ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های جدا شده از روده، آب و رسوبات محیط پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) درمنطقه چوئبده آبادان

- **زهرا محمدی‌مکوندی***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مهرزاد مصباح**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **داریوش غریبی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مجتبی علیشاهی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مسعود قربانپورنجف‌آبادی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۷

چکیده

با استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان ارگانیسم‌هایی که می‌توانند سبب افزایش سلامتی و مقاومت به بیماری‌ها در میزبان شوند، می‌توان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را در آبزی‌پروری کاهش داد. در این بررسی ابتدا اقدام به جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک، انتروکوکوس و باسیلوس‌ها از روده، آب و رسوبات محیط پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) درمنطقه چوئبده آبادان گردید و سپس خاصیت ضدمیکروبی باکتری‌های جدا شده علیه باکتری‌های بیماری‌زای ویبریو هارویی، یرسینیا روکری، آئروموناس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه به دو روش کشت خطی و چاهک‌گذاری در آگار (انتشار در آگار) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده هیچ‌کدام از جدایه‌های باسیلوس و انتروکوکوس با هر دو روش فوق خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا نداشتند ولی اکثر جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای خاصیت ضدمیکروبی بودند. سپس سه جدایه باکتریایی با بالاترین قدرت ضدمیکروبی (جدایه‌های ۹۳، ۹٤ و ۹۵) با استفاده از توالی ژن ۱٦S rRNA تعیین هویت گردیدند و هر سه جدایه بعد از توالی‌یابی سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم مشخص گردیدند. لذا براساس نتایج این تحقیق، ازاین جدایه‌ها پس از بررسی‌های برون تنی و درون تنی، می‌توان جهت اهداف پروبیوتیک در صنعت پرورش آبزیان به‌خصوص میگو در کشور استفاده نمود.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، پروبیوتیک، میگوی سفید غربی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، چوئبده

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: z.makvandi@yahoo.com

مقدمه

پیش‌بینی می‌شود جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ به ۹ بیلیون نفر برسد(UNWFP، ۲۰۰۵). در این میان، جهت تامین پروتئین مورد نیاز جامعه جهانی، تولید و پرورش آبزیان اهمیت به‌سزایی دارد، از طرفی سیستم‌های نوین آبزی‌پروری به‌تدریج جایگزین سیستم‌های قدیمی می‌گردند و آبزی‌پروری را به سوی متراکم‌تر شدن، مصرف کم‌تر آب، تولید کم‌تر پساب و اقتصادی‌تر شدن پیش می‌برند. از طرفی در سال‌های اخیر آبزی‌پروری یکی از سریع‌الرشدترین بخش‌های تولید غذا بوده و سرعت رشد زیادی را در میان دیگر صنایع داشته است. براساس آمار ارائه شده توسط اداره کل شیلات استان خوزستان در سال ۹۶ میزان تولید این گونه با ارزش اقتصادی در استان برابر با ۸۵۴ تن بوده است. همراه با افزایش تولید و پرورش آبزیان، بیماری‌های آن‌ها نیز شدت گرفته که سبب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی می‌گردد (Bisht و Pandey، ۲۰۱۳). ولی استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند سبب ظهور عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌یوتیک‌ها گردد (Barman و همکاران، ۲۰۱۱) و ممکن است این امر خطرات بالقوه‌ای برای سلامت عمومی و محیط زیست به‌همراه داشته باشد، به‌همین خاطر پژوهشگران در جستجوی یافتن راهکارهای جدیدی برای کنترل بیماری‌های عفونی می‌باشند. لذا امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌منظور پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود وضعیت تغذیه‌ای آبزیان مورد توجه زیادی قرار گرفته است (McKeegan و همکاران، ۲۰۰۲) و تا به امروز تحقیقات فراوانی در رابطه با تاثیر این فرآورده‌ها بر رشد و بازماندگی لارو نرم‌تنان، دوکفه‌ای‌ها، ماهی‌ها و سخت‌پوستان انجام شده است. پروبیوتیک‌ها یا زیست‌یارها در مقابل واژه آنتی‌بیوتیک یا ضدزیست قرار گرفته‌اند. این میکروارگانیسم‌ها با هدف غلبه بر جمعیت میکروبی آسیب‌رسان به دستگاه گوارش مورد استفاده قرار گرفته‌اند (کریم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۴). روش عملکردی پروبیوتیک‌ها شامل رقابت در اشغال جایگاه اتصال در دستگاه گوارش، تحریک یا اصلاح سیستم ایمنی و تولید ترکیبات ممانعت‌کننده علیه عوامل بیماری‌زا، باکتریوسین‌ها، رقابت برای دستیابی به غذا یا اکسیژن، بهبود قابلیت هضم غذا با تولید آنزیم‌هایی چون لیپاز و آمیلاز، تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (برای سلول‌های دیواره روده ضروری بوده و محیط روده را اسیدی می‌کنند)، پیش‌سازهای هورمونی، تولید ماکرو و میکرومغذی‌های ضروری مانند بیوتین، ویتامین B12 و اسیدهای چرب است (مصباح و همکاران، ۱۳۹۵؛ خسروی‌دارانی و کوشکی، ۱۳۸۷). از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در تکثیر و پرورش آبزیان می‌توان به ویبریوهارویی، یرسینیاروکری، آئروموناس‌هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه اشاره نمود. ویبریو هارویی باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و دارای یک تاژک قطبی می‌باشد که می‌تواند در محیط‌های دریایی زندگی آزاد داشته باشد. این باکتری عامل بیماری‌زای اصلی در پرورش بسیاری از گونه‌های بی‌مهرگان از جمله میگو می‌باشد. این عامل بیماری‌زا در مرحله لاروی میگو سبب مرگ و میر بالایی می‌گردد (میربخش و باصری، ۱۳۹۵). آئروموناس هیدروفیلا، عامل اصلی سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب‌شیرین، یک باکتری فرصت‌طلب است که تحت شرایط استرس‌زا، از قبیل تغییرات دمایی، دستکاری و یا کاهش کیفیت آب، تبدیل به یک عامل بیماری‌زا شده و سبب ایجاد بیماری می‌شود (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۴). آنتریک دهان قرمز نیز یک بیماری مهم در آزاد ماهیان می‌باشد که عامل آن باکتری گرم منفی یرسینیاروکری است و دامنه میزبانی وسیع و پراکندگی گسترده‌ای دارد که در صورت بروز سبب ایجاد ضررهای اقتصادی فراوانی در صنعت آبزی‌پروری می‌گردد (Kumar و همکاران، ۲۰۱۵). لاکتوکوکوس گارویه نیز یکی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم در ماهیان می‌باشد که عامل بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس است (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱). این باکتری کوکسی گرم مثبت در سال‌های اخیر شیوع زیادی در مزارع داشته است و قابلیت انتقال به انسان در صورت تماس یا مصرف ماهی آلوده را دارد (شهرانی و همکاران، ۱۳۹۳). اثر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر بیماری ویبریوز در میگوی پنئوس مونودن توسط Sivakuma و همکاران (۲۰۱۲)، اثر باکتری پروبیوتیکی انتروکوکوس فکالیس در میزان بقا پس از مواجهه ماهی مریگال با آئروموناس هیدروفیلا توسط Dhanalakshmi و Ramasubramanian (۲۰۱۷) و توان ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیکی جداشده از میگوی پنئوس مونودن علیه ویبریو هارویی توسط Shakibazadeh و همکاران (۲۰۱۲) مورد بررسی قرار گرفته‌است. رحمتی‌اندانی و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند که باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتارم و لاکتو باسیلوس کازئی قادرند تلفات ناشی از آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری را کاهش دهند. در مطالعه انجام شده توسط محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) نشان داده شد تمامی جدایه‌های لاکتوباسیل جدا شده از روده ماهی شیربت علیه آئروموناس هیدروفیلا دارای فعالیت ضدمیکروبی بودند، هم‌چنین فعالیت ضدمیکروبی دو گونه باسیلوس جداشده از روده و رسوبات استخر علیه عامل بیماری‌زای ویبریو هارویی توسط Mirbakhsh و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده است. این تحقیق جهت کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زای مهم در میگو و ماهی شامل ویبریو هارویی، یرسینیا روکری، آئروموناس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه طراحی گردید تا تاثیر ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک، انتروکوکوس و باسیلوس جدا شده از روده، آب و رسوبات محیط پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در منطقه چوئبده آبادان را بر این عوامل بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار دهد. از نتایج مطالعه حاضر می‌توان در تهیه مکمل‌های پروبیوتیکی

