



## Evaluation of the effect of indigenous probiotic administration on gut bacterial diversity of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*

Zeinab Chatrooz<sup>1</sup>, Iman Sourinejad<sup>1</sup>, Mohsen Gozari<sup>2</sup>

1. Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

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

### Article Info

Article type: Research

#### Article history:

Received: 18 January 2024

Accepted: 9 April 2024

ePublished: 26 May 2024

\* Corresponding Author:

sourinejad@hormozgan.ac.ir

#### Keywords:

Gut microbiome, Probiotic, Pacific white shrimp, Bacteria genetic identification.

### ABSTRACT

The objective of this study was to assess the impact of a native probiotic product on the intestinal bacteria biodiversity of *Penaeus vannamei*. Shrimp larvae were administered the probiotic via food (treatment 1), through culture water (treatment 2), and a control group received no probiotics (treatment 3). After three months of rearing, bacteria were isolated from the shrimp intestines, and initial identification was conducted based on morphological, biochemical, and physiological traits. The diversity of intestinal bacterial flora was assessed using PCR-RFLP methods, focusing on the determination of 16S rRNA gene sequences. Results revealed a significantly higher abundance of cultivable bacteria in the intestines of shrimp from treatment 1 ( $2.4 \times 10^7$  CFU/gr) compared to those receiving probiotics through water ( $6.16 \times 10^6$  CFU/gr). The probiotic product led to a reduction in bacterial diversity in the intestines of treated shrimp, decreasing from 10 to 6 genera. Additionally, the frequency of *Vibrio* bacteria decreased by 20%, while other opportunistic pathogenic bacteria such as *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Shewanella*, and *Photobacterium* were eliminated. Overall, the findings suggest that administering probiotics through food was more effective in modulating the diversity of the shrimp intestinal microbiome. This study enhances our understanding of the impact of indigenous probiotics on the composition and dynamics of the intestinal microbiome of *P. vannamei*.



Publisher: University of Hormozgan.



## ارزیابی تاثیر فراورده پروبیوتیک بومی بر تنوع زیستی باکتری‌های روده میگوی سفید غربی *Penaeus vannamei*

زینب چترروز<sup>۱</sup>، ایمان سوری نژاد<sup>۱\*</sup>، محسن گذری<sup>۲</sup>

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

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

### چکیده

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

\* نویسنده مسئول:

[sourinejad@hormozgan.ac.ir](mailto:sourinejad@hormozgan.ac.ir)

کلیدواژه‌ها:

میکروبیوم روده،

پروبیوتیک،

میگوی سفید غربی،

شناسایی ژنتیکی باکتری.

در مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر فراورده پروبیوتیک بومی بر تنوع زیستی باکتری‌های روده میگوی سفید غربی *Penaeus vannamei* بررسی شد. پست لاروهای میگو در ۳ تیمار شامل افزودن پروبیوتیک بومی به جیره غذایی (تیمار ۱)، افزودن پروبیوتیک بومی در آب تانک (تیمار ۲) و پرورش میگو بدون استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی (تیمار ۳) به مدت ۳ ماه تغذیه شدند. پس از نمونه برداری، جداسازی باکتریها از روده میگو و شناسایی اولیه بر اساس ویژگی های شاخص مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک انجام شد. تنوع زیستی فلور باکتریایی روده با استفاده از روش های PCR-RFLP و تعیین توالی ژن rRNA ۱۶S سنجش شد. نتایج نشان داد فراوانی باکتری-های قابل کشت در روده میگوهای تیمار ۱ ( $4/2 \times 10^7$  CFU/gr) از میگوهای دریافت کننده تیمار ۲ ( $10^6$  CFU/gr)  $6/16 \times$  بیشتر بود. فراورده پروبیوتیک تنوع باکتریایی در روده میگوهای تغذیه شده را از ۱۰ جنس مختلف به ۶ جنس و فراوانی باکتری‌های *Vibrio* را به میزان ۲۰ درصد کاهش داده و سایر باکتری‌های بیماریزای فرصت طلب شامل *Photobacterium* و *Shewanella*، *Aeromonas*، *Pseudomonas* را در روده میگو حذف نمود. در مجموع نتایج نشان داد دریافت پروبیوتیک از طریق غذا کارایی بالاتری در تعدیل تنوع میکروبیوم روده میگو داشت و درک بهتری از تاثیر پروبیوتیک بومی بر ترکیب و پویایی میکروبیوم روده میگوی سفید غربی فراهم نمود.



