22. Banerjee S., Khatoon H., Shariff M.and Yusoff F.M. 2010. Enhancement of Penaeus monodon shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fish Sci,* 76: 481-487.

23. Barlow S., Chesson A., Collins J.D., Dybing E., Flynn A., Fruijtier-Pölloth C., et al. 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA1. *The EFSA Journal,* 587: 1-16.

24. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C.and Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol,* 45(4): 493-496.

25. Bhakuni D.S.and Rawat D.S. 2005. *Bioactive Marine Natural Products*. New York, USA: Springer.

26. Bierbaum G.and Sahl H.G. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechno,* 10: 2-18.

27. Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem,* 72: 248-254.

28. Bryant D.A.and Frigaard N.U. 2006. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol,* 14(11): 488-496.

29. Buller N.B. 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. UK: CABI Publishing, Oxford shire.

30. C.L.S.I. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (Vol. 28). USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

31. C.L.S.I. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement (Vol. 31). USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

32. Campbell L.D.and Dwek R.A. 1984. *Biological Spectroscopy*. California: Benjamin/Cumming publishing Co.

33. Cascales E., Buchanan S.K., Duch´e D., Kleanthous C., Lloube`s R., Postle K., et al. 2007. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol R,* 71: 158-229.

34. Chahad Bourouni O., Bour M., Mraouna R., Abdennaceur H.and Boudabous A. 2007. Preliminary selection study of potential probiotic bacteria from aquacultural area in Tunisia. *Annals of Microbiology,* 57: 185-190.

35. Chaudhary P., Kumar R., Verma A.K., Singh D., Yadav V., Chillar A.K., et al. 2006. Synthesis and antimicrobial activity of N-alkyl and N-aryl piperazine derivatives. *Bioorg Med Chem,* 14(6): 1819-1826.

36. Chun J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. . 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2259-2261.

37. Chythanya R., Karunasagar I.and Karunasagar I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibriosis by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture,* 208(1-2): 1-10.

38. Cladera-Olivera F., Caron G.R.and Brandelli A. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol,* 38: 251-256.

39. Connor N., Sikorski J., Rooney A.P., Kopac S., Koeppel A.F., Burger A., et al. 2010. Ecology of Speciation in the Genus *Bacillus*. *Appl Environ Microbiol,* 1349-1358.

40. Dalmin G., Kathiresan K.and Purushothaman A. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J Exp Biol,* 39(9): 939-942.

41. Day J.G.and Stacey G. (Eds.). 2007. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Vol. 368). Totowa, New Jersey: A product of Humana Press.

42. Decamp O.and Moriarty D.J.W. 2006. Probiotics as alternative to antimicrobials:limitations and potential. *World Aquaculture,* 37(4): 60-62.

43. Decamp O., Moriarty D.J.W.and Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research,* 39(4): 334-338.

44. Defoirdt T., Thanh L.D., Delsen B.V., Schryver P.D., Sorgeloos P., Boon N., et al. 2011. N-acylhomoserine lactone-degrading *Bacillus* strains isolated from aquaculture animals. *Aquaculture,* 311: 258-260.

45. Delgado A.l., Brito D., Peres C.l., Noe´-Arroyo F.and Garrido-Ferna´ ndez A. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol,* 22: 521-528.

46. Delgadoa A.l., Britoa D., Fevereiro P., Tenreiro R.r.and Peresa C.l. 2005. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *J Microbiol Meth,* 62: 121- 124.

47. Delsol A.A., Randall L., Cooles S., Woodward M.J., Sunderland J.and Roe J.M. 2005. Effect of the growth promoter avilamycin on emergence and persistence of antimicrobial resistance in enteric bacteria in the pig. *J Appl Microbiol,* 98(564-571).

48. Demain A.L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *INTERNATL MICROBIOL,* 1: 259-264.

49. Direkbusarakom S., Yoshimizu M., Ezura Y., Ruangpah L.and Danayadol Y. 1997. *Vibrio spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogens*. Paper presented at the Poster session of the 2nd Asia-Pacific marine biotechnology conference and 3rd Asia-pacific conference on algal biotechnology, Phuket Thailand.

50. Dong X., Li Y., Zhang X.H., Liu J., Hu Z.and Chen J. 2007. Identification and inhibitory activity to pathogenic *Vibrio* species of a marine bacterium Phaeobacter DL2. *JFishery Sci China*: 996-1003.