مورداستفاده جهت کنترل بیماری‌های باکتریایی شایع آبزیان و کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری بهره برد.

مواد و روش‌ها

الف- جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: مراحل اجرایی پروژه از خرداد تا اسفند ۱۳۹۶ انجام گردید. جهت جداسازی باکتری‌هایی با خواص پروبیوتیکی از روش *Buntin* و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. به این منظور نمونه آب (از سه کانال آب‌رسان فعال در مجتمع پرورش میگوی چوئبده آبادان در سه زمان ابتدا، میانه و انتهای دوره پرورش) و رسوبات (از مزارع فعال ابتدایی، میانی و انتهایی سه کانال آب‌رسان در سه زمان ابتدا، میانه و انتهای دوره پرورش) تهیه گردید. نمونه‌های آب و رسوب در کنار یخ (۴ درجه سانتی‌گراد) به آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شدند. جهت نمونه‌برداری رسوبات از گرب (رسوب‌گیر سطحی) استفاده گردید. عمق نمونه‌برداری از رسوبات ۲۵-۲۰ سانتی‌متر بود. در آزمایشگاه با استفاده از سرم‌فیزیولوژی استریل رقت‌های متوالی از نمونه‌ها تهیه شد (Shakibazadeh و همکاران، ۲۰۱۲) و سپس ۵۰ میکرولیتر از رقت ۱۰-۲ رسوب‌وآب به محیط کشت‌های ام‌آر‌اس آگار (MRS agar) (برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک)، کانامایسین اسکولین آزایدآگار (Kanamycin Aesculin Azide (KAA) agar) (برای جداسازی باکتری‌های جنس انتروکوکوس) و محیط ام وای پی آگار (MYP agar) (برای جداسازی باکتری‌های جنس باسیلوس) افزوده و در سطح محیط تلقیح شد، سپس گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به‌مدت حداقل ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی برای باکتری‌های اسید لاکتیک و انکوباسیون در اتمسفر معمولی جهت سایر باکتری‌ها انجام شد. ۱۸۰ قطعه میگو نیز در محدوده وزنی ۱۰-۳ گرم (از ۹ مزرعه واقع در سه کانال مجتمع و از هر مزرعه ۲۰ قطعه میگو) به‌صورت تصادفی صید و به‌صورت زنده با رعایت اصول انتقال استاندارد و هوادهی آب طی مسیر به آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. در آزمایشگاه کل روده میگو خارج و هموژن گردید. از رقت ۱-۱۰ روده هموژن شده، ۵۰ میکرولیتر روی محیط‌های ام آر اس آگار، کانامایسین اسکولین آزایدآگار و ام وای پی آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت (جهت باکتری‌های اسیدلاکتیک محیط‌های ام آر اس در جار بی‌هوازی قرار داده شدند) از باکتری‌های مشکوک در محیط‌های ذکر شده، کشت مجدد تهیه شد و مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) و بررسی مورفولوژی و خصوصیات پرگنه‌ها انجام گرفت. باکتری‌های شناسایی شده در شیر پس‌چرخ (Skim milk) ۱۰ درصد و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش‌های مربوط به سنجش فعالیت ضدمیکروبی نگه‌داری شدند.

ب- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باکتریایی

۱- روش کشت خطی: جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های جداشده، از روش Jayanth و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده شد. بدین‌منظور، ابتدا کشت ۱۸ ساعته جدایه‌های باکتریایی مشکوک به فعالیت پروبیوتیکی در محیط آبگوشت MRS (باکتری‌های اسید لاکتیک) و یا TSB (جدایه‌های به‌دست آمده از محیط‌های ام وای پی آگار و کانامایسین اسکولین آزایدآگار) تهیه شد. سپس یک لوپ کامل از سوسپانسیون باکتریایی به‌صورت یک خط عمود در مرکز پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۱/۵ درصد نمک کلرید سدیم (جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی علیه ویبریو هارویی) (جدا شده از ماهیان بیمار و تشخیص یافته به‌روش ملکولی) و محیط بدون نمک مولر هینتون آگار (جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی بقیه باکتری‌های بیماری‌زا: یرسینیا روکری، آئروموناس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه) (جدا شده از ماهیان بیمار و تشخیص یافته به‌روش ملکولی) کشت داده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی (جهت باکتری‌های اسیدلاکتیک) و هوازی جهت سایر جدایه‌های باکتریایی گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌های بیماری‌زا در محیط TSB (حاوی نمک ۱/۵ درصد جهت ویبریو هارویی و محیط بدون نمک جهت سایر باکتری‌ها) عمود بر کشت قبلی و تا ۱ میلی‌متری آن (در سه تکرار) کشت داده شد. پلیت‌ها مجدداً به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و منطقه مهار رشد (فاصله بین باکتری مشکوک پروبیوتیکی مورد آزمایش و باکتری‌های بیماری‌زا) با خط‌کش اندازه‌گیری و نتایج مربوط به سه تکرار هر یک از جدایه‌ها ثبت گردید (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳؛ Jayanth و همکاران، ۲۰۰۱)

