مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی گونه های سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) جدا شده از میگوی سفید غربی پرورشی (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) علیه گونه‌های بیماریزای ویبریو (*Vibrio* spp.)

رامین کریم زاده[۱و۲]، امیر هوشنگ بحری[۱]، محسن گذری[۲*]

[۱] دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس

[۲] پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۱۰/۲۹
اصلاح: ۹۵/۰۲/۰۴
پذیرش: ۹۵/۰۵/۱۲

کلمات کلیدی:
پروبیوتیک
سودوموناس
میگوی سفید غربی
ویبریو

چکیده

در این پژوهش فعالیت ضد باکتریایی جدایه های سودوموناس جداسازی شده از هپاتوپانکراس میگوی سفید غربی پرورشی در مقابل گونه های ویبریو بیماریزا مورد ارزیابی قرار گرفت. میگوهای جمع آوری شده از ۹ استخر مجزا در سه محیط کشت مختلف تلقیح گردید. نتایج بیانگر عملکرد بالای محیط کشت سودوموناس آیزولیشن آگار (PIA) با جداسازی به طور متوسط ۲۲ جدایه سودوموناس بود. در کل حدود۴۰ جدایه سودوموناس جداسازی شد. غربالگری فعالیت ضد باکتریایی جدایه های به دست آمده با روش انتشار از چاهک بیانگر فعالیت ضدباکتریایی دو جدایه MR 21 و MR 35 بود. دو جدایه مولد پس از ۷۲ ساعت بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه تمام گونه‌های ویبریو شامل *Vibrio parahaemolyticus*، *V. harveyi*، *V. anguillarum* و *V. alginolyticus* نشان دادند. شناسایی بیوشیمیایی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه‌های مولد بیانگر تعلق آنها به گونه *Pseudomonas aeroginosa* بود. بیشترین میزان فعالیت ضدباکتریایی جدایه های مولد در محیط کشت تریپتیک سویا براث (TSB) ارائه گردید. بررسی تاثیر دما بر فعالیت ضد باکتریایی نشانگر پایداری فعالیت ضدباکتریایی در دماهای ۲۵°c، ۳۵°cو ۴۵°c بود. فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌های MR 21 و MR 35 در حضور آب نسبت به آب مقطر افزایش معناداری نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه های بومی *P. aeroginosa* strain MR 35 و *P. aeroginosa* strain MR 21 می توانند به عنوان کاندیدای بالقوه پروبیوتیک برای مطالعات تکمیلی مطرح باشند.

مقدمــه

آبزی پروری یک صنعت چند میلیارد دلاری است و بخش عمده ای از تجارت غذا در دنیا را به خود اختصاص داده است. با توجه به کاهش منابع طبیعی آبزیان دریایی توسعه صنعت آبزی پروری ضروری می نماید (Farmer *et al.*, 2014). از بزرگترین تهدیداتی که روند توسعه این صنعت را با اختلال مواجه کرده بروز بیماری ها در آبزیان می باشد. شیوع بیماریهای مختلف تلفات سنگینی را بر کشورهای جنوب شرق آسیا وارد نموده است. مهمترین این بیماریها ویبریوزیس می باشد (Dash *et al.*, 2017). گونه های عمده ایجاد کننده بیماری ویبریوزیس شامل *Vibrio parahaemolyticus*، *V. harveyi*، *V. anguillarum* و