51. Dong Y.H., Gusti A.R., Zhang Q., Xu J.L.and Zhang L.H. 2002. Identification of quorumquenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Apll Eviron Microb,* 68: 1754-1759.

52. Douillet P.A.and Langdon C.J. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the pacific oyster (*Crassostrea gigas Thunberg*). *Aquaculture,* 119: 25-40.

53. Duitman E., Hamoen L.and Rembold M. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *P Natl Acad Sci USA,* 96: 13294-13299.

54. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.and Stackebrandt E. 2006. *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria* (3rd edn ed.). Singapore: Springer.

55. FAO. State of world aquaculture: 2006. Rome, Italy: Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations2006.

56. FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit (FIDI) c2002, 2007. Fishery Statistical Collections. FIGIS Data Collection. Rome2007.

57. Farzaliev V.M., Abbasova M.T., Ashurova A.A., Babaeva G.B., Ladokhina N.P.and Kerimova Y.M. 2009. Synthesis of N,N- bis(alkyloxymethyl)piperazines and examination of their antimicrobial properties. *Rus J Appl Chem,* 82(5): 928-930.

58. Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F.and Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol,* 82: 59-70.

59. Fjellheim A.J., Klinkenberg G., Skjermo J., Aasen I.M.and Vadstein O. 2010. Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (Gadus morhua L.) larvae. *Vet Microbiol,* 144(1-2): 153-159.

60. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bact,* 66: 365–378.

61. Garcia T., Otto K., Kjelleberg S.and Nelson D.R. 1997. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Apll Eviron Microb,* 63(3): 1034-1039.

62. Garriques D.and Arevalo G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. Baton Rouge: World Aquaculture Society1995.

63. Ghanbari M., Rezaei M., Soltani M.and Shah-Hosseini G. 2009. Production of bacteriocin by a novel *Bacillus* sp. strain RF 140, an intestinal bacterium of Caspian Frisian Roach (Rutilus frisii kutum). *Iran J Vet Res,* 10(3).

64. Gillor O., Etzion A.and Riley M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol,* 81: 591-606.

65. Gismondo M.R., Drago L.and Lombardi A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int J Antimicrob Ag,* 12: 287-292.

66. Gomez-Gil B., Roque A.and Velasco-Blanco G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture,* 211(1-4): 43-48.

67. Gordon D., Riley M.A.and Pinou T. 1998. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiol Mol Biol R,* 144: 2233-2240.

68. Gordon D.M., Oliver E.and Littlefield-Wyer J. 2007. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin: Springer.

69. Gordon V.N. Towrds the development of a protocole for the selection of probiotics in marine fish larviculture: Rhodes University; 2004.

70. Gram L., Løvold T., Nielsen J., Melchiorsen J.and Spanggaard B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furnculosis. *Aquaculture,* 199: 1-11.

71. Gram L., Melchiorsen J., Spanggaard B., Huber I.and Nielsen T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Apll Eviron Microb,* 65(3): 969-973.

72. Gullian M., Thompson F.and Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture,* 233: 1-14.

73. Guo J.-J., Liu K.-F., Cheng S.-H., Chang C.-I., Lay J.-J., Hsu Y.-O., et al. 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research,* 40(5): 609-618.

74. Hagi T., Tanaka D., Iwamura Y.and Hoshino T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture,* 234: 335-346.

75. Hammami I., Rhouma A., Jaouadi B., Rebai A.and Nesme X. 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Lett Appl Microbiol,* 48: 253-260.

76. Hansen G.H.and Olafsen J.A. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology,* 38: 1-26.

77. Heckman R. 2004. What else can happen? Other problems for fish production. *Aquaculture Magazine,* 30(3): 27-40.

78. Hill J.E., Baiano J.C.F.and Barnes A.C. 2009. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J Fish Dis,* 32(12): 1007-1016.

79. Hill J.E., Baiano J.C.F.and Barnes A.C. 2009. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J Fish Dis,* 32(12): 1007-1016.

80. Hjelm M., Bergh Ø., Riaza A., Nielsen J., Melchiorsen Sigmund Jensen J., Duncan H., et al. 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. *System Appl Microbiol,* 27: 360–371.

81. Holme D.J.and Peck H. 1998. *Analytical Biochemistry* (Third ed.). England: Pearson Education.

82. Hong H.A., Duc L.H.and Cutting S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev,* 29(4): 813-835.

83. Hosoi T.and Kiuchi K. 2003. Natto - a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). In Farnworth E.R. (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (pp. 227-245).

