مجله بوم‌شناسی آبزیان

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

جداسازی و بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری (*Kucoria turfanensis*) خالص‌سازی شده از کیتون (*Chiton lamayi*) در مقابل برخی از پاتوژن‌های انسانی و دریایی

جاسم رئیسی[۱]، آرش شکوری[۱*]، حسن زاد عباس شاه آیادی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران

[۲] گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۸/۱۱/۰۴
اصلاح: ۹۹/۰۴/۰۶
پذیرش: ۹۹/۰۶/۱۷

کلمات کلیدی:
آنتاگونیستی
باکتری
کیتون
متابولیت ثانویه

چکیده

برخی باکتری‌ها به دلیل رقابت بر سر فضا و دسترسی بیشتر به مواد مغذی، برای جلوگیری از چسبیدن دیگر باکتری‌ها و سایر موجودات لایه بسیار نازکی تشکیل می‌دهند و بدین‌صورت باعث تولید متابولیت‌های ثانویه و توسعه دفاع شیمیایی می‌شوند؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری *Kucoria turfanensis* (CH6) جداسازی شده از کیتون *Chiton lamayi* بر روی عوامل بیماری‌زای انسانی و دریایی شامل سویه‌های *Staphylococcus aureus* (ATCC29213)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTTC1430)، *Escherichia coli* (PTCC 1399)، *Vibrio cholorea* (PTCC1611) و *Vibrio harveyi* (PTTC1755) انجام گرفت. نمونه‌های کیتون از منطقه بین جزر و مدی جهت خالص‌سازی باکتری سطحی به آزمایشگاه منتقل شدند. باکتری (CH6) با روش رقیق‌سازی و کشت خطی چهار مرحله‌ای، خالص‌سازی و شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی گردید. جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی از روش کراس استریک استفاده گردید. بیشترین تأثیر بازدارندگی آنتاگونیستی *K. turfanensis* بر روی پاتوژن *V. harveyi* به اندازه ۳/ ۱۲ میلی‌متر بوده است. با توجه به نتایج، باکتری‌های هر محیط نسبت به پاتوژن‌های رایج آن محیط، خاصیت آنتاگونیستی اختصاصی پیدا نموده‌اند.

مقدمــه

محیط‌های دریایی پیچیدگی خیلی زیادی داشته و شامل تنوع بزرگی از اشکال زندگی می‌باشند و به دلیل تولید ترکیبات بیولوژیکی فعال مورد توجه هستند (Pabba *et al.*, 2017). سواحل صخره‌ای دارای تنوع زیستی زیاد به همراه ماکرو ارگانیسم‌های گیاهی و جانوری هستند. جمعیت زیاد، تنوع توپوگرافی و غنای گونه‌ای بالا، توجه زیست‌شناسان و بوم شناسان را به خود جلب کرده است (*Savari et al.*, 2010). کیتون نرم تنی از شاخه‌ی بسپار صدفیان[۱] است و جنس و گونه *Chiton lamayi* که به فراوانی روی صخره‌های ساحلی یافت می‌شود. کلنی بی‌مهرگان دریایی از اعماق اقیانوس تا نواحی ساحلی وجود دارد (AnithaJothi *et al.*, 2013) میکروارگانیسم‌های دریایی ترکیبات فعال زیستی با خاصیت آنتاگونیستی، آنتی فولینگ، سیتوتوکسیک و ضد انعقاد خون تولید می‌کنند و به این ترتیب دارای ترکیباتی با