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: M_Gozari@yahoo.com

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017

V. alginolyticus می باشند (Rattanama *et al.*, 2009). استفاده از آنتی بیوتیک ها یکی از متداول ترین راهکارهای مقابله با بیماریها در آبزی پروری محسوب می شود. این راهکار دارای معایب مختلفی از جمله تاثیرات منفی شدید بر محیط زیست، ایجاد مقاومت در باکتریهای آبزی و افزایش تغییرات فلور میکروبی در رسوب و در نتیجه تبدیل بخش آبزی پروری به منبع اشاعه مقاومت آنتی بیوتیکی در بین موجودات خشکی زی و باکتریهای بیماریزای انسان است (Cabello *et al.*, 2016). موفق ترین ابزار جایگزین برای کنترل تکثیر ویبریوهای بیماریزا استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان عوامل کنترل زیستی در پرورش میگو می باشد. پروبیوتیک یک مکمل میکروبی زنده است که با روش های مختلف شامل اصلاح جامعه میکروبی وابسته به میزبان یا پیرامون آن، تضمین نمودن استفاده بهینه از مواد غذایی یا افزایش ارزش غذایی آن، تقویت پاسخ میزبان به بیماری و بهبود بخشیدن کیفیت محیط پیرامون میزبان دارای تاثیر مفید برای میزبان می باشد (Pandiyan *et al.*, 2013). گونه هایی که به طور تجاری در صنعت آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرند شامل گونه های باسیلوس، لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس، انتروکوکوس و ساکارومایسس و سودوموناس می باشند (Martínez Cruz *et al.*, 2012). گونه های جنس سودوموناس باکتریهای جذابی برای یافتن منابع جدید ترکیبات زیست فعال شامل آنتی بیوتیک ها، باکتریوسین ها، بیوسورفکتانت ها و آنزیم های باکتریولیتیک هستند (Poblete-Castro *et al.*, 2012). این باکتریها به طور گسترده در خاک و زیستگاههای آبی مانند استخرهای پرورش میگو انتشار دارند (Sakami *et al.*, 2008). Chau و همکاران (۲۰۱۱)، با غربالگری جدایه های آنتاگونیست در مقابل ویبریوهای پاتوژن جدا شده از استخرهای پرورش میگو در Thua Thien Hue و همچنین شناسایی گونه‌های آنتاگونیست موفق به معرفی جدایه *Pseudomonas* sp. *P9* به عنوان یک پروبیوتیک بالقوه گردیدند. Vijayan و همکاران یک پروبیونت بالقوه به نام *Pseudomonas* sp. PS-102 را از آب تالاب موتوکادو جداسازی کردند. این جدایه پروبیونت مولد فعالیت قابل ملاحظه ای در مقابل ۷۳ درصد گونه های بیماریزای مورد بررسی نشان داد (Vijayan *et al.*, 2006) . هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه های سودوموناس از میگوی سفید غربی پرورشی و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی آنها علیه گونه های ویبریو بیماریزای منتخب بود.

مواد و روش‌ها

از سه استخر پرورش میگو واقع در سه مزرعه در سایت های تیاب شمالی و جنوبی شهرستان میناب در آبان ماه ۹۲ نمونه‌برداری انجام شد. از هر استخر پرورش تعداد ۳۰ نمونه میگوی سالم به صورت تصادفی و با استفاده از تور پرتابی و سینی غذادهی جمع آوری شد و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل گردید. از هپاتوپانکراس میگوهای جمع آوری شده با استفاده از سرنگ و سواپ استریل نمونه گیری شد و در محیط های کشت مارین آگار[1](MA) ، نوترینت آگار [2](NA) و سودوموناس آیزولیشن آگار [3](PSA) تلقیح شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۰^{oc} گرماگذاری گردیدند (Yates *et al.*, 2016). کلونی های جداشده پس از خالص سازی به منظور شناسایی اولیه مورد آنالیزهای مورفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی و آزمون های کاتالاز و اکسیداز، تریپل شوگر آیرون آگار و اکسیداسیون - تخمیر قرار گرفتند (Harley, 2004). فعالیت جدایه‌های سودوموناس در مقابل گونه‌های ویبریو مورد نظر شامل *V. alginolyticus* ATCC 17749، *V.* ATCC19264 *anguillarum*، *V. harveyi* KF154983 و V. *parahaemolyticus* KF154990 با استفاده از تکنیک انتشار از چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت (Magaldi *et al.*, 2004). به این منظور جدایه های خالص شده در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) ساخته شده با آب دریا تلقیح گردید و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm در دمای $۳۰^{\circ}c$ گرماگذاری شدند. مایع رویی به وسیله سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد. مایع رویی به درون چاهک تعبیه شده در محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده با رقت نیم مک فارلند از باکتریهای ویبریو مورد نظر اضافه شد. پلیت ها در دمای $۳۰^{\circ}c$ گرماگذاری شدند و قطر هاله ممانعت از رشد پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. پس از انتخاب جدایه های مولد، میزان فعالیت ضد باکتریایی در محیط TSB با محیط های کشت مارین براث (MB) و نوترینت براث (NB)