84. Hu K.and Yang X.L. 2006. Current progress of microbial ecological agents in aquaculture in China. *Fish Mod,* 6: 36-38.

85. Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K., Vankerckhoven V., Goossens H.and Swings J. 2006. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol,* 157: 803-810.

86. Irianto A.and Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis,* 25: 633-642.

87. Irianto A.and Austin B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis,* 25: 333-342.

88. Isolauri E., Salminen S.and Ouwehand A.C. 2004. Probiotics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology,* 18(2): 299-313.

89. Itami T., Asano M., Tokushige K., Kubono K., Nakagawa A., Noboru T., et al. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture,* 164: 277-288.

90. Ivanova E.P., Vysotskii M.V., Svetashev V.I., Nedashkovskaya O.I., Gorshkova N., Mikhailov V.V., et al. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *INTERNATL MICROBIOL,* 2: 267-271.

91. Jack R.W., Tagg J.R.and Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev,* 59: 171-200.

92. Jeong S.Y., Park S.Y., Kim Y.H., Kim M.and Lee S.J. 2008. Cytotoxicity and apoptosis induction of *Bacillus vallismortis* BIT-33 metabolites on colon cancer carcinoma cells. *J Appl Microbiol,* 104(3): 796-807.

93. Jiravanichpaisal P., Chuaychuwong P.and Menasveta P. 1997. *The use of Lactobacillus sp. as the probiotic bacteria in the giant tiger shrimp (Penaeus monodon Fabricius)*. Paper presented at the Poster

session of the 2nd Asia-Pacific marine biotechnology conference and 3rd Asia-pacific conference on algal biotechnology, Phuket Thailand.

94. Jung W.J., Mabood F., Souleimanov A., Zhou X., Jaoua S., Kamoun F., et al. 2008. Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* spp. kurstaki. *J Microbiol Biotechnol,* 18(11): 1836-1840.

95. Karunasagar I., Pai R., Malathi G.R.and Karunasagar I. 1994. Mass mortality of Penaeus monodon larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture,* 128: 203–209.

96. Kawano Y., Nagawa Y., Nakanishi H., Nakajima H., Matsuo M.and Higashihara T. 1997. Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicroalgal activites. *J Mar Biotechnol,* 5: 225-229.

97. Kelecom A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An Acad Bras Ciênc,* 74(1): 151-170.

98. Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J.and Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture,* 274(1): 1-14.

99. Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J.and Gibson L. 2009. Screening for probiotics of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. *Aquaculture,* 296: 159-164.

100. Khalil R., Djadouni F., Elbahloul Y.and Omar S. 2009. The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain. *African Journal of Food Science,* 3(1): 011-022.

101. Kim J.K., Park K.J., Cho K.S., Nam S.W., Park T.J.and Bajpai R. 2005. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresour Technol,* 96: 1897–1906.

102. Kim S.R., Nonaka L.and Suzuki S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol Lett,* 237(1): 147-156.

103. Kim Y., Jeong-Yong C., Ju-Hee K., Jae-Hak M., Young-Cheol K.and Keun-Hyung P. 2004. Identification and antimicrobial activity of phenyl acetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean chungkook-jang. *Current Microbiology,* 48: 312-317.

104. Klewicki R.and Klewicka E. 2004. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobaceriacae* family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotech Lett,* 26: 317-320.

105. Kobayashi M.and Kurata S. 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. *Process Biochem,* 13: 27–30.

106. Korenblum E., der Weid I., Santos A.L., Rosado A.S., Sebasti´an G.V., Coutinho C.M., et al. 2005. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, B. firmus HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *J Appl Microbiol,* 98: 667-675.

107. Lategan M.J.and Gibson L.F. 2003. Antagonistic activity of Aeromonas media strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel *Anguilla australis* Richardson. *J Fish Dis,* 26: 147-153.

108. Lawton E.M., Ross R.P., Hill C.and Cotter P.D. 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. *Mini Rev Med Chem,* 7: 1236-1247.

109. Lee C.-S. 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review. *Aquaculture,* 227(1-4): 439-458.

110. Lee K.H., Jun K.D., Kim W.S.and Paik H.D. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol,* 32: 146-151.

111. Li J., Tan B., Mai K., Ai Q., Zhang W., Xu W., et al. 2006. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture,* 253(1-4): 140-147.