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: aarash220@yahoo.com

[1] Mollusca

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

فعالیت زیستی زیاد می‌باشند (Sugathan *et al.*, 2012; Emmanuel *et al.*, 2011). با توجه به ترکیبات جدیدی که از باکتری‌های خالص‌سازی شده از بی‌مهرگان دریایی استخراج شده است، اهمیت زیستی رابطه بین بی‌مهرگان دریا و باکتری‌ها شناخته شده است (AnithaJothi *et al.*, 2013). میکروب‌ها متنوع‌ترین و غالب‌ترین گروه بر روی زمین هستند. آن‌ها دارای کاربردهای متنوع صنعتی، کشاورزی، محیطی و دارویی مانند تولید آنزیم‌ها و ضد انگلی می‌باشند. همچنین از آن‌ها در فرآوری محصولات غذایی، کمک به رشد گیاهی، از بین بردن آلودگی نفتی و تولید سوخت و انرژی استفاده می‌شود (Dionisi *et al.*, 2012). عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر داروهای شیمیایی موجب طولانی شدن دوره بیماری شده و خطر مرگ را به دنبال دارد. از این رو محققان زیستی روی منابع طبیعی جهت تولید داروهای جدید برای درمان بیماری‌های عفونی حاد و مزمن تمرکز کرده‌اند (Krishnakumar and Dooslin Mercy Bai, 2014).

باکتری‌های سطحی گیاهان و جانوران دریایی بر سر دسترسی به فضا و غذا رقابت می‌کنند. آن‌ها جهت جلوگیری از چسبیدن سایر موجودات مانند لارو بی‌مهرگان و باکتری‌های دیگر، ترکیبات ثانویه سنتز می‌نمایند (Mearns-Spragg *et al.*, 1998). در مطالعه حاضر به بررسی خاصیت آنتاگونیستی و شناسایی باکتری خالص‌سازی شده از کیتون در سواحل صخره‌ای پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های کیتون در زمان جزر از منطقه دریا بزرگ واقع در شرق خلیج چابهار (شکل ۱) با موقعیت جغرافیایی N ″37 ′16 °25 و E ″49 ′39 °60 انجام گرفت. نمونه‌ها در پلاستیک استریل قرار گرفته و توسط یخدان در کمترین زمان ممکن جهت خالص‌سازی باکتری به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شد تا عملیات مربوط به خالص‌سازی انجام گیرد.

خالص‌سازی

جهت از بین بردن باکتری‌های آزاد، کیتون‌ها سه بار با آب استریل دریا شسته شدند (Burgess *et al.*, 2003). پس از کشیدن سواپ استریل به سطح پشتی و شکمی کیتون، سواپ داخل لوله حاوی ۲ سی‌سی آب استریل دریا قرارگرفت؛ سپس ۵ رقت متوالی 10^{-1} تا 10^{-5} از آن تهیه و از هر رقت ۱۰ میکرولیتر روی محیط کشت Zobell Marine Agar (محصول شرکت بیولب، هند) گسترش داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، کلنی‌های باکتری مشاهده شد. جهت خالص‌سازی باکتری از روش کشت خطی چهار مرحله‌ای استفاده شد. باکتری خالص‌سازی شده در لوله اسلانت زوبل مارین آگار جهت مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Zheng *et al.*, 2005).

شکل ۱. موقعیت ایستگاه نمونه‌برداری

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

شناسایی

مراحل شناسایی بیوشیمیایی باکتری خالص‌سازی شده شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، تخمیر Manitol، رنگ کلنی و حساسیت به آنتی‌بیوتیک Novobiocine با استفاده از راهنمای باکتریولوژی Bergeyi انجام شد (Snesth *et al.*, 1986).

شناسایی مولکولی

DNA توسط کیت استخراج DNA ژنومیک از باکتری‌های گرم مثبت (پیشگامان انتقال ژن، ایران) استخراج و در ۳۰ میکرولیتر بافر elution حل شد. کیفیت و غلظت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از بافر TBE[1] که با رنگ RedSafeTM (iNtRON، کره) رنگ‌آمیزی ژل شده بود، مورد بررسی قرار گرفت.

از DNA استخراج شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و تعیین توالی استفاده شد. آغازگرهای عمومی باکتریایی شامل آغازگر پیشرو ۲۷F با توالی (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') و آغازگر پسرو با نام R ۱۵۲۵ با توالی (5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3') (Lane, 1991) برای تکثیر ناحیه ۱۶S rDNA مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X (BIORON, Germany)، ۱/۲۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار (BIORON, Germany)، یک میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار (GeneAll، کره)، یک میکرولیتر از هر آغازگر ۱۰ پیکومولار (پیشگام، ایران) و آنزیم TaqDNA پلی مراز (۵ واحد/ میکرولیتر) و حدود ۱۵ نانوگرم از محصول استخراج؛ انجام گرفت.