۲- روش چاهک‌گذاری (انتشار در آگار): در این روش ابتدا باکتری‌های جداشده مشکوک به پروبیوتیک از روده میگو، آب و رسوبات به‌صورت شبانه در محیط TSB (جهت باکتری‌های انتروکوکوس و باسیلوس) و محیط آبگوشت MRS (جهت باکتری‌های اسیدلاکتیک) کشت داده شدند. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی در سانتریفیوژ یخچال‌دار ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول فوقانی با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر شد و از آن جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی روی باکتری‌های بیماری‌زا استفاده گردید. بدین‌منظور ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۱/۵ درصد نمک کلرید سدیم (جهت کشت باکتری ویبریو هارویی) و ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار بدون نمک (برای کشت دیگر باکتری‌های بیماری‌زا: یرسینیا روکری، آئروموناس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه) در پلیت استریل ۸ سانتی‌متری

ریخته‌شدوسپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری‌های بیماری‌زا در محیط TSB حاوی ۱/۵ درصد نمک کلرید سدیم (جهت باکتری ویبریو هارویی) و بدون نمک (جهت بقیه باکتری‌های بیماری‌زا) که غلظت آن‌ها با غلظت ۰/۵ لوله‌های استاندارد مک‌فارلند تنظیم شده بود، به پلیت افزوده گردید. سپس پلیت به‌آرامی تکان داده شد تا باکتری بیماری‌زا در همه جای پلیت به‌میزان یکسان پخش گردد. پس از جامد شدن محیط‌ها، با کمک انتهای پیپت پاستور استریل چاهک‌هایی در محیط‌های کشت ایجاد گردید. در ادامه ۸۰ میکرولیتر از محلول رویی باکتری‌های جدا شده از روده میگو، آب و رسوبات که روش تهیه آن در بالا ذکر گردید به هر کدام از چاهک‌ها افزوده شد. پس از آن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت هاله عدم رشد و قطر آن بررسی و نتایج مثبت و منفی ثبت گردید (Ravaei و همکاران، ۲۰۱۳؛ Ogbonnia و همکاران، ۲۰۰۸؛ Khalid و همکاران، ۱۹۹۹؛ Voravuthikunchai و همکاران، ۲۰۰۶).

ج- تعیین هویت جدایه‌های واجد خاصیت ضدمیکروبی: جهت تعیین هویت مولکولی باکتری‌های مناسب از نظر خاصیت ضدمیکروبی از پرایمرهای عمومی ژن مربوط به ژن 16S rRNA باکتریایی استفاده گردید. تکثیر 16S rRNA ریبوزومی با استفاده از زوج پرایمرهای عمومی باکتریایی با توالی نوکلئوتیدی (۶۸۵R:5′-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3′ و ′۲۷F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) در یک مخلوط واکنشی در حجم ۲۵ میکرولیتر که حاوی مسترمیکس (آمپلیکون، دانمارک) به‌میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، آغازگرهای پیش‌رو و معکوس (شرکت سیناژن، ایران) (غلظت ۱۰ میکرومولار) هرکدام به‌میزان ۱ میکرولیتر، DNA الگو ۴ میکرولیتر و آب مقطر ۶/۵ میکرولیتر بود، انجام شد (Johnson و همکاران، ۱۹۹۴). برنامه دمایی PCR نیز بدین ترتیب انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۳۰ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و مرحله سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه (۱ سیکل) انجام گرفت. محصولات تکثیر شده در ژل آگاروز حاوی ۱/۵٪ رنگ ایمن (سیناژن، ایران)، الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفتند. متعاقباً ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی مربوطه توسط نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷،۰،۴،۱ موردبررسی قرار گرفت و در نهایت سکانس نوکلئوتیدی توالی‌های به‌دست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژنی NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مورد مقایسه قرار گرفت.

د- روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: برای مقایسه اثر ضدباکتریایی پروبیوتیک‌های جداسازی شده طی روش انتشار در آگار، در مورد هر باکتری سه بار اثرات ضدباکتریایی موردبررسی قرار گرفت و مقایسه بین باکتری‌های جداسازی شده، از نظر تاثیر ضدباکتریایی در برابر هر عامل بیماری‌زا انجام گرفت. به‌این‌منظور از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید، برای مقایسه میانگین اثرات ضدباکتریایی نمونه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد، از پس آزمون توکی برای مشخص کردن معنی‌داری تفاوت میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید. نتایج به صورت Means±SD مطابق روش محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) بیان شد.

نتایج

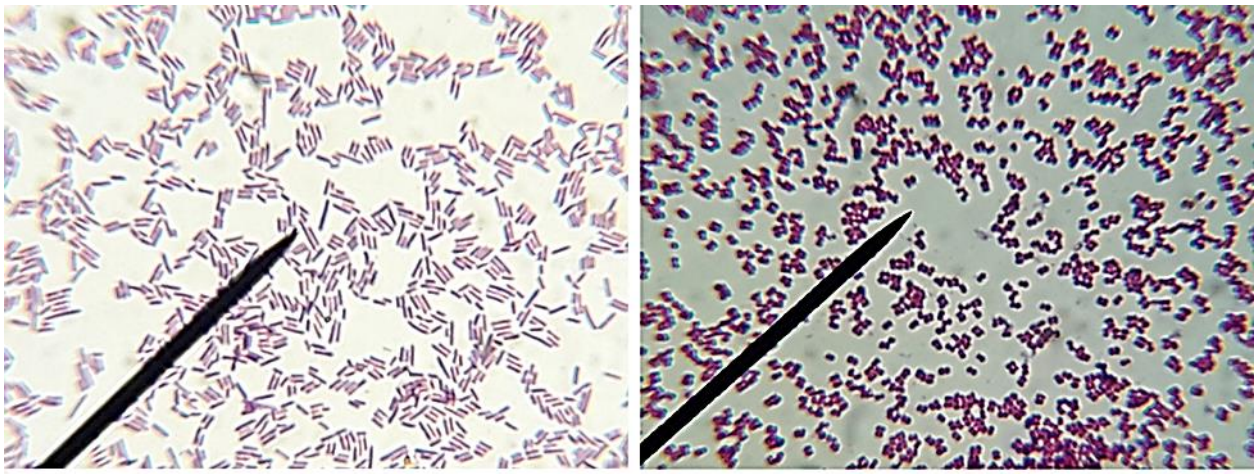
پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از گرمخانه‌گذاری پلیت‌های ام وای پی آگار، کانامایسن اسکولین آزاید آگار و ام آر اس آگار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از پرگنه‌های رشد یافته کشت مجدد تهیه شد و پس از انجام آزمایش‌های کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌ها جهت آزمایش ضدمیکروبی انتخاب شدند (جداول ۱ و ۲). پرگنه‌های مشکوک به انتروکوکوس پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت از کشت در محیط کانامایسن اسکولین آزاید آگار، محیط را به رنگ قهوه‌ای تا سیاه تبدیل می‌کردند. این پرگنه‌ها نیز از نظر مورفولوژی و آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز و برخی تست‌های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. پرگنه باکتری‌های لاکتیک اسید رشد یافته در محیط کشت ام آر اس آگار سفید مایل به کرم با اندازه متوسط بودند، که پس از رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ به شکل میله‌ای یا کروی و گرم مثبت دیده شدند (شکل ۱). این باکتری‌ها کاتالاز منفی، اکسیداز منفی و بدون حرکت بودند و در محیط کشت مک‌کانکی رشدی نشان ندادند. انتروکوکووس‌ها نیز در محیط کانامایسین اسکولین آزاید آگار به رنگ قهوه‌ای تا سیاه با پرگنه‌های کوچک مشاهده شدند و پس از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ به شکل کوکسی و گرم مثبت دیده شدند. این باکتری‌ها کاتالاز منفی و اکسیداز منفی بوده در محیط کشت مک‌کانکی رشد ضعیفی داشتند. باسیلوس‌ها در محیط کشت ام وای پی آگار دارای پرگنه‌ای با اندازه متوسط تا بزرگ به‌رنگ صورتی یا زرد و برخی هاله‌دار بودند. اطراف برخی پرگنه‌ها حاشیه‌ای مضرس داشت که پس از مشاهده در زیر میکروسکوپ به شکل میله‌ای دیده شدند، این باکتری‌ها نیز کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند.