112. Li Z. 2009. Advances in Marine Microbial Symbionts in the China Sea and Related Pharmaceutical Metabolites. *Marin Drugs,* 7: 113-129.

113. Liao S., Zheng G., Wang A., Huang H.and Sun R. 2006. Isolation and characterization of a novel aerobic denitrifier from shrimp pond. *Acta Ecol Sin,* 26(11): 3018-3724.

114. Lightner D.V. 1993. Diseases of cultured Penaeid shrimp. In McVey J.P. (Ed.), *CRC Handbook of Mariculture* (2 ed., Vol. 1, pp. 393–486). Boca Raton, Florida: CRC Press.

115. Lilly D.M.and Stillwell R.H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science,* 147: 747-748.

116. Lim J.-H., Jeong H.-Y.and Kim S.-D. 2011. Characterization of the Bacteriocin J4 Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* J4 Isolated from Korean Traditional Fermented Soybean Paste. *J Korean Soc Appl Biol Chem,* 54(3): 468-474.

117. Liu K.F., Chiu C.H., Shiu Y.L., Cheng W.and Liu C.H. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immu,* 28: 837-844.

118. Liu X.M., Nie J.H.and Wang Q.R. 2002. Research progress in the probiotics of compound microorganisms. *Chin J Eco-Agriculture,* 10(4): 80-83.

119. Lodemann U., Lorenz B.M., Weyrauch K.D.and Martens H. 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. toyoi as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Arch Anim Nutr,* 62: 87-106.

120. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *JBiolChem,* 193(265-275).

121. Lutz G., Chavarr´ıa M., Arias M.L.and Mata-Segreda J.F. 2006. Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. *Rev Biol Trop (Int J Trop Biol),* 54: 59-63.

122. Ma C.W., Cho Y.S.and Oh K.H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture,* 287(3–4): 266-270.

123. Maeda M.and Nogami K. 1998. Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture., *Current topics in marine biotechnology,* pp. 395-397.

124. Makridis P., Costa R.A.and Dinis M.T. 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched Artemia metanauplii. *Aquaculture,* 255(1-4): 76-81.

125. Maroni K. 2000. Monitoring and regulation of marine aquaculture in Norway. *Journal of Applied Ichthyology,* 16: 192-195.

126. Matinfar A. 1992. Multiplication and culture of the Persian gulfshrimp (Penaeus semisulcatus De Haan). *iranian fisheries bulletin,* 1: 8.

127. McCartney A.L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition,* 88: s29-s37.

128. Metchnikoff E. The Prolongation of Life. London, United Kingdom1907.

129. Mevel G.and Prieur D. 2000. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Can J Microbiol,* 46: 465-473.

130. Mirbakhsh M., Ghaednia B., Afsharnasab M.and Yeganeh V. 2012. Molecular Identification of *Vibrio harveyi* From Larval Stage of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea:Decapoda) By Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing. *Iran J Fish Res,* in press.

131. Mo Z., Yu Y., Li H., Li Y., Ji W.and Xu H. 2001. Selection of vibrios-antagonism bacteria. *Period Ocean Univ Qingdao,* 31(2): 225–231.

132. Mombelli B.and Gismondo M.R. 2000. The use of probiotics in medicinal practice. *Int J Antimicrb Ag,* 16: 531-536.

133. Moriarty D.J.W. 1999. *Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria.* Paper presented at the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Halifax, Canada.

134. Naviner M., Bergé J.P., Durand P.and Le Bris H. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture,* 174(1–2): 15-24.

135. Nawaz M.S., Erickson B.D., Khan A.A., Khan S.A., Pothuluri J.V., Rafii F., et al. 2001. Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial resistance in the food animal production environment. *Reg Res Pers,* 1 (1): 1-10.

136. Nes I.F., Yoon S.S.and Diep D.B. 2007. Ribosomally synthesiszed antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol,* 16: 675-690.

137. Nicholson W.L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci,* 59: 410-416.

138. Nimrat S., Boonthai T.and Vuthiphandchai V. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology,* 169(3): 244-258.

139. Nimrat S., Suksawat S., Boonthai T.and Vuthiphandchai V. 2012. Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Vet Microbiol,* 30: 30.

140. Nogami K.and Meada M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the Crab *Portunus trituber Culatus*. *Can J fish aqua sci,* 49: 2373-2376.