[1] Marine Agar
[2] Nutrient Agar
[3] Pseudomonas Isolation agar

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017

مورد مقایسه قرار گرفت. به دنبال ارزیابی تاثیر آب دریا بر میزان تولید ترکیب ضد باکتریایی، میزان تولید در محیط کشت TSB ساخته شده با آب دریا و آب مقطر مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور ترسیم منحنی رشد جدایه های مولد ترکیبات ضد باکتریایی غلظت نیم مک فارلند از باکتریهای مورد نظر در محیط نوترینت براث کشت داده شد. سپس جذب نوری هریک از آنها در زمان صفر و همچنین بعد از گذشت زمان های متوالی (۱۲،۲۴،۳۶،۴۸،۶۰،۷۲) در طول موج ۶۲۰ نانومتر ارزیابی و منحنی رشد رسم گردید. شناسایی تکمیلی جدایه های مولد ترکیب ضد باکتریایی با استفاده از مجموعه ای از روش‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک انجام گرفت (Harley, 2004).

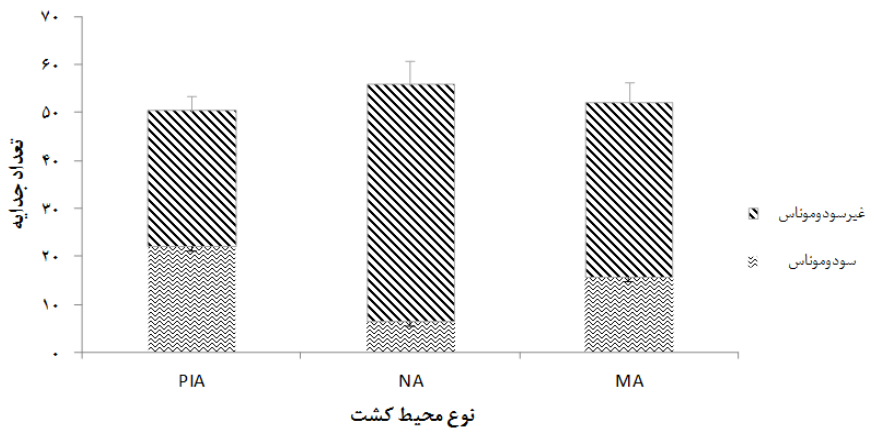
نتایــج

در مجموع، حدود ۱۵۰ کلنی از محیط های کشت جداسازی مختلف انتخاب شد. ارزیابی میزان جداسازی جدایه های سودوموناس در هر محیط کشت بر اساس مطالعات شناسایی اولیه برتری نسبی محیط کشت PIA را در جداسازی جدایه های سودوموناس نشان داد (شکل ۱). غربالگری فعالیت ضد باکتریایی حدود ۴۰ جدایه سودوموناس در مقابل گونه های ویبریو منتخب نشان داد تنها جدایه های MR 21 و MR 35 مولد ترکیب ضد باکتریایی بودند (شکل ۲). بر اساس اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد، تولید ترکیب ضد باکتریایی بعد از ۴۸ ساعت شروع شد و پس از ۷۲ ساعت به بیشترین میزان رسید (جدول ۱). آزمونهای شناسایی تکمیلی بر اساس مشخصات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نشان داد جدایه های MR 21 و MR 35 متعلق به گونه *Pseudomonas aeruginosa* بودند (جدول۲). ارزیابی میزان تولید ترکیب ضد باکتریایی جدایه های MR 21 و MR 35 در محیط های کشت مختلف بیانگر کارایی بیشتر محیط کشت TSB بود (شکل ۳). مقایسه تاثیر دما بر فعالیت ضد باکتریایی جدایه های سودوموناس مولد نشان داد جدایه MR 35 در دمای°C ۳۵ فعالیت ضد باکتریایی بالاتری دارد در حالیکه میزان فعالیت ضد میکروبی جدایه MR 21 با تغییر دما از °C ۳۵ به °C ۲۵ کاهش یافت. مقایسه فعالیت ضد باکتریایی جدایه های سودوموناس مولد در حضور آب دریا و آب مقطر نشان داد در حضور آب دریا میانگین قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط جدایه‌های MR 21 و MR 35 به میزان معناداری افزایش یافت (شکل ۵). مطالعه روند رشد جدایه های MR 21 و MR 35 بر اساس میزان تولید بیومس در بازه های زمانی مختلف و منحنی رشد بیانگر ورود هر دو جدایه به فاز سکون پس از طی ۲۴ ساعت پس از تلقیح بود (شکل ۶).