برنامه دستگاه PCR جهت تکثیر ناحیه ۱۶S rDNA بر اساس چرخه‌های زیر انجام شد: یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گرادی به مدت ۴ دقیقه و ۳۸ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۶٫۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک چرخه نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گرادی به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR از طریق ژل آگارز ۱٪ مشاهده و محصولات PCR تعیین توالی گردیدند. توالی ژن rDNA ۱۶S به دست آمده متشکل از ۱۳۵۴ جفت باز برای *Kocuria turfanensis* سویه CHZ-31-Chl در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) ثبت و با گونه‌های دیگر مقایسه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار CLUSTALX (Larkin *et al.*, 2007) هم تراز گردیدند و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک با بهره گیری از نرم افزار MEGA6 صورت گرفت (Tamura *et al.*, 2013). درخت فیلوژنی به روش ML با آنالیز بوت استرپ ۱۰۰۰ بار تکرار و با استفاده از سویه *Bucillus subtilis* به‌عنوان نماینده خارج گروهی ترسیم گردید.

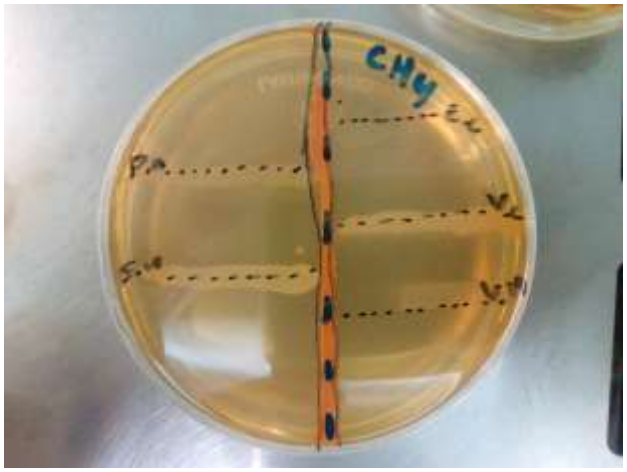
روش کراس استریک

خاصیت آنتاگونیستی علیه سویه‌های (نشانگر) شامل: *S. aureus* (ATCC29213)، *P.aeruginosa* (PTTC1430)، *E.coli* (PTCC 1399)، *V.chlorea* (PTCC1611) و *V.harveyi* (PTTC1755) به روش cross streak انجام گرفت؛ بدین‌صورت که باکتری خالص‌سازی شده (CH6) به‌صورت خطی در وسط پلیت ۸ سانتی‌متری حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز قرار گرفت؛ در ادامه باکتری‌های پاتوژنی که قبلاً کشت داده شده بودند، به صورت عمود بر خط باکتری خالص‌سازی شده بدون هیچ‌گونه تماسی با خط باکتری با استفاده از لوپ کشت داده شدند (شکل ۲) و خاصیت آنتاگونیستی بر اساس واکنش‌های

[1] Tris-borate-EDTA

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]



شکل ۲. نمونه‌ای از تست انجام‌شده به روش کراس استریک. خط وسط باکتری جداسازی شده **(CH6)** و پنج‌خط عمود بر خط وسط، باکتری‌های نشانگر می‌باشند.

بازدارنده بین باکتری خالص‌سازی شده و پاتوژن‌ها طی ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه مشاهده و اندازه هاله عدم رشد ثبت گردید. این آزمایش با سه تکرار انجام شد و به عنوان شاهد مثبت یک پلیت نیز بدون باکتری خالص‌سازی شده در نظر گرفته شد (Balouiri *et al.*, 2016).

نتایــج

خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی باکتری جداسازی شده

خصوصیات مورفولوژی و تست‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی باکتری سطحی کیتون (CH6) به عنوان گونه ***k.turfanensis*** شناسایی شد.