## مقدمه

آبزی پروری یکی از سریع‌ترین و بزرگترین بخش‌های تولید مواد غذایی است که نقش مهمی در ارائه فرصت‌های معیشتی پایدار و امنیت غذایی برای جمعیت جهان ایفا می‌کند (Dawood et al., 2020). توسعه فناوری‌های جدید از قبیل فراورده‌های پروبیوتیک‌ها در تسهیل رشد صنعت آبزی پروری مورد توجه قرار گرفته است. میگوی سفید غربی *Penaeus vannamei* یک گونه میگوی مهم تجاری است که ۸۰ درصد از تولید جهانی میگو را تشکیل می‌دهد. تولید جهانی میگوی سفید غربی به سرعت افزایش یافته و به ۴۴۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۷ رسیده است که ارزش کل آن ۲۶/۷ میلیارد دلار برآورد شده است (FAO, 2019). با تقاضای بالای بازار برای میگوی سفید غربی و پرورش متراکم و فوق متراکم آن، مشکلات جدی مانند شیوع بیماری‌های عفونی توسط باکتری‌ها شایع شده است. به طور خاص، باکتری *Vibrio* شایع‌ترین باکتری بیماری‌زا در پرورش میگو است که تأثیر جدی بر بقا، پاسخ‌های ایمنی و کاهش تولید دارد (Won et al., 2020). ظهور بیماری‌های عفونی در پرورش میگو باعث استفاده نادرست از عوامل آنتی بیوتیکی می‌شود (Zokaeifar et al., 2012). آنتی بیوتیک‌ها به عنوان عوامل شیمی درمانی برای میگو استفاده می‌شوند زیرا می‌توانند طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. با این حال، استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به بروز مقاومت باکتریایی شود. علاوه بر این، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در پرورش میگو به دلیل خطرات و پسماندهای شیمیایی برای مصرف کنندگان انسانی مخاطرات بالقوه‌ای ایجاد کرده است (Won et al., 2020) در نتیجه، مطالعات در مورد جایگزین‌های احتمالی برای آنتی بیوتیک‌ها در آبزی پروری میگو در حال انجام است. پروبیوتیک‌ها رویکردهای ایمنی هستند که به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک در شیوه‌های مختلف پرورش میگو مورد استفاده قرار می‌گیرند و نقش مهمی در پیشگیری از بیماری و حفظ تعادل میکروبی برای بهبود مکانیسم‌های دفاعی و پاسخ‌های ایمنی ذاتی دارند (Maeda et al., 2014). نتایج مطالعات اخیر نشان داده است استفاده از جنس‌های مختلف باکتری‌ها مانند *Enterococcus*، *Bacillus* و *Lactobacillus* منجر به تعدیل میکروبیوتای روده، تقویت پاسخ ایمنی، بهبود رشد و فعالیت آنزیم گوارشی در میگو شده است. به عنوان مثال، در میگوی سفید غربی می‌توان به پروبیوتیک‌های مخلوط گونه‌های *Bacillus subtilis*، *Bacillus licheniformis* و *Lactobacillus* اشاره نمود که مزایایی برای میزبان خود از جمله افزایش رشد و ایمنی غیر اختصاصی، تغییر مورفولوژی روده، و تعدیل میکروبیوتای روده نشان داده اند (Zhang et al., 2023). بنابراین، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تاثیر یک فراورده پروبیوتیک بومی بر تنوع زیستی باکتری‌های روده میگوی سفید غربی انجام شد.

## مواد و روش کار

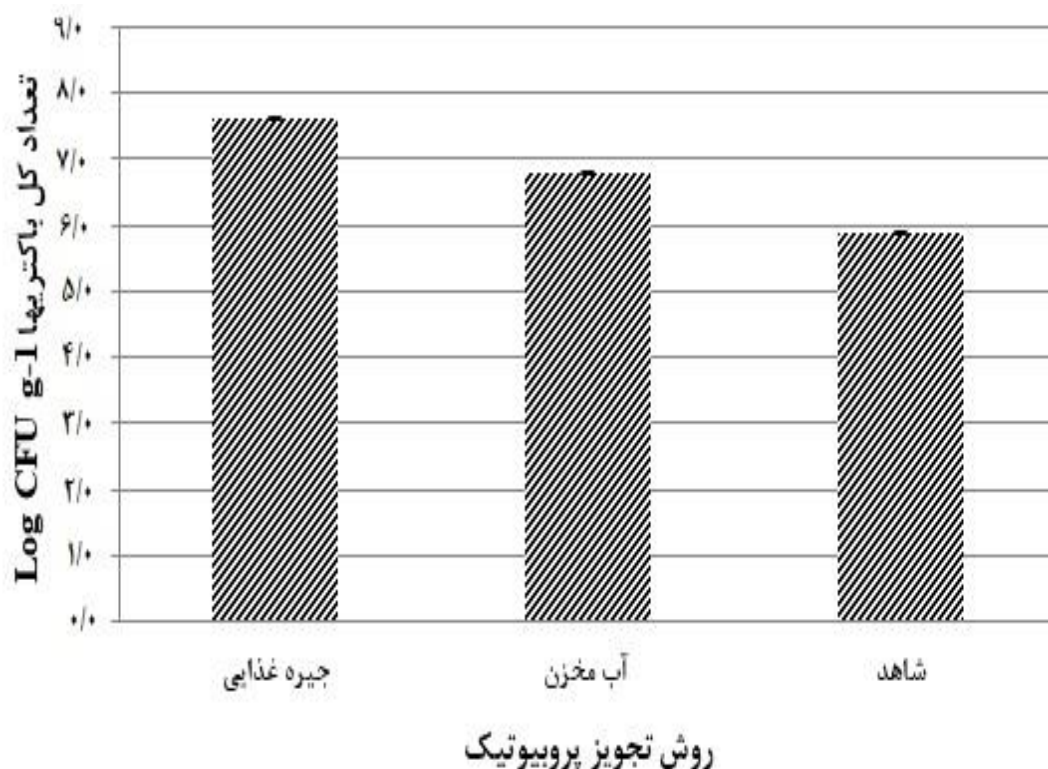
آزمایش‌های مطالعه حاضر با استفاده از ۹ عدد تانک پلی اتیلن ۳۰۰ لیتری با سطح ۱ متر مربع در بخش آبزی پروری پژوهشگاه اکتولوژی خلیج فارس و دریای عمان در فضای سرپوشیده انجام شد. پرورش پست لاروهای میگوی سفید غربی از مرحله پست لارو ۱۵ به مدت ۳ ماه با تراکم ۱۰۰ پست لارو در متر مربع در قالب ۳ تیمار شامل افزودن پروبیوتیک بومی در جیره غذایی (تیمار ۱)، افزودن پروبیوتیک بومی در آب تانک (تیمار ۲) و بدون استفاده از پروبیوتیک (تیمار ۳) انجام شد. هر تیمار دارای سه تکرار بود و تعویض آب در تانک‌ها به صورت محدود و هر ۱۰ روز یکبار انجام می‌شد. پست لارو میگوی سفید غربی از کارگاه تکثیر میگو (سنتدرف) واقع در بندر جاسک و غذای میگو از شرکت فرادانه خریداری شد. پروبیوتیک بومی مورد استفاده محصول طرح تحقیقاتی پژوهشگاه اکتولوژی خلیج فارس و دریای عمان حاوی کنسرسیونمی از سویه‌های مختلف *Bacillus* بود. تغذیه میگوها ۴ بار در روز انجام گرفت. برای تغذیه میگوها از غذای پلت پیش آغازین و آغازین ساخت شرکت فرادانه حاوی ۴۰٪ پروتئین و ۱۰٪ چربی