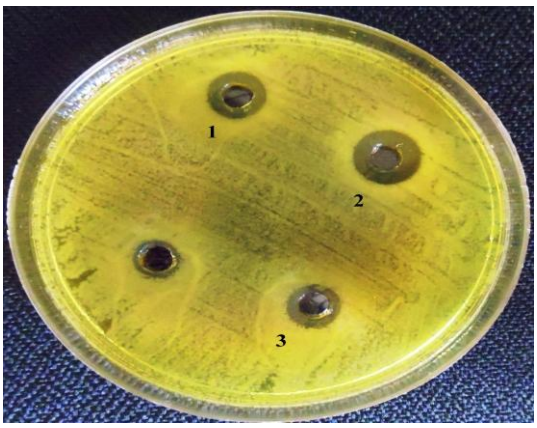
جدول ۱. بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه های سودوموناس علیه گونه های ویبریو

جدایه	زمان (ساعت)	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)			
		V. parahaemolyticus	*V. harveyi*	*V. anguillarum*	*V. alginolyticus*
MR 21	۲۴	۰	۰	۰	۰
	۴۸	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
	۷۲	۱۳	۱۴	۱۳	۱۴
MR 35	۲۴	۰	۰	۰	۰
	۴۸	۱۱	۱۰	۱۰	۱۱
	۷۲	۱۴	۱۳	۱۳	۱۵

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017



شکل ۱. ارزیابی محیط های کشت جداسازی سودوموناس از هپاتوپانکراس میگوی پرورشی

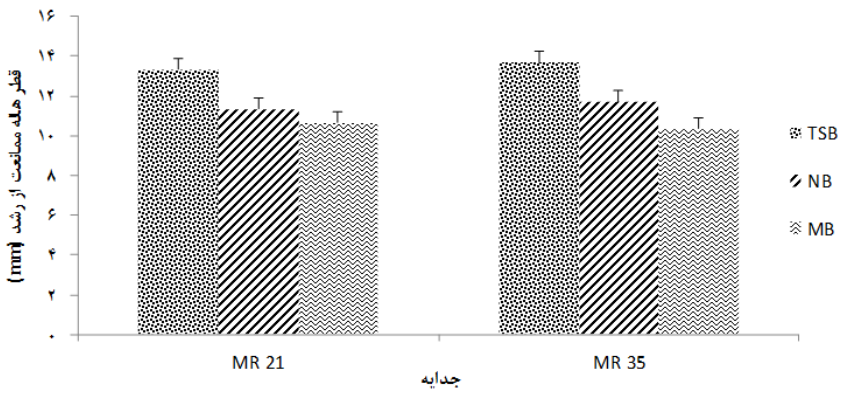


شکل ۲. فعالیت ضد باکتریایی جدایه های مولد در مقابل گونه *V. harveyi* در محیط کشت TCBS MR 35 پس از ۷۲ ساعت (1) MR 21 پس از ۷۲ ساعت (2) MR 21 پس از ۴۸ ساعت (3)