خاصیت آنتاگونیستی

بررسی خاصیت آنتاگونیستی*K. turfanensis* علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری‌های گرم منفی *P. aeruginosa*، *E. coli*، *V. chlorea* و *V. harveyi* نشان می‌دهد که باکتری مذکور روی *P. aeruginosa* ۱/۸ میلی‌متر هاله بازدارندگی رشد کمترین تأثیر و علیه باکتری *V. harveyi* با مقدار ۱۲,۳ میلی‌متر هاله بازدارندگی رشد بیشترین تأثیر را داشت و نسبت به بقیه باکتری‌های بیماری‌زا دارای اختلاف معنی‌داری بود. جزئیات مربوط به نتایج تست کراس استریک در جدول ۲ آمده است.

شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی با استفاده از توالی‌های ناحیه 16S rDNA و با به‌کارگیری روش ML با مدل GTR+G+I انجام گردید و با توجه به آنالیز و ترسیم درخت فیلوژنی شکل ۳ ، باکتری همزیست خالص‌سازی شده تحت عنوان *Kocuria turfanensis* شناسایی و با شماره ژن بانک MH604584 در پایگاه داده NCBI ثبت گردید.

جدول ۱. خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی باکتری خالص‌سازی شده

نوع تست	اندازه کلنی بعد از ۲۴ ساعت	رنگ کلنی	برجستگی	رنگ‌آمیزی گرم	کاتالاز	تخمیر قند مانیتول	رنگدانه زرد رنگ	حساسیت به نووبیوسین	ایندول	اکسیداز
خصوصیت	۱ میلی‌متر	نارنجی	دارد	کوکسی مثبت	مثبت قوی	منفی	ندارد	حساس	منفی	مثبت

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

شکل ۳. درخت فیلوژنی گونه مورد مطالعه

جدول ۲. نتایج تست cross streak (میانگین±sd)

باکتری‌های بیماری‌زا	*E. coli*	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*V. cholorea*	*V. harveyi*
هاله عدم رشد (میلی‌متر)	۲/۸±۰/۸۵	۲/۴±۰/۵۵	۱/۸±۱/۵۶	۲/۴±۰/۲۳	۱۲/۳±۰/۵

بحث

برای کشف مولکول‌های فعال زیستی جدید خصوصاً مواد ضد باکتریایی، تولیدات طبیعی، منبع امیدوارکننده‌ای جهت توسعه داروهای جدید می‌باشند. اکتینومایسیتها میکروب‌های غالب اجتماعات میکروبی دریایی هستند که به خوبی با شرایط محیطی سازش پیدا کرده‌اند (Ballav *et al.*, 2015). خاصیت آنتاگونیستی باکتری-باکتری در محیط‌های دریایی رایج است. باکتری‌ها ممکن است مواد مغذی، ویتامین، پلی ساکارید و اسیدهای چرب لازم را از میزبان دریافت نمایند و از طرف دیگر با تولید برخی از اسیدهای آمینه و آنتی‌بیوتیک و سموم، دفاع شیمیایی میزبان را توسعه دهند (Susilowati *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر *K. turfanensis* از سطح پشتی کیتون جداسازی شد. جنس *Kocuria* برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط Stackebrandt و همکارانش معرفی شد، اعضای این جنس از منابع مختلفی مانند هوا، غذاهای دریایی، پوست پستانداران، آب شیرین، آب دریا، اسفنج و رسوبات دریایی جداسازی شده‌اند (Bala *et al.*, 2012; Goswami *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2011; Ranjan Kumar and Jadeja, 2017). *K. turfanensis* برای اولین بار در منطقه‌ای به نام Turfan در چین معرفی شد (Zhou *et al.*, 2008). *K. turfanensis* شباهت ملکولی نزدیکی با *K. sediminis* دارد (۹۹/۴٪) دارد (Bala *et al.*, 2012). در سال ۲۰۱۵ Ballav و همکارانش *Kocuria* sp. و *K. palustris* از رسوبات مصب گوا واقع در هند جداسازی کردند و اثر آنتی‌بیوتیکی آن‌ها را بر روی پاتوژن *S. aureus* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۶±۰/۶۵ و ۱۴±۱ اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به تأثیر گونه خالص‌سازی شده تحقیق حاضر *K. turfanensis* (۲/۴±۰/۵۵) داشتند (Ballav *et al.*, 2015). همچنین Ranjan Kumar و Jadeja در سال ۲۰۱۷ *Kocuria* sp. را از آب دریا جداسازی کردند، تأثیر بازدارندگی رشد آن بر روی باکتری‌های بیماری‌زای *S. aureus*، *P. aeruginosa* و *E. coli* به ترتیب به اندازه تقریبی ۲۰، ۱۱ و ۱۶ میلی‌متر بود که اختلاف زیادی با نتایج مطالعه حاضر داشت، احتمال می‌رود دلیل این تفاوت‌ها به دلیل متفاوت بودن سویه خالص‌سازی شده و همچنین محیط جداسازی باشد (Ranjan Kumar and Jadeja, 2017).