استفاده شد. میزان تغذیه بر اساس جدول غذادهی میگو، روزانه بین ۱۵-۱۰ گرم بر اساس هر ۱۰۰ عدد پست لارو بود. این میزان با توجه به رشد میگو به ۲۰-۱۵ گرم بر اساس هر ۱۰۰ عدد پست لارو افزایش یافت. فراورده پروبیوتیک تولید شده توسط پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان بر اساس دستورالعمل تولید کننده جهت تغذیه میگو در تیمار ۱ مورد استفاده قرار گرفت. این محصول تجاری سازی شده حاوی  $1.8 \times 10^8$  CFU/kg پروبیوتیک آغشته شده به خوراک میگو بود. برای اجرای تیمار ۲ از محصول پروبیوتیک مایع استفاده شد. این فراورده حاوی  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL پروبیوتیک بود که بر اساس دستورالعمل تولید کننده غلظت نهایی آن جهت استفاده به  $1.8 \times 10^8$  CFU/L در آب مخزن پرورش رسانده شد. فراورده پروبیوتیک میگو حاوی پروبیوتیک تا یک هفته قبل از نمونه برداری ۴ نوبت به بصورت روزانه تجویز شد. در پایان دوره آزمایش از هر تیمار ۹ عدد میگو به صورت تصادفی جهت آزمون انتخاب شد. پس از ضدعفونی کردن سطح بدن میگوها و شستشو با آب مقطر، به منظور خارج کردن روده میگو کالبد شکافی شده و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر استریل رقیق سازی انجام شد. نمونه های آماده شده روی محیط کشت Zobel agar تلقیح و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرما گذاری شدند. سپس کلونی های باکتریایی رشد یافته پس از خالص سازی بر اساس ویژگی های مورفولوژیک و فیزیولوژیک بصورت اولیه شناسایی شدند (Davis, 2014). این آزمون های اولیه شامل ویژگی های مورفولوژیک ماکروسکوپی (رنگ، شکل، اندازه کلونی ها) و میکروسکوپی (واکنش گرم و شکل باکتری و وضعیت اسپور)، ویژگی های شاخص بیوشیمیایی از قبیل مصرف برخی منابع کربن و نیتروژن، تولید آنزیم های تشخیصی و همچنین ویژگی های فیزیولوژیک از قبیل رشد در شرایط دماها، pHها و شوری های مختلف شناسایی اولیه انجام شد. بعد از تعیین باکتری های متمایز به منظور شناسایی ژنتیکی آنها استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناکلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. تکثیر ژن 16S rRNA در مورد باکتری ها با استفاده از واکنش PCR انجام شد (Woo et al., 2007; Paz et al., 2003). پس از اتمام PCR، فرایند RFLP روی توالی تکثیر شده با استفاده از آنزیم های محدودکننده TaqI و MspI انجام شد. بدین منظور ۳ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر بافر ۱۰X Tango، ۱ میکرولیتر سرم گاوی (BSA) A و ۵ واحد آنزیم MspI مخلوط شد. سپس نمونه تیمار شده با آنزیم TaqI در ۶۵ درجه سلسیوس درون ترمومیکسر به مدت ۳ ساعت گرما گذاری شد. نمونه تیمار شده با آنزیم MspI در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت قرار داده شد (Jiang et al., 2008). بدنبال آن نمونه های تیمار شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. پس از انجام الکتروفورز الگوی تنوع زیستی باکتری های جدا شده تعیین گردید و الگوی های متفاوت برشی جهت تعیین توالی به شرکت سیناکلون ارسال شد. میزان تشابه جدایه های تعیین توالی شده با استفاده از نرم افزار Megablast ارائه شده در پایگاه ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) انجام شد.