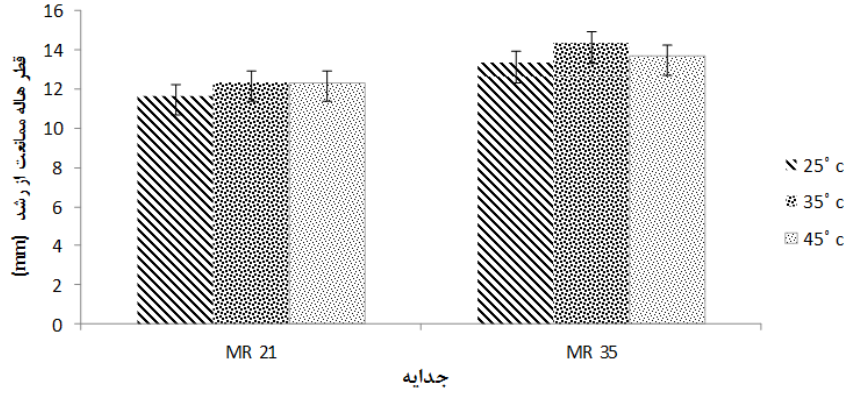
جدول ۲. مشخصات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه های سودوموناس مولد

مشخصه	MR 21	MR 35	مشخصه	MR 21	MR 35
Gram staining	–	–	Fermentation of		
Motility	+	+	Sucrose	-	-
Fluorescent pigment	–	–	Lactose	-	-
Oxidation fermentation	+/+	+/+	Glucose	+	+
Oxidase test	+	+	Arabinose	-	-
Methyl red test	-	-	Mannitol	+	+
Catalase test	+	+	Galactose	-	-
Indole production	-	-	Ribose	+	+
H2S production	-	-	Xylose	-	-
Urease	-	-	Rhamnose	-	-
Nitrate reduction	+	+	Malate	-	+
Voges-proskauer	–	-	Growth at:	–	–
			4˚C		
ONPG test	-	-	20˚C	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	30˚C	+	+
Citrate Utilization	+	+	42˚C	+	+

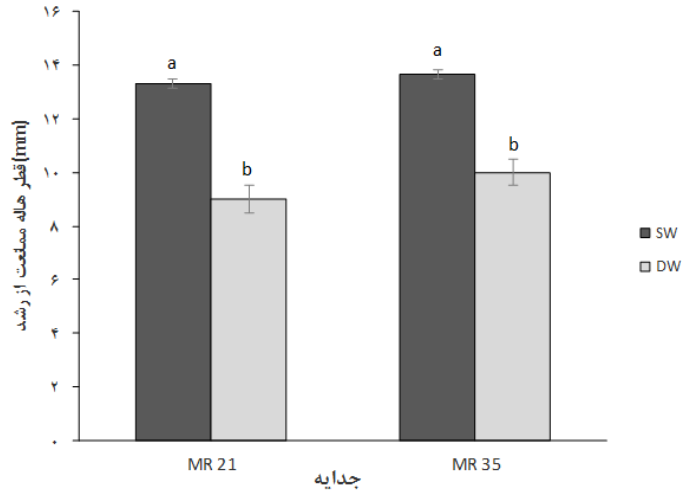
Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017



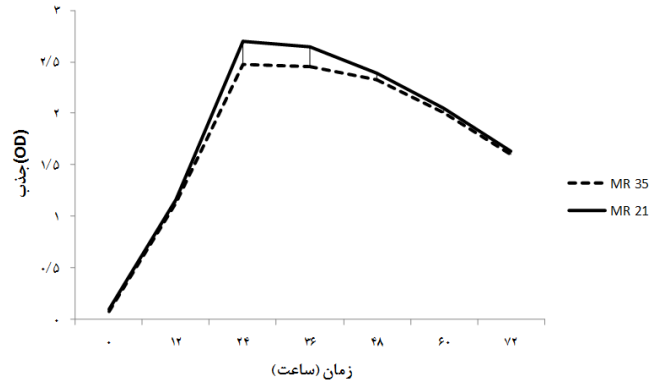
شکل ٣. تاثیر نوع محیط کشت بر فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های مولد



شکل ۴. تاثیر دما بر فعالیت ضد باکتریایی جدایه های مولد



شکل ۵. تاثیر آب دریا بر فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های سودوموناس مولد (حروف لاتین بیانگر معنادار بودن اختلاف میانگین‌ها می باشد)