141. O'Sullivan L., Ross R.P.and Hill C. 2002. Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie,* 84: 593-604.

142. Ochoa-Solano J.L.and Olmos-Soto J. 2006. The functional property of Bacillus for shrimp feeds. *Food Microbiol,* 23: 519-525.

143. Oguntoyinbo A., Sanni A.L., Franz C.M.A.P.and Holzapfel W.H. 2007. In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for teh production of okpehe, a traditional African fermented condiment. *Int J Food Microbiol,* 113: 208-218.

144. Oman T.J.and van der Donk W.A. 2009. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin. *ACS Chem Biol,* 4: 865-874.

145. Ouwehand A.C., Salminen S.and Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leewenhoek,* 82: 279-289.

146. Pandey A., Naik M.M.and Dubey S.K. 2010. Organic metabolites produced by *Vibrio parahaemolyticus* strain An3 isolated from Goan mullet inhibit bacterial fish pathogens. *Afr J Biotechnol,* 9(42): 7134-7140.

147. Parente E., Brienza C., Moles M.and Ricciardi A. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J Microbiol Meth,* 22: 95-108.

148. Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S.and Kim H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol,* 100(6): 1171-1185.

149. Paulo S. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol, 38*(2). Retrieved from.

150. Pedersen P.B., Bjrnvad M.E., Rasmussen M.D.and Petersen J.N. 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regul Toxicol Pharm,* 36: 155-161.

151. Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., et al. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother,* 53(1): 28-52.

152. Priest F.G. 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. In A.L.Sonenshein (Ed.), *Systematics and ecology of Bacillus* (pp. 3-16). Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

153. Proksch P., Edrada R.A.and Ebel R. 2002. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol,* 59(2-3): 125-134.

154. Qi Z., Zhang X.-H., Boon N.and Bossier P. 2009. Probiotics in aquaculture of China — Current state, problems and prospect. *Aquaculture,* 290(1–2): 15-21.

155. Qiao Z.and R. T. 1994. Three strains photosynthetic bacteria applied for Prawn diet and their cultural effect. *Mar Sci,* 2: 4-7.

156. Raida M.K., Larsen J.L., Nielsen M.E.and Buchmann K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis,* 26: 495-498.

157. Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B.and Saravanakumar A. 2010. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. *Adv J Food Sci Technol,* 2(2): 138-144.

158. 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,* 227: 417-426.

159. Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S.and Menasveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture,* 167(3-4): 301-313.

160. Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S.and Menasaveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture,* 191(4): 271-288.

161. Riley M.A.and Wertz J.E. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie,* 84: 357-364.

162. Riley M.A.and Wertz J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol,* 56: 117-137.

163. Ringø E.and Gatesoupe F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture,* 160: 177-203.

164. Rooney A.P., Price N.P.J., Ehrhardt C., Swezey J.L.and Bannan J.D. 2009 Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol,* 59: 10.

165. Ruiz-Ponte C., Samain J.F., Sánchez J.L.and Nicolas J.L. 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Mar Biotech,* 1: 52-59.

166. Salminen S., Ouwehand A., Benno Y.and Lee Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined. Trends in Food Science and Technology. *10,* 107-110.

167. Schmid F.X. 2001. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*.

168. Senok A.C., Ismaeel A.Y.and Botta G.A. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infec,* 11(12): 958-966.

169. Sharma N., Kapoor R., Gautam N.and Kumari R. 2011. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* R75 Isolated from Fermented Chunks of Mung Bean (*Phaseolus radiatus*). *Food Technol Biotechnol,* 49(2): 169-176.

170. Siefert J.L., Larios-Sanz M., Nakamura L.K., Slepecky R.A., Paul J.H., Moore E.R.B., et al. 2000. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Curr Microbiol,* 41: 84-88.

171. Slepecky R.and Hemphill E. 2006. The genus *Bacillus* Nonmedical. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H.&Stackebrandt E. (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol. 4, pp. 530-562). New York: Springer.

172. Smith D.and Davey S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas Salmenicida* from fish with stress-inducible furrnculosis by a fluorescent pseudomonad. *J Fish Dis,* 16: 521-524.

173. Smith V.J., Brown J.H.and Hauton C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? . *Fish Shellfish Immun,* 15: 71-90.

174. Sørum H. 2006. *Antimicrobial drug resistance in fish pathogens*. Washington DC: ASM Press.

175. Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol,* 56: 845-857.