## نتایج

### تأثیر تجویز پروبیوتیک بر فراوانی باکتری ها در روده میگو

نتایج شمارش باکتری های قابل کشت در روده میگو بیانگر تفاوت معنادار فراوانی باکتری ها در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق جیره غذایی، آب و نمونه شاهد بود. این نتایج نشان داد بیشترین فراوانی باکتری های قابل کشت در روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق غذا با میانگین  $1.7 \times 10^7$  CFU/gr  $4/2$  ثبت شد. میزان فراوانی باکتری های قابل کشت در روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق آب به میزان  $1.06 \times 10^6$  CFU/gr  $6/16$  بود. در حالی که در تیمار شاهد بدون تجویز پروبیوتیک این میزان  $1.06 \times 10^6$  CFU/gr  $7/56$  شمارش شد (شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی تاثیر نحوه تجویز پروبیوتیک بر تعداد کل باکتری‌های قابل کشت در روده میگو. نمونه شاهد: بدون تجویز پروبیوتیک

### شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک

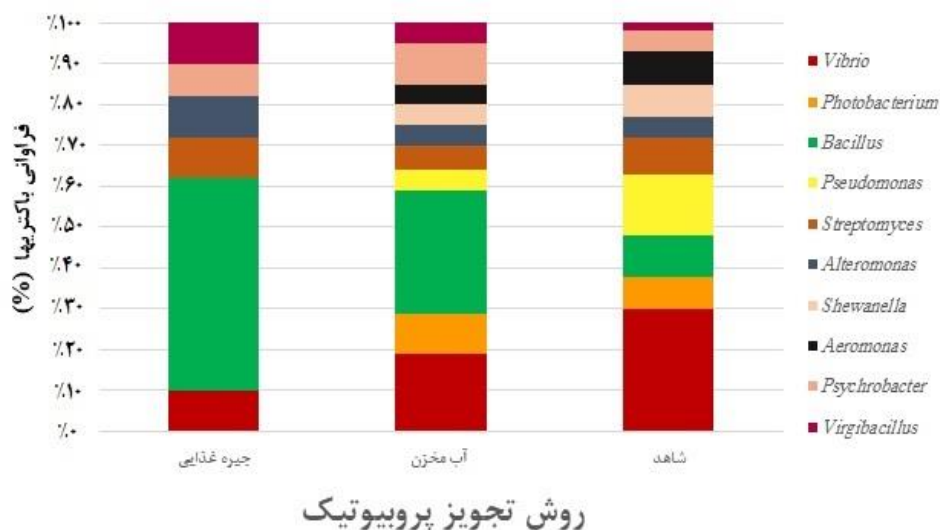
شناسایی فنوتیپی ۲۲۵ کلونی باکتری جداسازی شده از روده میگو بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نشان داد ۵۰ جدایه دارای ویژگی‌های فنوتیپی متفاوت بودند. از این میان ۳۴ جدایه دارای خصوصیات مشترک با جنس‌های *Vibrio*، *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Alteromonas* بودند. همچنین ویژگی‌های فنوتیپی ۱۶ جدایه قابل انتساب به جنس‌های مذکور نبود (جدول ۱).