شکل ۶. منحنی رشد جدایه های مولد

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017

بحث

امروزه میکروارگانیسم های بومی در پژوهش های بیوتکنولوژیک کاربرد گسترده ای دارند. با توجه به سازگاری این ارگانیسم‌ها به شرایط فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیستگاه در فازهای پایلوت و میدانی شانس عملکرد موفق آنها افزایش می یابد (Das *et al.*, 2008). به دلیل قابلیت بالای سودومونادها در تولید ترکیبات زیست فعال در این مطالعه فعالیت آنتاگونیستی آنها در راستای دستیابی به پروبیوتیک های بالقوه علیه گونه های ویبریوی بیماریزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از جداسازی و به دنبال آن شناسایی اولیه باکتریهای سودوموناس در محیط های کشت مختلف بیانگر افزایش نسبی جداسازی جدایه های سودوموناس در محیط کشت PIA نسبت به دو محیط کشت دیگر بود. به طوریکه محیط کشت PIA با جداسازی میانگین ۲۲ جدایه عملکرد بهتری را نسبت به محیط کشت MA با جداسازی میانگین ۱۵/۶۶ و نوترینت آگار با جداسازی میانگین ۸ جدایه نشان داد (شکل ۱). در مطالعه Shakibazadeh و همکاران نیز حضور گونه های سودوموناس را در هپاتوپانکراس میگوی پرورشی *Penaeus monodon* با کشت روی محیط PIA تایید گردید (Shakibazadeh *et al.*, 2012). به دلیل حضور آنتی بیوتیک وسیع الطیف Irgasan در محیط کشت PIA و همچنین گلیسرول به عنوان منبع انرژی که در محیط های آبی حضور دارد این محیط کشت به صورت انتخابی عمل نمود. اگرچه محیط MA تنوع بیشتری را ارائه نمود. این نتیجه، تفاوت کارایی محیط های کشت انتخابی و عمومی را در محیط های دریایی نشان داد. نتایج به دست آمده از غربالگری فعالیت ضد باکتریایی ۴۰ جدایه سودوموناس جدا شده در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت نشان داد تنها دو جدایه MR 21 وMR 35 فعالیت ضد باکتریایی را در مقابل گونه های ویبریو مورد نظر نشان دادند (جدول ۱). در مطالعه ای که توسط Vijayan و همکارانش در سال ۲۰۰۶ انجام شد ۳۷ درصد جدایه های جدا شده از آب تالاب موتوکادو فعالیت بازدارندگی علیه گونه های ویبریو بیماریزای میگو را ارائه نمودند (Vijayan *et al.*, 2006). در همین زمینه مطالعه Gozari و همکاران نشان داد ۲۷ درصد از اکتینوباکتریهای جداشده از رسوبات استخرهای پرورش میگوی منطقه تیاب علیه گونه های بیماریزای ویبریو فعالیت بازدارندگی ارائه نمودند (Gozari *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر تولید ترکیب ضد باکتریایی در مورد هر دو جدایه بعد از ۴۸ ساعت کشت مشاهده شد درحالیکه بیشترین فعالیت ضد باکتریایی بعد از ۷۲ ساعت ثبت گردید (جدول ۱). با توجه به تولید متابولیت های ثانویه از قبیل ترکیبات ضد باکتریایی در فاز سکون و تولید متابولیت های اولیه مثل باکتریوسین ها در فاز لگاریتمی می توان نتیجه گرفت که فعالیت مشاهده شده به دلیل تولید ترکیبات ضد باکتریایی توسط جدایه های مورد بررسی می باشد و ترکیب تولیدی ماهیت باکتریوسین یا آنزیمی ندارد (Madigan *et al.*, 2012). بررسی طیف اثر جدایه های سودوموناس مولد نشان داد که جدایه های MR 21 وMR 35 علیه هر ۴ گونه ویبریو اثر ضد باکتری را اعمال می کنند (جدول ۱). بنابراین ترکیب تولید شده یک ترکیب ضد میکروبی وسیع الطیف در سطح گونه های ویبریو می باشد. شناسایی جدایه‌های سودوموناس مولد بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، مورفولوژیک و فیزیولوژیک بیانگر تعلق جدایه های MR 21 و MR 35 به گونه *P. aeroginosa* بود (جدول ۲). در همین راستا نتایج تحقیق Chythanya و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که جدایه *Pseudomonas* I-2 جدا شده از محیط دریایی یک هاله ممانعت از رشد بر علیه گونه ویبریو مورد نظر تولید نمود (Chythanya *et al.*, 2002). در مطالعه دیگری Gram و همکاران گونه *Pseudomonas fluorescens* AH 2 را به عنوان پروبیوتیک بالقوه برای مقابله با *V. anguillarum* در ماهی معرفی نمودند (Gram *et al.*, 1999). در یک مطالعه Eissa و همکارانش فعالیت ضد باکتریایی جدایه های *Pseudomonas fluorescens* را با استفاده از روش انتشار از چاهک در مقابل برخی گونه های بیماریزا از جمله *Streptococcus faecium* نشان دادند (Eissa *et al.*, 2014). نتایج غربالگری در محیط مایع نشان داد ترکیبات ضد باکتریایی تولید شده توسط جدایه های MR 21 و MR 35 در محیط ترشح شدند. ترشحی بودن این ترکیبات باعث عملکرد بالای باکتری در شرایط میدانی می شود. ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی جدایه های سودوموناس در محیط های کشت متفاوت بیانگر بیشترین فعالیت ضد باکتری در محیط TSB با میانگین قطر هاله ممانعت از رشد به ترتیب ۱۳/۳۳ و ۱۳/۶۶ در مورد جدایه های MR 21 و MR 35 بود (شکل ۳). احتمالاً به دلیل حضور منبع کربن دکستروز و منابع نیتروژن کازئین و آرد سویا محیط TSB دارای ترکیبات مغذی بیشتر برای تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی می باشد (Baltz *et al.*, 2010). با توجه به وجود آرد سویا در ترکیب غذای میگو، جدایه های MR 21 و MR 35 قابلیت مصرف این منبع نیتروژن