در سال ۲۰۱۰ Gram و همکارانش اقدام به جمع‌آوری و خالص‌سازی باکتری‌های دارای خاصیت آنتی باکتریایی از سطح آب، نمونه‌های زنده و غیرزنده کردند. بررسی آن‌ها نشان داد که خاصیت آنتاگونیستی این باکتری‌ها در مناطق مختلف اختصاصی نیست. بین استرن‌ها، سودوموناس رنگدانه‌دار و گونه *Ruegeria* spp. بیشترین تأثیر بازدارندگی در

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

برابر *Staphylococcus aureus* را داشتند (Gram *et al.*, 2010) اما در مطالعه حاضر باکتری *K. turfanensis* تأثیر زیادی علیه *Staphylococcus aureus* نداشت (Gram *et al.*, 2010). گونه *Bacillus pumilus* خاصیت آنتاگونیستی بیشتری علیه اشریشیا کلی نسبت به *K. turfanensis* در این مطالعه داشت (Prieto *et al.*, 2012). در تحقیق Krishnakumar and Dooslin Mercy Bai (۲۰۱۴) خاصیت آنتاگونیستی *Pseudomonas maltophilia* علیه ویبریو کلرا، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروجینوسا و استافیلوکوکوس اورئوس بین ۱۰-۵ میلی‌متر بود که با نتایج بررسی حاضر که بین ۲/۸-۱/۸ میلی‌متر بود تفاوت داشت (Krishnakumar and Dooslin Mercy Bai, 2014). خاصیت آنتاگونیست *Pseudomonas tunicate* موردمطالعه *Sivasubramanian* و همکارانش (۲۰۱۱) علیه پاتوژن‌های اشریشیا کلی، سودوموناس آئروجینوسا، استافیلوکوکوس اورئوس و ویبریو کلرا به ترتیب ۴،۵،۷ و ۹ میلی‌متر بود. ولی نتایج تحقیق حاضر به ترتیب ۲/۲،۴/۴،۱/۸،۲/۸ کمتر بودند و ممکن است به دلیل تفاوت در گونه باکتری جداسازی شده باشد (Sivasubramanian and Vijayapriya, 2011). خاصیت آنتاگونیست باکتری‌های مورد مطالعه Chellaram و همکارانش (۲۰۱۲) که از مرجان *Acropora nobilis* خالص‌سازی شده بودند علیه *V. chlorea* و *P. aerogenosa* به اندازه دو تا چهار میلی‌متر و علیه *E. coli* بین دو تا شش میلی‌متر بود که اثر آن در دو باکتری *V. chlorea* و *P. aerogenosa* مشابه و در مورد *E. coli* متفاوت بود (Chellaram *et al.*, 2012). در کل با توجه مطالعات گذشته به نظر می‌رسد که خاصیت آنتاگونیستی یک‌گونه باکتری در مناطق مختلف اختصاصی و یکسان نباشد.