جدول ۱. ویژگی‌های فنوتیپی جنس‌های غالب شناسایی شده

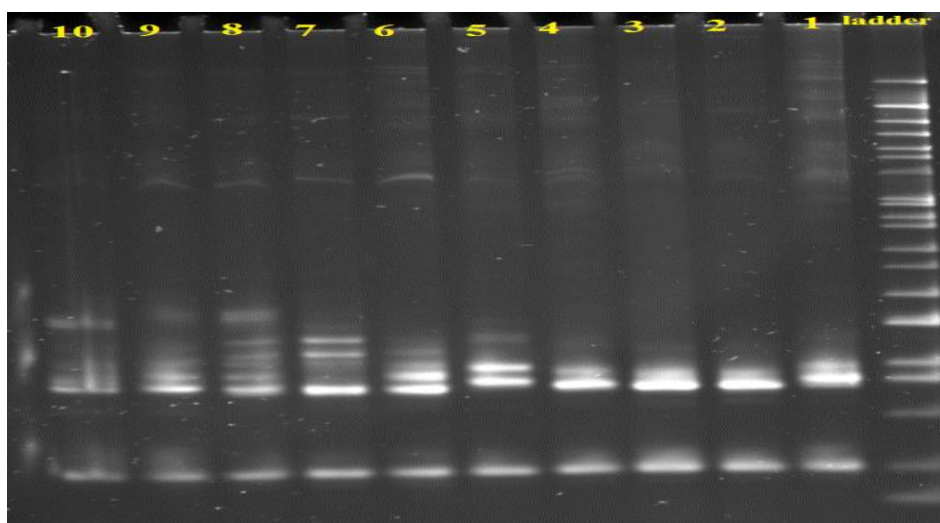
مشخصه	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Alteromonas</i>	<i>Vibrio</i>
واکنش گرم	+	-	-	-
شکل میکروسکوپی	میله ای	میله ای	میله ای	میله ای، خمیده
رنگ کلونی	سفید	سفید	سفید	سفید
اسپور	+	-	-	-
حرکت	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
اکسیداسیون تخمیر	+/-	+/+	+/-	+/+
کاتالاز	+	+	+	+
ایندول	-	-	-	+
سولفید هیدروژن	+	-	-	-
احیا نیترات	+	+	+	-
وژ-پروسکوئر	+	-	-	-
ژلاتین	+	-	-	+
سیترات	-	+	+	+
آرژنینن دهیدرولاز	-	-	-	+
اورنیتین دکربوکسیلاز	-	-	-	-
لیزین دکربوکسیلاز	-	-	-	-
رنگدانه	-	-	-	-
دمای رشد (°C)	۱۵-۴۵	۴-۴۵	۱۰-۴۴	۱۰-۴۴
تحمل شوری (ppt)	۰-۱۲	۰-۸	۱-۱۰	۱-۱۰
محدوده pH	۵-۱۰	۵-۹	۵-۱۰	۵-۹

### الگوی تنوع زیستی باکتری‌های روده میگو

الگوی تنوع زیستی باکتری‌های جداسازی شده از روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک بیانگر تعلق آنها به ۶ جنس مختلف بود (شکل ۲). در حالی که این الگوی حاصل از PCR-RFLP نشان داد باکتری‌های موجود در روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق آب و نمونه‌های شاهد به ۱۰ جنس متفاوت تعلق داشتند (شکل ۳). بیشترین فراوانی باکتری‌ها در روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق غذا به جنس *Bacillus* به میزان ۵۲ درصد تعلق داشت در حالی که در میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق آب فراوانی جنس *Bacillus* در نمونه‌های روده ۳۰ درصد ثبت شد. در حالی که تنها ۱۰ درصد باکتری‌های جداسازی شده از روده میگوهای تیمار شاهد حاوی جنس *Bacillus* بود.



شکل ۲. الگوی تنوع زیستی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های روده میگو در تیمارهای مختلف



شکل ۳. شناسایی سویه‌های جداسازی شده از روده میگو با استفاده از تکنیک RFLP. الگوهای برشی متفاوت با شماره‌های مختلف نشان داده شده است.

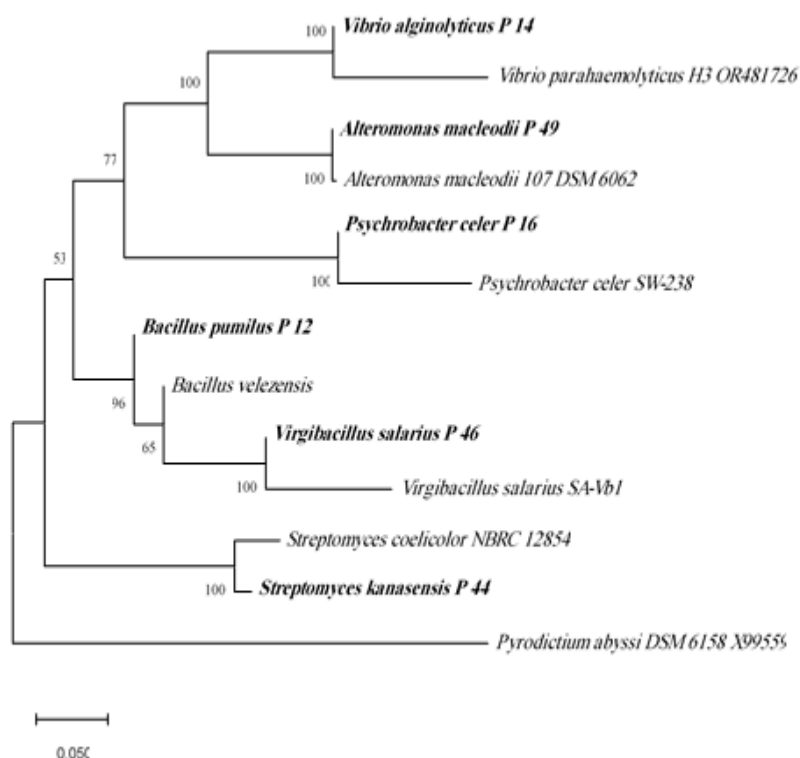
### مطالعات فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از روده میگو