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017

و ارائه فعالیت ضد میکروبی را در شرایط میدانی دارند. ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی جدایه های سودوموناس مولد در دمای مختلف نشان داد که بالاترین میزان تولید ترکیب ضد میکروبی در مورد جدایه MR 21 در دمای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد با قطر هاله ممانعت از رشد با میانگین ۱۲/۳۳ می باشد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضد میکروبی پایین تری به میزان میانگین ۱۱/۶۶ ثبت شد. در مورد جدایه MR 35 بیشترین هاله ممانعت از رشد در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به میزان میانگین ۱۴/۳۳ ثبت گردید (شکل ۴). این نتایج بیانگر آن است که تغییرات دمایی تاثیر اندکی بر تولید ترکیب ضد میکروبی توسط جدایه های مولد دارد. این نتیجه پایداری فعالیت ضد میکروبی باکتریهای مولد را در دمای بین ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتیگراد نشان می دهد. بنابراین جدایه های مولد در نوسانات دمایی موجود در استخرهای تکثیر یا پرورش میگو فعالیت ضد باکتریایی خود را اعمال می نمایند. مقایسه فعالیت ضد باکتریایی جدایه های سودوموناس مولد در حضور آب دریا و آب مقطر نشان داد جدایه‌های21 MR و MR 35 در محیط TSB حاوی آب دریا فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به محیط TSB ساخته شده با آب مقطر ارائه دادند (شکل ۵). بر اساس این یافته می توان استنباط نمود احتمالا باکتریهای مولد جدا شده با توجه به عملکرد بهتر در حضور آب دریا دارای منشاء دریایی بوده و یا با شرایط دریایی سازش یافته اند و جزو باکتریهای خاکزی کلونیزه شده در هپاتوپانکراس میگو نمی باشند. بررسی منحنی رشد جدایه های21 MR و MR 35 بیانگر ورود باکتری به فاز سکون ۲۴ ساعت پس از مراحل رشد لگاریتمی بود و پس از طی این مرحله متابولیت های ثانویه مانند آنتی بیوتیک ها تولید شده به تدریج تولیدشان زیاد گردید (شکل ۶). این نتایج با بررسی تولید هاله ممانعت از رشد در زمانهای ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت مطابقت داشت به طوریکه بیشترین تولید ترکیب ضد میکروبی در ۷۲ ساعت ثبت گردید. در این پژوهش فعالیت ضد باکتریایی دو جدایه سودوموناس جداشده از میگوی سفید غربی پرورشی علیه گونه های غالب ویبریو بیماریزای میگو در فاز آزمایشگاهی تأیید گردید. این دستاورد می تواند گامی مؤثر در جهت دستیابی به جدایه های پروبیوتیک بالقوه باشد. با توجه به بومی بودن جدایه‌های MR 21 و MR 35 این باکتریها سازش‌های اکولوژیک با زیستگاه خود یافته و علاوه بر افزایش قابلیت بقا بهترین گزینه برای مطالعات تکمیلی در این زمینه می باشند.