Kocuria همزیست درونی درخت *Combretum latifolium* که توسط Rao و همکارانش در سال ۲۰۱۵ جداسازی شد، علیه *S. aureus*، *P. aeruginosa* و *E. coli* هیچ‌گونه تأثیر آنتاگونیستی نداشتند؛ درحالی‌که با نتایج بررسی حاضر مشابه بود (Rao *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای دیگر که Elbendary و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام دادند *Kocuria rosea* که از رسوبات مناطق مختلف مصر جداسازی کردند خواص آنتاگونیست متفاوتی نشان دادند. به عنوان مثال از گونه مذکور که از رسوب سه ناحیه مختلف خالص‌سازی شده بودند، نتایج مختلفی بر روی *S. aureus* داشتند (۵/۴، ۷/۴ و در سومی بدون تأثیر بود). این نتایج نشان می‌دهد که محیط در تولید متابولیت ثانویه تأثیرگذار بوده و همچنین تفاوت در تأثیر *Kocuria kristinae* در مقایسه با اثر *Kocuria rosea* علیه *S. aureus* نشانگر این است که گونه باکتری نیز از فاکتورهای مهم خواص آنتاگونیستی می‌باشد (Elbendary *et al.*, 2017). Gnanambal و همکارانش در سال ۲۰۰۵ خاصیت آنتاگونیست باکتری‌های مختلف رنگدانهدار و بدون رنگدانه جداسازیشده از دو مرجان *Subergorgia suberosa* و *Juncella juncea* علیه ۸ پاتوژن انسانی و ۷ پاتوژن ماهی را بررسی کردند. فقط ۱۳٪ از باکتری‌های خالص‌سازی شده خاصیت آنتاگونیستی داشتند. اندازه هاله‌ها در *E. coli* و *S. auerus* در برخی از گونه‌های خالص‌سازی شده کمتر و برخی مشابه و در برخی دیگر بیشتر بود. اندازه هاله در *V.harveyi* بین دو تا چهار میلی‌متر بود. این در حالی است که در پژوهش حاضر تأثیر *K. turfanensis* ۱۲,۳ میلی‌متر بود. به نظر می‌رسد گونه مطالعه جداسازی شده در مطالعه حاضر علیه *V. harveyi* که یک پاتوژن دریایی است دارای خاصیت آنتاگونیست بهتری است و در محیط توانایی تولید ترکیبات زیست فعال دارد (Gnanambal *et al.*, 2005).

در سال ۲۰۰۳ Vaseeharan و Ramasamy جهت کنترل زیستی بیماری ویبریوزیس در استخر پرورش میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) باکتری *Bacillus subtilis* را از استخرهای پرورشی خالص سازی نموده و در مجاورت باکتری بیماریزای *V. harveyi* جداسازی شده از میگوی بیمار *P. monodon* قرار دادند؛ اندازه هاله عدم رشد *V. harveyi* در برابر *Bacillus subtilis* ۷ میلی‌متر بود در حالی که اندازه هاله عدم رشد *V. harveyi* در مطالعه حاضر ۱۲,۳ میلی‌متر بود و نشانگر این است که گونه خالص‌سازی شده در مطالعه حاضر (CH6) از توانایی بیشتری در کنترل زیستی بیماری ویبریوزیس برخوردار می باشد (Vaseeharan and Ramasamy, 2003). در تحقیق Ravi و همکارانش (۲۰۰۷) باکتری *Paenibacillus polymyxa* که از رسوب جداسازی شده بود علیه *V. harveyi* هیچ‌گونه فعالیت آنتاگونیستی نشان نداد. همچنین در مطالعه مشابه‌ای Nakayama و همکارانش در سال ۲۰۰۹ باکتری‌های *Bacillus*