نتایج مطالعات فیلوژنتیک جدایه‌های متعلق به ۶ جنس متمایز جدا شده از روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک نشان داد توالی 16S rRNA آنها با سویه‌های ثبت شده در بانک ژن NCBI به میزان ۹۸ تا ۹۹ درصد تشابه داشتند (جدول ۲). توپولوژی درخت فیلوژنتیک ترسیم شده نشان داد این درخت در بر گیرنده ۲ کلاد مختلف با الگوی خوشه‌زایی متفاوت بود. کلاد نخست در بر گیرنده ۲ خوشه اصلی که در خوشه نخست جنس‌های *Vibrio*، *Alteromonas* و *Psychrobacter* در یک زیر خوشه و *Bacillus* و *Virgibacillus* در زیر خوشه دوم بود. این الگوی خوشه‌زایی نشان داد جدایه‌های P 14 و P 16 در مقایسه با نزدیکترین سویه

ثبت شده مسیر تکاملی متفاوتی را متحمل شده‌اند. در حالیکه جدایه P 49 با نزدیکترین سویه خود از یک خط تکاملی مشترک اشتقاق یافتند. در زیر خوشه دوم نیز جدایه های *Bacillus* و *Virgibacillus* علی‌رغم اشتقاق از یک منشأ واحد دارای الگوی شاخه زایی متفاوت بودند. این الگو بیانگر اشتقاق گونه های *Virgibacillus* جداسازی شده بعد از سویه های *Bacillus* بود. در کلاد دوم سویه P 44 با سویه ثبت شده *Streptomyces coelicolor* در یک خوشه قرار گرفت و از یک جد مشترک اشتقاق یافتند.

جدول ۲. مقایسه میزان تشابه توالی ژن 16S rRNA جدایه های متمایز با نزدیک ترین سویه ها در NCBI

میزان تشابه (%)	نزدیکترین سویه ثبت شده در NCBI	نام جدایه
۹۹/۸۱	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> H3	<i>Vibrio alginolyticus</i> P 14
۹۹/۷۵	<i>Alteromonas macleodii</i> 107 DSM 6062	<i>Alteromonas macleodii</i> P 49
۹۹/۴۷	<i>Psychrobacter celer</i> SW-238	<i>Psychrobacter celer</i> P 16
۹۸/۸۸	<i>Bacillus pumilus</i> strain ATCC 7061	<i>Bacillus pumilus</i> P 12
۹۹/۶۵	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1	<i>Virgibacillus salarius</i> P 46
۹۹/۲۵	<i>Streptomyces coelicolor</i> NBRC 12854	<i>Streptomyces kanasensis</i> P 44



شکل ۴. درخت فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از روده میگو بعد از تغذیه با پروبیوتیک. اعداد نشان داده شده در کنار گره ها بیانگر میزان Bootstrap است. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۱۰۰ نوکلئوتید می باشد. *Pyrodictium abyssi* DSM 6158 به عنوان Out group در نظر گرفته شد.

## بحث

درک اثر بخشی فراورده‌های پروبیوتیک بر فیزیولوژی میزبان مستلزم ارزیابی تاثیرات آن بر میکروبیوم روده می باشد (Ringø *et al.*, 2022). فراورده‌های پروبیوتیک بهینه با بکارگیری مجموعه‌ای از راهبردها از قبیل تولید متابولیت‌های ثانویه، رقابت برای جذب مواد غذایی، اتصال به گیرنده‌های سلولی میکروبیوم روده میزبان را تعدیل می نمایند (Cheng *et al.*, 2023; Hembrom *et al.*, 2024). تغییرات الگوی تنوع زیستی در روده میزبان پس از تجویز پروبیوتیک به عنوان یکی از شاخص‌های ارزیابی اثر بخشی پروبیوتیک در مطالعه حاضر مورد مطالعه قرار گرفت. بحث در ارتباط با ثبات میکروبیوم روده میگو از جنبه‌های پیچیده‌ای برخوردار است. سطح گسترده روده جانوران سدی است که در برابر التهاب و عفونت عوامل بیماریزا حفاظت ایجاد می‌کند. این حفاظت فیزیکی با عواملی مانند یکپارچگی ساختاری، پروتئین‌های ایمنی و یک میکروبیوم پایدار مرتبط است (Duan *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد فراوانی کل باکتری‌های قابل کشت در روده میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک از طریق غذا بطور معناداری از فراوانی این باکتری‌ها در نمونه‌های دریافت کننده پروبیوتیک از طریق آب بیشتر بود. این فراوانی در نمونه‌های کنترل از نمونه‌های دریافت کننده پروبیوتیک کمتر ثبت شد. این افزایش فراوانی را می‌توان با دریافت روزانه فراورده پروبیوتیک مرتبط دانست. از آنجا که نمونه‌های موجود در تیمار کنترل بدون دریافت باکتری به سیستم پرورش نگهداری شدند کاهش بار میکروبی قابل انتظار بود.