176. Stein T., Dusterhus S., Stroh A.and Entian K.D. 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Appl Environ Microb,* 70: 2349-2353.

177. Study on the Bioactive Compounds of Bacillus Vallismortis C89 Associated with Sponge Dysidea Avara. 2012. 197. Retrieved from http://www.rescancer.com/cancer-research/21997.html website.

178. Sugita H.and Shibuga K. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture,* 145(1/4): 195-203.

179. Sutyak K.E., Anderson R.A., Dover S.E., Feathergill K.A., Aroutcheva A.A., Faro S., et al. 2008. Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilosin. *Infect Dis Obstet Gynecol*.

180. Suwansukho P., Rukachisirikul V., Kawai F.and H-Kittikun A. 2008. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. *Songklanakarin J Sci Technol,* 30(1): 87-93.

181. Teasdale M.E., Liu J., Wallace J., Akhlaghi F.and Rowley D.C. 2009. Secondary Metabolites Produced by the Marine Bacterium *Halobacillus* salinus That Inhibit Quorum Sensing-Controlled Phenotypes in Gram-Negative Bacteria. *Apll Eviron Microb,* 75(3): 567-572.

182. Terlabie N.N., Sakyi-Dawson E.and Amoa-Awua W.K. 2006. The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into dawadawa. *Int J Food Microbiol,* 106: 145-152.

183. Timmerman H.M., Koning C.J.M., Mulder L., Rombouts F.M.and Beynen A.C. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - a comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol,* 96: 219-233.

184. Turnidge J. 2004. Antibiotic use in animals - prejudices, perceptions and realities. *J Antimicrob Agents Chemother,* 53: 26-27.

185. Van Belkum M.J.and Stiles M.E. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat Prod Rep,* 17: 323-335.

186. Van den Bogaard A.E.and Stobberingh E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *Int J Antimicrob Ag,* 14: 327-335.

187. Van der Aa Kühle A., Skovgaard K.and Jespersen L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii and foodborne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol,* 101: 29-39.

188. Vaseeharan B., Lin J.and Ramasamy P. 2004. Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity, and plasmid profiles of *Listonella anguillarum*-like bacteria isolated from *Penaeus monodon* culture systems. *Aquaculture,* 241(1-4): 77-91.

189. Vaseeharan B.and Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol,* 36(2): 83-87.

190. Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P.and Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev,* 64: 655–671.

191. Vijayagopal P., Babu Philip M.and Sathianandan T.V. 2008. Evaluation of compounded feeds with varying protein: energy ratios for the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *J Mar biol Ass India,* 50: 202 - 208.

192. Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., Daya S., Baxter J.and Hecht T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J Fish Dis,* 27: 319-326.

193. Wang A., Zheng G., Liao S., Huang H.and Sun R. 2007. Diversity analysis of bacteria capable of removing nitrate/nitrite in a shrimp pond. *Acta Ecol Sin,* 27(5): 1937–1943.

194. Wang B., Yu J., Li Y., Ji W.and Xu H. 2002. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*. *J Fish Sci Chin,* 1: 52-55.

195. Wang X., Du Z., Chen G., Li Y., Ji W.and Xu H. 2002. Application of probiotic A18 to larvae culture of bay scallop *(Argopecten irradians). Chin High Technol Lett,* 8: 86–90.

196. Wang Y., Han Y., Li Y., Chen J.and Zhang X.H. 2007. Isolation of *Photobacterium damselae* subsp. piscicida from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis Gunther*) in China. *Acta Microbiol Sin,* 47: 763-768.

197. Westerop B. 2003. Abstracts of Marine Biotechnology: Basics and Applications. *Biomolecular Engineering,* 20: 37-82.

198. WHO. Food safety associated with products from aquaculture1999.

199. WHO. Joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul, Republic of Korea2006.

200. Wierup M. 2001. The experience of reducing antibiotics used in animal production in the Nordic countries. *Int J Antimicrob Ag,* 18(3): 287-290.

201. Willey J.M.and van der Donk W.A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol,* 61: 477-501.

202. Witte W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int J Antimicrob Ag,* 16: S19-S24.

203. Xie J., Zhang R., Shang C.and Guo Y. 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Afr J Biotechnol,* 8: 5611-5619.

204. Yan L., Boyd K.G.and Burgess J.G. 2002. Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Mar Biotech,* 4: 356-366.