نتایج آزمایش ضدمیکروبی به‌روش خطی: نتایج آزمایش ضد میکروبی به‌روش خطی نشان داد که جدایه‌های *انتروکوکوس* و *باسیلوس* فاقد هرگونه خاصیت ضدمیکروبی به‌روش خطی در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی بودند. ولی اکثر باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا بودند (شکل ۲).

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

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

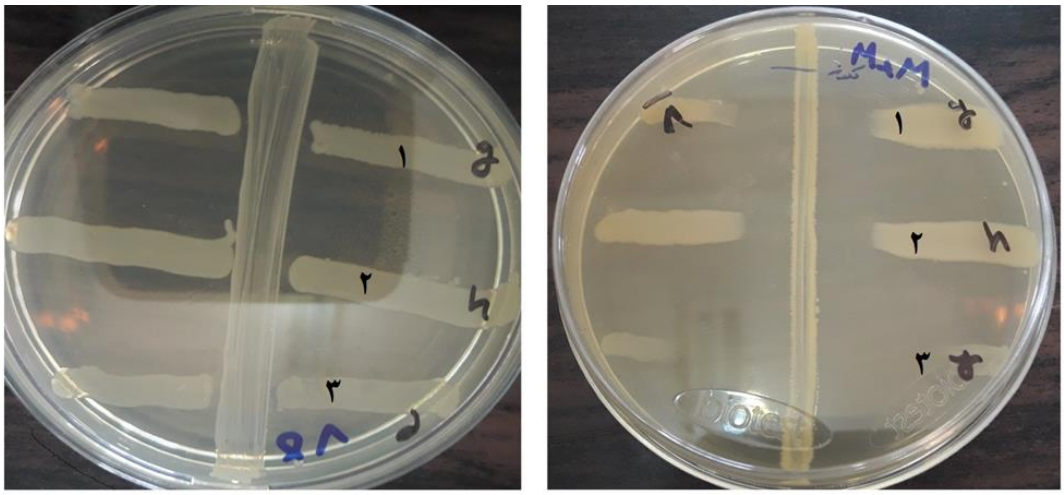
*جدایه‌های باکتریایی از ۱۸۰ قطعه میگو، ۲۷ نمونه آب و ۲۷ نمونه رسوب در زمان‌های مختلف جداسازی شدند.



شکل ۱: باکتری‌های اسیدلاکتیک کوکسی شکل (سمت راست) و باسیل شکل (سمت چپ) جدا شده از روده میگو (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر)

جدول ۲: تعداد جدایه‌های به‌دست آمده و برخی خصوصیات آن‌ها

باکتری	شکل	کاتالاز	اکسیداز	تعداد جدایه‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مختلف		
				روده میگو	آب	رسوبات
باکتری‌های اسیدلاکتیک	باسیل / کوکسی	-	-	۱۴	۳	۶
انتروکوکوس	کوکسی	-	-	۴	-	۲
باسیلوس	باسیل	+	-	۱۲	-	۲



شکل ۲: باکتری اسیدلاکتیک دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا (پلیت سمت راست): شماره ۱: *لاکتوکوکوس گارویه*، ۲: *آئرومونا‌س هیدروفیلا*، ۳. *یرسینیا روکری*. شکل پلیت سمت چپ: باکتری *انتروکوکوس* فاقد هرگونه فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا

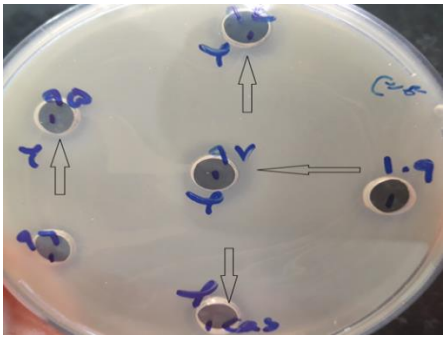
از جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک نیز تنها سه جدایه علیه ویبریو هارویی خاصیت ضدمیکروبی ضعیفی از خود نشان دادند که خاصیت ضدمیکروبی این جدایه‌ها با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی که به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شده بود، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. ۱۹ جدایه علیه باکتری بیماری‌زای یرسینیا روکری، ۱۵ جدایه علیه آئروموناس هیدروفیلا و ۱۶ جدایه علیه لاکتوکوکوس گارویه خاصیت ضدمیکروبی نشان دادند. دو جدایه ۶ و ۱۰۵ نیز در مقابل هیچ‌کدام از باکتری‌های بیماری‌زا خاصیت ضدمیکروبی نشان ندادند. جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک شماره ۹۵ و ۹۶ با اندازه منطقه مهار رشد ۳۸/۶±۴/۱ میلی‌متر، دارای بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی بر باکتری بیماری‌زای یرسینیا روکری بودند. خاصیت ضدمیکروبی این باکتری‌ها از باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($p<0/05$). کم‌ترین اثر ضدمیکروبی نیز مربوط به جدایه شماره ۱۰۱ بود. جدایه شماره ۹۶ نیز علیه باکتری بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا دارای بیش‌ترین تاثیر ضدمیکروبی بود ولی اختلاف معنی‌داری را با لاکتوباسیلوس کازئی از خود نشان نداد ($p>0/05$). هم‌چنین بر اساس نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین خاصیت ضدمیکربی علیه لاکتوکوکوس گارویه مربوط به جدایه شماره ۹۵ مقدار عددی ۳۲/۶±۱/۱ میلی‌متر بود و این جدایه با لاکتوباسیلوس کازئی اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). به‌این دلیل که تنها جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک خاصیت ضدمیکروبی از خود نشان دادند، تنها نتایج مربوط به این جدایه‌ها در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: نتایج حاصل از انجام تست ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا (Mean±S.D). اعداد به میلی‌متر می‌باشند.