ارزیابی الگوی تنوع زیستی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های میگو در تیمارهای مختلف بیانگر تغییر به سمت غالبیت گونه‌های *Bacillus* در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک بود. بطوریکه غالبیت گونه‌های *Bacillus* منجر به کاهش ۲۰ درصدی گونه‌های متعلق به جنس *Vibrio* و حذف گونه‌های متعلق به جنس‌های *Aeromonas*، *Pseudomonas*، *Shewanella* و *Photobacterium* در نمونه‌های دریافت کننده پروبیوتیک از طریق غذا گردید. با توجه به توانایی باکتری‌های فیرمیکوت در پیشگیری از تولید سیتوکین‌های التهابی و جلوگیری از اختلال عملکرد روده ناشی از فعالیت باکتری‌های بیماریزا به عنوان شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت روده میگو محسوب می‌شوند (Duan *et al.*, 2019). در مطالعه دیگری نیز فراوانی برخی از باکتری‌های دریایی و بومی در میگوهای در معرض پروبیوتیک کاهش یافت. برای نمونه در یک مطالعه نسبت *Rhodospirellula baltica* که یک باکتری هتروتروف هوازی دریایی است کاهش یافت. این باکتری معمولاً در مزارع آبی-پروری و محیط‌های دریایی شناسایی و در چرخه نیتروژن و تجزیه زیستی مواد آلی نقش داشت در مقابل، *Rhodobacter capsulatus*، که دارای طیف وسیعی از قابلیت‌های متابولیک و برخی فعالیت‌های ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی افزایش یافت (Lage *et al.*, 2012).

نتایج مطالعه دیگری نشان داد ترکیب *Bacillus* و پروبیوتیک *Alibio* ضمن تعدیل میکروبیوم تنوع جوامع میکروبی روده را کاهش داد. همچنین بر سلامت میزبان تأثیر گذاشت. بیشترین میزان بقا در برابر چالش *Vibrio parahaemolyticus* با میگوهای تیمار شده با مخلوط *Bacillus* ۳۳ درصد و پس از آن *Alibio* ۲۱ درصد رخ داد. گروه کنترل مقاومت کمی در برابر چالش داشتند (۹ درصد). این نتایج ارزیابی الگوی تنوع زیستی در مطالعه آنها نشان داد ترکیب میکروبیوتای روده میگوهای تیمار شده با مخلوط *Bacillus* کاملاً متفاوت از گروه شاهد بود است. افزودن مخلوط *Bacillus* به طور قابل توجهی باعث کاهش تنوع و غنای گونه‌ها و افزایش شباهت انواع گونه‌های میکروبی شد (Luis *et al.*, 2013).

نتایج مطالعه دیگری در همین زمینه نشان داد باکتری *Clostridium butyricum* تعادل میکرواکولوژیک روده آبی را تنظیم کرد (Nakanishi et al., 2003). نتایج این مطالعه نشان داد رژیم غذایی حاوی *C. butyricum* ترکیب میکروبی روده میگو را تغییر داد و متابولیسم هوازی باکتری‌های قابل کشت، به ویژه متابولیسم منبع کربن، از جمله کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و پلیمرها را بهبود بخشید. پس از ۵۶ روز مصرف غذای مکمل شده با *C. butyricum*، گونه‌های باکتریایی غالب روده میگو متعلق به شاخه‌های Proteobacteria و Bacteroidetes بودند (Huang et al., 2016). علاوه بر این فراوانی Firmicutes در سه گروه دریافت‌کننده *C. butyricum* غالب بود. نتایج مطالعه مذکور نشان داد رژیم غذایی حاوی *C. butyricum* باعث تحریک رشد باکتری‌های مفید در روده میگوی *P. vannamei* گردید.

نتایج مطالعه دیگری نشان داد رژیم غذایی حاوی *C. butyricum* خطر بیمارگرهای فرصت طلب بویژه تعداد *Vibrio* که به طور معمول در روده میگو غالب است را برای حمله به ایمنی میزبان کاهش داد (Rungrassamee et al., 2014). در مطالعه حاضر نیز میزان فراوانی *Vibrio* در نمونه دریافت‌کننده پروبیوتیک از طریق غذا کاهش قابل ملاحظه‌ای یافت (شکل ۲). از دیگر دلایل احتمالی تاثیر فرآورده پروبیوتیک بومی بر تنوع میکروبی روده میگو در مطالع حاضر تولید انواع مختلفی از آنزیم‌های گوارشی و تاثیر آن‌ها بر بهبود عملکرد گوارشی میگو باشد (Ziaei-Nejad et al., 2006; Zokaeifar et al., 2016; Miandare et al., 2012). همچنین بیوسنتز اسیدهای چرب توسط باکتریهای پروبیوتیک‌ها که موجب افزایش ظرفیت گوارشی روده میزبان می‌شود می‌تواند با فراهم کردن منبع انرژی تنوع میکروبیوم روده را تغییر دهد (Laplante and Sabatini, 2009).

## نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که فرآورده پروبیوتیک بومی مورد آزمون تاثیر معناداری بر فراوانی و تنوع میکروبیوم روده *P. vannamei* نشان داد. نتایج حاضر بیانگر تثبیت گونه‌های مفید با فراوانی بالا و کاهش یا حذف باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب بود. همچنین دریافت پروبیوتیک از طریق غذا کارایی بالاتری نسبت به تجویز پروبیوتیک از طریق آب نشان داد. این مطالعه موجب درک بهتر تاثیر فرآورده‌های پروبیوتیک بر ترکیب و پویایی میکروبیوتای روده میگو گردید.