205. Yang E.J.and Chang H.C. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor J Microbiol Biotechnol,* 35: 339-346.

206. Yeung P.S.M., Sanders M.E., Kitts C.L., Cano R.and Tong P.S. 2002. Species-specific identification of commercial probiotic strains. *J Dairy Sci,* 85: 1039-1051.

207. Zhao Z., Wang Q., Wang K., Brian K., Liu C.and Gu Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour Technol,* 101(1): 292-297.

208. Zhou X.-x., Wang Y.-b.and Li W.-f. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture,* 287: 349-353.

209. Ziaei-Nejad S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett D.L., Mirvaghefi A.-R.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,* 252(2-4): 516-524.

210. ZoBell C.E.and Upham H.C. 1944. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull Scripps Inst Oceanogr,* 5: 239-292.

211. Zokaeifar H., Balcazar J.L., Saad C.R., Kamarudin M.S., Sijam K., Arshad A., et al. 2012. Effects of Bacillus subtilis on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, Litopenaeus vannamei. *Fish Shellfish Immunol,* 30: 30.

Abstract:

Isolation and Molecular Identification of Probiotic Bacteria from Cultured White leg Shrimps *(Litopanaeus vannamei)* in Bushehr province

Shrimp culture and rearing industry in particular white leg shrimp species (*Litopenaeus vannamei*) is one of the major activities in the world, including Iran. The outbreaks of diseases are the main factors limiting production. Due to the adverse effects of abusing antibiotics and chemical disinfectants, disease control and prevention requires novel methods that are affordable, effective and safe for the environment and humans. For this purpose during the five months, sampling was done from three main sites of shrimp culture in Bushehr province and 150 pieces cultured white leg shrimp, 135 water and sediment samples were collected from the ponds, input and output channels by standard methods. Physicochemical parameters of water and biometry of shrimps were done and recorded. Probiotic isolation was performed by culturing samples in Tryptic soy agar and TCBS after incubation in 30º C for 24-48 h. The antimicrobial effects of culture extract of isolates were evaluated against *V. harveyi* with the well diffusion method and the best isolates were selected. The molecular identification of selected bacteria was performed by 16S ribosomal DNA gene sequence analysis technique. The growth kinetics of selected bacteria and effect of environmental factors on antimicrobial compound production and stability of them in salinity (1.5-5.5%) and (0-50ppt), pH (5-9) and temperature (30-40º C) and (35-100º C) were studied respectively.

After the determination of antibiotic resistance profiles of them, the In vivo test on the *L. vannamei* post larvae was performed and effect of these bacteria on growth performance, prevention of vibriosis and water quality include (ammonia, nitrate nitrite, turbidity, total bacteria and *Vibrionaceae* load were examined. For extraction and identification of bioactive material with anti-bacterial properties produced by selected bacteria, dialysis, SDS-PAGE electrophoresis, ultraviolet spectroscopy and gas chromatography mass was performed.

According to the results of this dissertation the most frequency of facultative aerobic and anaerobic heterotrophic bacteria was seen in shrimp digestion tract $(3.04 \pm 0.75) \times 10^5$ CFU/g in September .Genus *Vibrio* spp. (37.88%) and *Bacillus* spp. (27.27%) had the most frequency respectively.

Of the 198 bacterial isolates, two bacterial strains from the digestive tract and sediment which had the highest inhibition and a stability antagonistic effect on *V. harveyi* were selected. Based on 16S ribosomal DNA gene sequence analysis, they were identified as *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* strain IS02 (GenBank: JN856456.1) and *Bacillus vallismotis* IS03 (GenBank: JQ085958.1) and recorded in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

According to results of identifying bioactive material produced by selected bacteria, in SDS-PAGE electrophoresis *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* strain IS02 did not have any band but *Bacillus vallismotis* IS03 had two band in 25 kDa and 34-45 kDa molecular weight which probably bacteriocin like substances and group III *Bacillus* bacteriocin respectively. UV spectra of selected bacteria were in the range (260-265nm) which related to peptide groups. In GC-MS the highest percent of chromatogram was belonged to pyrrolopyrazines in both of selected bacteria, which have antibacterial properties.

Overall, according to results both of the selected bacteria were adapted to the ecological conditions of shrimp culture and could be used as appropriate probiotics in this industry. It is hoped that the results of this research is to produce a step towards the realization of national production of indigenous probiotic in Iran.