شماره جدایه	*ویبریو هارویی*	*یرسینیا روکری*	*آئروموناس هیدروفیلا*	*لاکتوکوکوس گارویه*
۱	-	۲۶/۶±۳/۰^{bcd}	۵/۳±۱/۱^{gh}	-
۵	-	۳۰/۶±۴/۱^{abc}	۱۵/۳±۱/۱^{d}	۱۷/۳±۱/۱^{de}
۶	-	-	-	-
۷	-	۲۷/۳±۲/۳^{bcd}	۸/۶±۱/۱^{fg}	۱۲/۶±۲/۳^{ef}
۸	۳/۳±۱/۵	-	-	-
۹۳	-	۳۲/۰±۲/۰^{abc}	۲۳/۳±۱/۱^{b}	۲۱/۳±۲/۳^{cd}
۹۴	-	۳۱/۳±۱/۱^{abc}	۲۱/۳±۱/۱^{bc}	۲۱/۳±۲/۳^{cd}
۹۵	-	۳۸/۶±۴/۱^{a}	۲۳/۳±۱/۱^{bc}	۳۲/۶±۱/۱^{a}
۹۶	-	۳۸/۶±۲/۳^{a}	۳۹/۳۳±۱/۱^{a}	۲۸/۶±۴/۱^{b}
۹۷	-	۳۴/۶±۵/۰^{ab}	۱۳/۶±۲/۰^{e}	۸/۷±۱/۱^{fgh}
۹۸	۳/۳±۱/۵	-	-	-
۹۹	-	۲۷/۳±۲/۳^{bcd}	۸/۶±۲/۳^{fg}	۹/۹۳±۱/۱^{fg}
۱۰۰	-	۳۱/۳±۲/۳^{abc}	۱۰/۶±۱/۱^{ef}	۱۱/۷±۲/۰^{f}
۱۰۱	-	۱۱/۳±۲/۳^{g}	-	-
۱۰۲	-	۲۳/۳±۱/۱^{cdef}	-	۱۱/۳±۱/۱۵^{f}
۱۰۳	-	۲۰/۶±۱/۱^{defg}	۱۰/۶±۲/۳^{ef}	۵/۳±۱/۱^{gh}
۱۰۴	-	۲۸/۰۰±۳/۴^{bcd}	۳/۳±۲/۳^{hi}	۴/۰±۰/۰۰^{hi}
۱۰۵	-	-	-	-
۱۰۶	-	۱۹/۳±۱/۱^{defg}	۹/۳±۱/۱^{fg}	۸/۶±۱/۱^{fgh}
۱۰۷	-	۲۰/۶±۳/^{defg}	۱۵/۰±۱/۰^{d}	۱/۰۶±۱/۱^{f}
۱۰۸	-	۲۳/۶±۰/۵^{cdef}	-	۱۳/۳±۲/۳^{ef}
۱۰۹	۲/۶±۵/۰	۱۴/۶±۹/۲^{fg}	۱۷/۳±۲/۳^{cd}	-
۱۱۰		۱۶/۶±۱/۱^{efg}	-	۴/۰±۰/۰۰^{hi}
لاکتوباسیلوس کازئی	۴/۰±۱/۰	۲۴/۶±۱/۱^{cde}	۴۰/۶±۱/۱^{a}	۲۵/۳±۳/۰^{bc}

* اعداد در یک ستون با نماهای مشابه اختلاف معنی‌داری با هم ندارند ($p>0/05$).

نتایج آزمایش ضدمیکروبی به‌روش چاهک گذاری (انتشار در آگار): نتایج آزمایش ضدمیکروبی به‌روش چاهک‌گذاری نشان‌داد که جدایه‌های ۱، ۵، ۶ و ۹۷ علیه باکتری *ویبریو هارویی* هاله عدم رشد را در پلیت حاوی این باکتری بیماری‌زا ایجاد کردند. جدایه‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ نیز هاله عدم رشد را در اطراف چاهک‌های پلیت حاوی باکتری *یرسینیا روکری* ایجاد نمودند (جدول ۴).



شکل ۳: باکتری اسیدلاکتیک دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای *لاکتوکوکوس گارویه*. جدایه‌هایی که در اطراف چاهک هاله عدم رشد ایجاد کرده‌اند با فلش مشخص شده‌اند.

جدول ۴: نتایج حاصل از انجام تست ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا به‌روش چاهک‌گذاری (انتشار در آگار)

شماره جدایه	*ویبریو هارویی*	*یرسینیا روکری*	*آئرومونواس هیدروفیلا*	*لاکتوکوکوس گارویه*
۱	+	−	−	−
۵	+	+	−	−
۶	+	+	−	+
۷	−	+	−	+
۸	−	+	−	−
۹۳	−	−	+	−
۹۴	−	−	−	+
۹۵	−	−	+	+
۹۶	−	−	−	−
۹۷	+	−	−	+
۹۸	−	−	−	−−
۹۹	−	−	+	−
۱۰۰	−	−	−	−
۱۰۱	−	−	−	−
۱۰۲	−	−	−	−
۱۰۳	−	−	+	−
۱۰۴	−	−	−	−
۱۰۵	−	−	+	−
۱۰۶	−	−	−	−
۱۰۷	−	−	−	−
۱۰۸	−	−	−	−
۱۰۹	−	−	−	−
۱۱۰	−	−	−	−
لاکتوباسیلوس کازئی	−	−	−	+

* در صورت مشاهده هاله عدم رشد باکتری در اطراف چاهک‌ها در پلیت نتایج مثبت و در غیر این صورت منفی گزارش شدند.

جدایه‌های ۹۳، ۹۵، ۹۹، ۱۰۳ و ۱۰۵ در اطراف چاهک‌های پلیت حاوی باکتری *آئرومونواس هیدروفیلا* ایجاد هاله عدم رشد کردند و جدایه‌های ۶، ۷، ۹۴، ۹۵، ۹۷ و *لاکتوباسیلوس کازئی* در اطراف چاهک‌های پلیت حاوی *لاکتوکوس گارویه* هاله عدم رشد را ایجاد نمودند (شکل ۳). باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* که در این بررسی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود، تنها بر باکتری بیماری‌زای *لاکتوکوکوس گارویه* فعالیت عدم رشد داشت و بر بقیه باکتری‌های بیماری‌زا تاثیر ممانعت از رشد را نشان نداد. باتوجه به این‌که جدایه‌های ۹۳، ۹۴ و ۹۵ در هر دو روش آزمایش شده (خطی و چاهک گذاری) واجد خاصیت ضدمیکروبی خوبی بودند لذا جهت تعیین هویت مولکولی با استفاده از توالی ژن ۱۶ S rRNA مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی با توالی‌های به‌دست آمده مطابقت داشتند. درجدول ۵ نام گونه تأیید شده، عدد دسترسی در بانک ژنی و درصد شباهت باکتری‌های مورد بررسی آمده است. نتیجه تعیین توالی نشان داد که نمونه‌های ارسال شده که دارای بهترین قدرت ضد میکروبی بودند، با توالی‌های *Lactobacillus plantarum* موجود در بانک ژن شباهت بیش‌تری دارند (جدول ۵).