منابــع

Baltz, R.H., Demain, A.L., Davies, J.E. 2010. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 3th edition. American Society for Microbiology Press. pp. 659-668.

Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., Dölz, H.J. 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. The Lancet Infectious Diseases. 16(7): e127-e133.

Chau, N.T.T., Quang, P.H., Lan, P.T.N., Matsumoto, M., Miyajima, I. 2011. Identification and characterization of *Pseudomonas* sp .P9 antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. isolated from shrimp culture pond in Thua Thien Hue-Viet Nam. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University. 56(1): 23-31.

Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture. 208(1): 1-10.

Das, S., Ward, L.R., Burke, C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. Applied Microbiology and Biotechnology. 81(3): 419-429.

Dash, P., Avunje, S., Tandel, R.S., Panigrahi, A. 2017. Biocontrol of *Luminous Vibriosis* in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 25(3): 245-255.

Eissa, N., Abou El-Gheit, N., Shaheen, A.A. 2014. Protective effect of *Pseudomonas fluorescens* as a probiotic in controlling fish pathogens. American Journal of BioScience. 2(5): 175-181.

Farmer, T., Grainger, R., Plummer, J. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and Challenges. Rome, FAO.

Gozari, M., Mortazavi, M., Bahador, N., Rabbaniha, M. 2016. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp Litopenaeus vannamei. Iranian journal of fisheries sciences. 15(2): 630-644.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 20:43 +0330 on Friday November 17th 2017

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by*Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology. 65(3): 969-973.

Harley, J.P. 2004. Laboratory Exercises in Microbiology. McGraw-Hill Science, Engineering & Mathematics. 351 p.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. 2012. Brock Biology of Microorganisms. 13th edition. Pearson Education. San Francisco, USA. 1150 p.

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C.H., Perez, C., Colella, M., Olaizola, C., Ontiveros, Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. International Journal of Infectious Diseases. 8(1): 39-45.

Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A., Ramírez Saad, H.C. 2012. Use of probiotics in aquaculture. ISRN Microbiology. 13 p.

Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., Sadayappan, B. 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today. 5(1): 55-59.

Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., Dos Santos, V.M., Wittmann, C. 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. Applied Microbiology and Biotechnology. 93(6): 2279-2290.

Rattanama, P., Srinitiwarawong, K., Thompson, J.R., Pomwised, R., Supamattaya, K., Vuddhakul, V. 2009. Shrimp pathogenicity, hemolysis, and the presence of hemolysin and TTSS genes in *Vibrio harveyi* isolated from Thailand. Diseases of Aquatic Organisms. 86(2): 113-122.

Sakami, T., Fujioka, Y., Shimoda, T. 2008. Comparison of microbial community structures in intensive and extensive shrimp culture ponds and a mangrove area in Thailand. Fisheries Science. 74(4): 889-898.

Shakibazadeh, S., Saad, R., Hafezieh, M., Christianus, A., Saleh, M., Sijam, K. 2012. A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 11(4): 849-866.

Vijayan, K., Singh, I.B., Jayaprakash, N., Alavandi, S., Pai, S.S., Preetha, R., Rajan, J., Santiago, T. 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquaculture. 251(2): 192-200.

Yates, M.V., Nakatsu, C.H., Miller, R.V., Pillai, S.D. 2016 .Manual of Environmental Microbiology. 4th edition. American Society for Microbiology (ASM). 1088 p.