## References:

- Cheng, A.C., Ballantyne, R., Chiu, S.T. and Liu, C.H., 2023. Microencapsulation of Bacillus subtilis E20 Probiotic, a Promising Approach for the Enrichment of Intestinal Microbiome in White Shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fishes*, 8(5), p.264. DOI: 10.3390/fishes8050264.
- Davis, C., 2014. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of microbiological methods*, 103, pp.9-17. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.04.012.
- Dawood, M.A., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M. and Shahin, M.G., 2020. Symbiotic effects of Aspergillus oryzae and  $\beta$ -glucan on growth and oxidative and immune responses of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, pp.172-183. DOI: 10.1007/s12602-018-9513-9.
- Duan, Y., Wang, Y., Liu, Q., Dong, H., Li, H., Xiong, D. and Zhang, J., 2019. Changes in the intestine microbial, digestion and immunity of Litopenaeus vannamei in response to dietary resistant starch. *Scientific reports*, 9(1), p.6464. DOI: 10.1038/s41598-019-42939-8.
- Duan, Y., Zhang, Y., Dong, H., Wang, Y., Zheng, X. and Zhang, J., 2017. Effect of dietary Clostridium butyricum on growth, intestine health status and resistance to ammonia stress in Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei. *Fish & shellfish immunology*, 65, pp.25-33. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.03.048.

- Food and Agriculture Organization (FAO). 2019. Fisheries and Aquaculture Software. FishStatJ-Software for Fishery Statistical Time Series. In FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Rome. Available online: <http://www.fao.org/Fishery/statistics/software/fishstatj/en> (accessed on 20 February 2019).
- Hembrom, P.S., Barik, S., Deepthi, M., Kanno, S. and Grace, T., 2024. Influence of gut microbiome on health and development of penaeid shrimps. *Aquatic Sciences*, 86(1), p.4. DOI:10.1007/s00027-023-01018-x.
- Huang, Z., Li, X., Wang, L. and Shao, Z., 2016. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47(6), pp.1737-1746. DOI: 10.1111/are.12628.
- Jiang, S., Li, X., Zhang, L., Sun, W., Dai, S., Xie, L., Liu, Y. and Lee, K.J., 2008. Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Marine Biology*, 153, pp.945-952. DOI: 10.1007/s00227-007-0866-y.
- Lage, O.M., Bondoso, J. and Viana, F., 2012. Isolation and characterization of Planctomycetes from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank. *Archives of microbiology*, 194, pp.879-885. DOI: 10.1007/s00203-012-0821-2.
- Laplante, M. and Sabatini, D.M., 2009. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Current biology*, 19(22), pp.R1046-R1052. DOI: 10.1016/j.cub.2009.09.058.
- Luis-Villasenor, I.E., Castellanos-Cervantes, T., Gomez-Gil, B., Carrillo-García, Á.E., Campa-Córdova, A.I. and Ascencio, F., 2013. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, pp.257-265. DOI: 10.1007/s11274-012-1177-0.
- Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga, H., Kono, T., Itami, T. and Sakai, M., 2014. Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Marine biotechnology*, 16, pp.181-192. DOI: 10.1007/s10126-013-9532-1.
- Miandare, H.K., Yarahmadi, P. and Abbasian, M., 2016. Immune related transcriptional responses and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac®. *Fish & Shellfish Immunology*, 55, pp.671-678. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.06.053.
- Nakanishi, S., Kataoka, K., Kuwahara, T. and Ohnishi, Y., 2003. Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiology and immunology*, 47(12), pp.951-958. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03469.x.
- Paz, Z., Burdman, S., Gerson, U. and Szejnberg, A., 2007. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta olivera*. *Journal of applied microbiology*, 103(6), pp.2570-2579. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03512.x.
- Ringø, E., Harikrishnan, R., Soltani, M. and Ghosh, K., 2022. The effect of gut microbiota and probiotics on metabolism in fish and shrimp. *Animals*, 12(21), p.3016. DOI: 10.3390/ani12213016.
- Rungrasamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P. and Karoonuthaisiri, N., 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PloS one*, 9(3), p.e91853. DOI: 10.1371/journal.pone.0091853.
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W.J., Lee, S. and Bai, S.C., 2020. Evaluation of potential probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on growth performance, immune response, gut histology and immune-related genes in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 8(2), p.281. DOI: 10.3390/microorganisms8020281.
- Woo, P.C., Ng, K.H., Lau, S.K., Yip, K.T., Fung, A.M., Leung, K.W., Tam, D.M., Que, T.L. and Yuen, K.Y., 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), pp.1996-2001. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1996-2001.2003.
- Zhang, M., Liang, H., Lei, Y., Zhang, Y., Tan, Z., Chen, W., Li, S., Peng, X. and Tran, N.T., 2023. *Aspergillus niger* confers health benefits and modulates the gut microbiota of juvenile Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) under farming conditions. *Frontiers in Marine Science*, 10, p.1211993. DOI:10.3389/fmars.2023.1211993.

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), pp.516-524. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.021.

Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A. and Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 33(4), pp.683-689. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.05.027.