جدول ۵: نام گونه تأیید شده، عدد دسترسی باکتری در بانک ژن و درصد شباهت باکتری‌های مورد آزمایش

شماره جدایه	نام گونه تایید شده	عدد دسترسی به جدایه در بانک ژن	درصد شباهت
۹۳	*Lactobacillus plantarum strain* HCD19-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MH111552.1	٪۱۰۰
۹۴	*Lactobacillusplantarum* strain GZ1-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MH155966.1	٪۱۰۰
۹۵	*Lactobacillus plantarum* strain KGP PME 01-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MH105076.1	٪۱۰۰

بحث

یکی از چالش‌های اصلی در آبزی‌پروری موضوع بهداشت و بیماری‌های آبزیان است، به‌طوری‌که سالیانه میلیاردها دلار خسارت به پرورش‌دهندگان ماهی و میگو وارد می‌شود. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تجمع باقی مانده دارو در بافت بدن، تاثیر بر محیط‌زیست و مهار میکروفلور طبیعی مفید لوله گوارش دارای محدودیت می‌باشد، لذا درخصوص عوامل بیماری‌زا پیشگیری بهتر از درمان خواهد بود. هم‌چنین دیگر باکتری‌هایی مثل

ویبریوها جزء فلور طبیعی آب دریا محسوب می‌شوند و قابلیت حذف آن‌ها به‌صورت کامل وجود نخواهد داشت، بنابراین یکی از ابزارهایی که می‌تواند به ارتقا بهداشت آبزیان کمک نماید استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشد (موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۱۳۹۱؛ Aly و همکاران، ۲۰۰۸). میگوی وانامی بومی سواحل شرقی اقیانوس آرام، آمریکای مرکزی و جنوبی می‌باشد که امروزه در بسیاری از کشورها پرورش داده می‌شود (FAO،۲۰۱۶). از سال ۱۳۸۳، موسسه تحقیقات شیلات ایران، در پژوهشکده میگوی کشور، تحقیق پیرامون امکان تکثیر و پرورش میگوی سفید غربی را شروع کرد و در سال ۱۳۸۴ به تکنیک تکثیر و پرورش میگوی سفید غربی دست یافتند و امروزه در ایران این میگو در سواحل جنوبی و شمالی تکثیر و پرورش داده می‌شود. از مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های بیماری‌زا در ماهی و میگو گونه‌های ویبریو و آئروموناس می‌باشند. گونه‌های گرم منفی معمولاً در تلفات نقش دارند. این باکتری‌ها سبب بروز بیماری‌هایی از قبیل ویبریوز و فرونکلوزیز می‌شوند. هم‌چنین *آئروموناس هیدروفیلا* سبب ایجاد زخم‌های سطحی کوچک، سستی فلس‌ها، خونریزی منطقه‌ای و سیستمیک می‌گردد (Kesarcodi-Watson و همکاران، ۲۰۰۸؛ Ringo و همکاران، ۲۰۱۰). وقوع چنین بیماری‌هایی در یک سیستم پرورشی می‌تواند منجر به خسارات قابل توجهی گردد و توسعه پایدار آن صنعت را با چالش روبرو نماید. با توجه به این‌که موادشیمیایی تولید شده توسط جمعیت‌های میکروبی می‌توانند اثرات ضدباکتریایی بر سایر میکروب‌ها داشته باشد این موضوع می‌تواند روابط بین جمعیتی را تغییر دهد (Pybnus و همکاران، ۱۹۹۴). در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد باکتری‌های اسیدلاکتیک فعالیت ضدمیکروبی خوبی را علیه باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند. در میان باکتری‌های پروبیوتیکی، باکتری‌های اسیدلاکتیک بیش‌تر مشاهده می‌شوند زیرا این باکتری‌ها فلور طبیعی لوله گوارش حیوانات سالم از قبیل پستانداران و آبزیان هستند (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱) بدون این‌که تاثیر منفی بر میزبان خود داشته باشند (Ringø و همکاران، ۱۹۹۸). این باکتری‌ها ترکیباتی از قبیل اسیدهای آلی، اسیدلاکتیک، باکتریوسین و پراکسید هیدروژن را تولید می‌کنند که سبب فعال شدن ایمنی غیراختصاصی در میزبان می‌شود (Gatesoupe، ۲۰۰۸) که احتمالاً باکتری‌های مورد بررسی تحقیق حاضر نیز توانایی بالایی جهت تولید مواد بازدارنده رشد داشته‌اند. در همین راستا در مطالعه Vieira و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده شد که سویه‌های باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از روده میگو بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی ازجمله *ویبریو هارویی* و *آئروموناس هیدروفیلا* تاثیرگذار است. هم‌چنین Zapata و Lara-Flores (۲۰۱۳) نشان دادند باکتری اسیدلاکتیک *Leuconostoc mesenteroides* جدا شده از روده ماهی تیلاپیا توانایی مهار باکتری *ویبریو هارویی* و *مایکوباکتریوم مارینوم* را به‌عنوان باکتری‌های بیماری‌زا داشت. نتایج مشابهی در مطالعه Allameh و همکاران (۲۰۱۲) به‌دست آمده بود که باکتری اسیدلاکتیک *Leuconostoc mesenteroides* توانایی مهار *آئروموناس هیدروفیلا* را داشت. در بررسی حاضر ۴ جدایه توانایی مهار *ویبریو هارویی* را داشتند. Sivakumar و همکاران (۲۰۱۲) نیز در مطالعه خود فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* علیه *ویبریو هارویی* را مشاهده کردند. در همین راستا Widanarni و همکاران (۲۰۱۵) نیز توان ضدمیکروبی ۱۲ جدایه باکتریایی را علیه *ویبریو هارویی* مورد آزمایش قرار دادند، که به‌جز یک جدایه بقیه دارای قدرت ضدمیکروبی علیه این باکتری بودند و قطر هاله عدم رشد *ویبریو هارویی* ۱۳-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در مطالعه حاضر قطر هاله عدم رشد *ویبریوهارویی* در سه جدایه‌ایی که هاله عدم رشد هارویی ایجاد کردند، از نتیجه به‌دست آمده توسط این محققان کم‌تر (۲/۶ تا ۳/۳ میلی‌متر) بود. هرچند که قطر هاله عدم رشد به‌دست آمده با قطر هاله عدم رشدی که باکتری *لاکتوباسیلکازئی* به‌عنوان کنترل مثبت ایجاد کرده بود اختلاف معنی‌داری نداشت. از طرفی در مطالعه حاضر با روش چاهک‌گذاری تنها تعداد معدودی از باکتری‌های اسیدلاکتیک توانایی ایجاد هاله عدم رشد را در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان دادند. نتایج مشابهی نیز در مطالعه Zapata و Lara-Flores (۲۰۱۳) به‌دست آمد که باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از لوله گوارش ماهی تیلاپیای نیل به‌روش چاهک گذاری قادر به ایجاد هاله عدم رشد در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا نبودند که شاید به این دلیل باشد که باکتری‌های اسیدلاکتیک زمانی که به تنهایی در محیط کشت هستند مواد مهارکننده رشد را تولید نمی‌کنند یا این‌که شرایط رشد آن‌ها مطلوب نبود و یا این‌که رقابت یا عامل محرکی جهت تولید مواد مهارکننده رشد وجود نداشت. احتمالاً دلیل مشاهده نشدن هاله عدم رشد در اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک در بررسی حاضر نیز به‌خاطر عدم وجود عامل بیماری‌زا یا عامل محرک در محلول رویی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده (Supernatant) بوده که به تنهایی در محیط آبگوشت MRS کشت داده شده حضور داشتند و باکتری بیماری‌زا یا عامل محرکی جهت تولید مواد ضدمیکروبی آن‌ها وجود نداشته است و این موضوع با نتایج دیگر محققان نیز هم‌خوانی دارد (Filho-Lima و همکاران، ۲۰۰۰؛ Zapata و Lara-Flores، ۲۰۱۳). گونه‌های *باسیلوس* آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل باسیتراسین، پلی میکسین، تریکودین، گرمیسیدین، سیرکولین را خصوصاً طی فرایند اسپورزایی تولید می‌کنند (Brock، ۱۹۸۴). *انتروکوکس‌ها* نیز باکتری‌های اسیدلاکتیکی می‌باشند که توانایی تولید پپتیدهای ضدمیکروبی با نام انتروسین را دارند (صالحی و حاتمی، ۱۳۹۳). مطالعات قبلی فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های *باسیلوس*

(*Bacillus pumilus*) و *انتروکوکوس* (*Enterococcus faecalis*) را نشان دادند (Dhanalakshmi و Ramasubramanian، ۲۰۱۷؛ Sreenivasulu و همکاران، ۲۰۱۶)، ولی در مطالعه حاضر جدایه‌های باکتری‌های *انتروکوکوس* و *باسیلوس* جداسازی شده با هر دو روش آزمایش شده فاقد هرگونه فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا بودند، که با مطالعات قبلی مغایرت داشت و احتمالاً به‌علت تفاوت در سویه‌های *باسیلوس* و *انتروکوکوس* می‌باشد. پروبیوتیک‌ها اساساً باعث ممانعت از رشد و تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا، بهبود تغذیه آبزیان پرورشی، بهبود کیفیت آب، کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی و کاهش آلودگی محیط زیست می‌گردند (علیشاهی، ۱۳۸۸). در مطالعه حاضر روش کشت خطی بهتر از روش چاهک‌گذاری فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های مورد بررسی را نشان داد که احتمالاً به‌علت مجاورت باکتری‌های زنده در کنار هم می‌باشد. جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک شماره ۹۳، ۹۴ و ۹۵ که پس از تعیین هویت مولکولی با استفاده از توالی ژن ۱۶S rRNA *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تشخیص داده شدند، به‌جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینیاروکری* و *لاکتوکوکوس گارویه* دارای توان ضدمیکروبی بسیار خوبی می‌باشند و قابل رقابت با باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* هستند، که جهت بررسی‌های بیش‌تر جهت نیل به اهداف پروبیوتیک در صنعت پرورش آبزیان در کشور می‌توان از این جدایه‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱. **آهنگرزاده، م.؛ قربانپور، م.؛ پیغان، ر.؛ شریف‌روحانی،م. و سلطانی، م.، ۱۳۹۴.** نقش *آئروموناس هیدروفیلا* در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپورماهیان پرورشی استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۵ تا ۱۶.

۲. **خسروی‌دارانی، ک. و کوشکی، م.ر.، ۱۳۸۷.** پروبیوتیک‌ها در شیر و فرآورده‌های آن. انتشارات مرز دانش. ۲۶۸ صفحه.

۳. **رحمتی‌اندانی، ح.؛ توکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۹۰.** افزایش مقاومت ماهی قزل آلای رنگین کمان در برابر عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* با استفاده از لاکتوباسیل‌های جداشده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۲۶ تا ۳۵.

۴. **سلطانی، م.؛ رئیسی، م.؛ گودرزی، م.ع.؛ ممتاز، ح. و مومنی، م.، ۱۳۹۱.** تعیین فراوانی *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهارمحال و بختیاری و تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA جدایه‌های حاصله. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره ۱، صفحات ۶۱ تا ۶۷.

۵. **شهرانی، م.؛ رئیسی، م. و تاجبخش، ا.، ۱۳۹۳.** مطالعه فراوانی و مقاومت دارویی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان چهارمحال و بختیاری. فصلنامه زیست شناسی میکروارگانیسم‌ها. شماره ۱۱، صفحات ۷۱ تا ۷۸.

۶. **صالحی، م. و حاتمی، ز.، ۱۳۹۳.** بررسی مولکولی در حضور ژن انتروسین A در میان سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* مسیر گوارشی و تاثیر ضدمیکروبی این باکتریوسین علیه عوامل بیماری‌زای بیمارستانی. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران. سال ۸، شماره ۱، صفحات ۱۷ تا ۲۶.

۷. **علیشاهی، م.، ۱۳۸۸.** مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز. ۴۹۹ صفحه.

۸. **کریم‌زاده، ص.؛ بهمنش، ش. و نادری، ع.، ۱۳۹۴.** فواید و کاربرد پروبیوتیک‌ها در صنعت آبزی پروری. انتشارات پرتو واقعه. چاپ سوم. ۵۵ صفحه.

۹. **محمدیان،ت.؛قربانپور،م.؛علیشاهی،م.؛تابنده،م.ر. و غریبی، د.، ۱۳۹۳.** جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۰، شماره ۲، صفحات ۸۷ تا ۹۷.

۱۰. **مصباح، م.؛ محمدیان، ت.؛ دادار، م. و غریبی، د.، ۱۳۹۵.** بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی در آبزی‌پروری. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز. ۴۰۵ صفحه.

۱۱. **موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۱۳۹۴.** تعیین هویت و شناسایی عوامل بیماری‌زای عفونی آبزیان کشور و راهکارهای پیشگیری. کنترل و درمان آن‌ها. سازمان تحقیقات. آموزش و ترویج کشاورزی. ۱۵۴ صفحه.

۱۲. **میربخش، م. و باصری، س.، ۱۳۹۵.** آشنایی با بیماری ویبریوزیس ناشی از *ویبریو هارویی* در میگو. فصلنامه میگو و سخت‌پوستان. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۲۳ تا ۲۵.

۱۳. **Allameh, S.K.; Daud, H.; Mohammad Yusoff, F.; Saad, C.R. and Ideris, A., 2012.** Isolation, identification and characterization of Leuconostoc mesenteroides as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*), African J of Biotechnology. Vol. 11, No. 16, pp: 3810-3816.

۱۴. **Aly, S.M.; Ahmed, Y.A.G.; Ghareeb, A.A.A. and Mohamed, M.F., 2008.** Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shell Immunology. Vol. 25, pp:128-136.

۱۵. **Barman, P.; Banerjee, A.; Bandyopadhyay, P.; Chandra Monda, K. and Kumar Das Mohapatra, P., 2011.** Isolation, identification and molecular characterization of potential probiotic bacterium, *Bacillus subtilis* PPP 13 from

(*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture. Vol. 198, No. 3-4, pp: 229-236.

۳۱. **Ogbonnia, S.O.; Enwuru, N.V.; Onyemenem, E.U.; Oyedele, G.A. and Enwuru, C.A., 2008.** Phytochemical evaluation and antibacterial profile of Treculia africana Decne bark extract on gastrointestinal bacterial pathogens. African Journal of Biotechnology. Vol. 7, pp: 1385-1389.

۳۲. **Pybnus, V.; Loutit, M.W.; Lamont, L.L. and Tagg, J.R., 1994.** Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL 4335.Journal of Fish Disease. Vol. 17, pp: 311-324.

۳۳. **Ravaei, A.; Heshmati poor, Z.; Zahraei Salehi, T.; Ashrafi Tamai, I.; Ghane M. and Derakhshan pour, J., 2013.** Evaluation of Antimicrobial Activity of Three Lactobacillus spp. against Antibiotic Resistance *Salmonella typhimurium*. Advanced Studies in Biology. Vol. 5, pp: 61-70.

۳۴. **Ringo, E.; Løvmo, L.; Kristiansen, M.; Bakken, Y.; Salinas, I.; Myklebust, R.; Olsen, R.E. and Mayhew, T.M., 2010.** Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish. Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 451-467.

۳۵. **Ringø, E. and Gatesoupe, F.J., 1998.** Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. Vol. 160, No. 3-4, pp: 177-203.

۳۶. **Shakibazadeh, S.; Saad Che, R.; Hafezieh, M.; Christianus, A.; Saleh Kamarudin, M. and Sijam, K., 2012.** A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 11, No. 4, pp: 849-866.

۳۷. **Sivakumar, N.; Sundararaman, M. and Selvakumar, G., 2012.** Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). African J of biotechnology Vol. 11, No. 91, pp:15811-15818.

۳۸. **Sreenivasulu, P.; Suman Joshi, D.S.D.; Narendra, K.; Venkata Rao, G. and Krishna Satya, A., 2016.** *Bacillus pumilus* as a potential probiotic for shrimp culture. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. Vol. 4, No. 1, pp: 107-110.

۳۹. **UNWFP. 2005.** The state of food insecurity in the world. Food and Agriculture Organization, United Nations World Food Programme.

۴۰. **Vieira, F.N.; Jatobá, A.; Luiz Pedreira Mouriño, J.; Vieira, E. A.; Soares, M.; Silva, B.C.; Seiffert, W.Q.; Martins, M.L. and Vinatea, L. A., 2013.** In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture, Pesquisa Agropecuária Brasileira, Vol. 48, pp: 998-1004

۴۱. **Voravuthikunchai, S.P.; Bilasoi, S. and Supamala, O., 2006.** Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. Anaerobe. Vol. 12, pp: 221-226.

۴۲. **Widanarni, W.; Nopitawati, T. and Jusadi, D., 2015.** Screening of probiotic bacteria candidates from gastrointestinal tract of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and their effects on the growth performances. Research J of Microbiology. Vol. 10, No. 4, pp: 145-157.

۴۳. **Zapata, A.A. and Lara-Flores, M., 2013.** Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Nile Tilapia Intestine (*Oreochromis niloticus*). Journal of Biology and Life Science. Vol. 4, No. 1, pp: 164-171.

Penaeus monodon. Research Article, Journal of Biotechnology, Bioinformatic and Bioengineering. Vol. 1, No. 4, pp: 473-482.

۱۶. **Bisht, A. and Pandey, N., 2013.** Influence of probiotic administration, donminant gut bacterial strain *Bacillus subtilus* on growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research. Vol. 2, pp: 386-392.

۱۷. **Brock, T.D. and Clyne, J., 1984.** Significance of algal excretory products for growth of epilimnetic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 47, pp: 731-734.

۱۸. **Buntin, N.; Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T., 2008.** Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin Journal of Science and Technology. Vol. 30, No. 1, pp: 141-148.

۱۹. **Dhanalakshmi, P. and Ramasubramanian, V., 2017.** Effect of Probiotics and Prebiotics Supplemented Diets on Immune Resistance against *Aeromonas hydrophila* in Mrigal Carp. Annals of aquaculture & research. Vol. 4, No. 3, p: 1042.

۲۰. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.** Fisheries and Aquaculture Department. FAO Global Aquaculture Production.

۲۱. **Filho-Lima, J.V.M.; Vieira, E.C. and Nicoli, J.R., 2000.** Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* sub sp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. J of Applied Microbiology. Vol. 88, pp: 365-370.

۲۲. **Gatesoupe, F.J., 2008.** Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. Vol. 14, pp: 107-114.

۲۳. **Johnson, J.L., 1994.** Similarity analysis of rRNAs. In Methods for General and Molecular Bacteriology ed. Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A. and Krieg, N.R. pp: 625-700.

۲۴. **Jayanth, K.; Jeyasekaran, G. and Shakila, R.J., 2001.** Biocontrol of Fish Bacterial Pathogens by the Antagonistic Bacteria isolated from the Coastal Waters of Gulf of Mannar, India. Bulletin of European Association of Fish Pathologist. Vol. 21, pp: 12-18.

۲۵. **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. Vol. 274 pp: 1-14.

۲۶. **Khalid, F.; Siddiqi, R. and Mojgani, N., 1999**. Detection and Characterization of a Heat Stable Bacteriocin (Lactocin LC-09) Produced by a Clinical Isolate of Lactobacilli. Medical J of Islamic academy of science. Vol. 12, pp: 67-71.

۲۷. **Kumar, G.; Menanteau-Ledouble, S.; Saleh, M. and El Matbou, M., 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Veterinary Research. Vol. 46, pp: 103-113.

۲۸. **McKeegan, K.S.; Borges-Walmsley, M.I. and Walmsley, A.R., 2002.** Microbial and viral drug resistance mechanisms. Trends in Microbiology. Vol. 10, pp: 8-14.

۲۹. **Mirbakhsh, M.; Akhavansepahy, A.; Afsharnasab, M.; Khanafari, A. and Razavi, M.R., 2013.** Screening and evaluation of indigenous bacteria from the Persian Gulf as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 12, No. 4, pp: 873-886.

۳۰. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.; Salminen, S. and Bylund, G., 2001**. Protection of rainbow trout