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

subtilis، *Bacillus licheniformis*، *Bacillus megaterium* تهیه شده از یک شرکت تجاری پروبیوتیک آمریکایی، علیه *V. harveyi* جداسازی شده از سه استخر مختلف پرورش میگو در تایلند و فلیپین فاقد هرگونه فعالیت آنتاگونیست بودند. در نهایت به نظر می‌رسد که گونه جداسازیشده در مطالعه حاضر کاندیدای مناسبی جهت کاربرد پروبیوتیکی در آبزی‌پروری باشد. همچنین در مطالعه Nakayama و همکارانش (۲۰۰۹) *Bacillus subtilis* علیه *V. harveyi* که از کلکسیون میکروارگانیسم‌های گنت بلژیک گرفته شده بود، اثر آنتاگونیستی به اندازه بیش از ۱۰ میلی‌متر داشت. این اثر در CH6 به اندازه ۱۲,۳ میلی‌متر بود (Nakayama *et al.*, 2009; Ravi *et al.*, 2007). گونه‌های جنس *Flavobacterium* در مطالعه Jayanth و همکارانش علیه *V. harveyi* (۲۰۰۱) تأثیر آنتاگونیستی نداشتند. ولی در گونه‌های *Alteromonas* تمام ۹ گونه خالص‌سازی شده دارای خاصیت آنتاگونیستی بین ۳۰-۱ میلی‌متر بود که در ۵ گونه مشابه نتایج تحقیق حاضر بود و فعالیت آنتاگونیست در ۲ گونه کمتر و تنها در یک‌گونه بیشتر بود (Jayanth *et al.*, 2001). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در روش کراس استریک بیشترین خاصیت آنتاگونیستی علیه باکتری ویبریو هاروی که یک پاتوژن دریایی است مشاهده شده است. به نظر می‌رسد که باکتری *k. turfanensis* (CH6) در اثر رقابت بر سر فضا و نوترینت‌ها از طریق سنتز متابولیت‌های ثانویه مانع رشد باکتری‌های محیطی می‌شود. به این ترتیب شانس بیشتری در چسبیدن به سطوح خارجی موجودات و تشکیل کلنی به صورت بایوفیلم دارد (Bhattarai *et al.*, 2006) ولی با توجه به ماهیت محیط زیست دریایی آن از توانایی بازدارندگی کمتری در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی برخوردار است.

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر ممکن است میکروارگانیسم‌های دریایی چسبیده به سطوح موجودات دریایی مانند کیتون و سایر بی‌مهرگان و جلبک‌ها می‌تواند در کنترل بیماری‌هایی نظیر ویبریوزیس در مزارع پرورش میگو به عنوان پروبیوتیک کاربرد داشته باشد، ولی نیاز به بررسی بیشتر از قبیل عصاره‌گیری و بررسی مواد حاصل از متابولیت‌های ثانویه با استفاده از آنالیزهای FTIR و NMR می‌باشد.

منابـع

AnithaJothi, R., Umagowsalya, G., Duraikannu, K., Ramkumar, B., Santhana Krishnan, M., Ramakrtinan, C.M. 2013. Isolation and characterization of microbes associated with White pox diseased coral (Acroporidae) from Palk Bay, southeast coast of India. Asian Journal of Marine Science. 1(1): 6-8.

Bala, M., Kaur, C., Kaur, I., Khan, F., Mayilraj, S. 2012. Kocuriasediminis sp. nov., isolated from a marine sediment sample. Antonie Van Leeuwenhoek. 101(3): 469-478.

Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S., Augustine, N. 2015. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. Journal of bioscience and Bioengineering. 119(3): 323-330.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6(2): 71-79.

Bhattarai, H.D., Lee, Y.K., Cho, K.H., Lee, H.K., Shin, H.W. 2006. The study of antagonistic interactions among pelagic bacteria: a promising way to coin environmental friendly antifouling compounds. Hydrobiologia. 568(1): 417-423.

Burgess, J.G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, Å., Adams, D.R. 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. Biofouling. 19(S1): 197-205.

Chellaram, C., Anand, D., Kesavan, M., Chandrika, C., Gladis, P. 2012. Antagonistic effect of hard coral associated bacteria rom tuticorin coastal waters. Internatinal Journal of Pharmaticular Sciences. 4: 580-583.

Dionisi, H.M., Lozada, M., Olivera, N.L. 2012. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. Revista Argentina de Microbiología. 44(1): 49-60.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

Elbendary, A.A., Hessain, A.M., El-Hariri, M.D., Seida, A.A., Moussa, I.M., Mubarak, A.S., Kabli, S.A., Hemeg, H.A., El Jakee, J.K. 2017. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. Saudi Journal of Biological Sciences. 25(1): 44-46.

Emmanuel, S., Jebasingh, J., Murugan, A. 2011. Antagonistic activity of the barnacle (*Balanus amphitrite*) associated bacteria against human bacterial pathogens. World Applied Sciences Journal. 12(2): 202-207.

Gnanambal, K., Chellaram, C., Patterson, J. 2005. Isolation of antagonistic marine bacteria from the surface of the gorgonian corals at Tuticorin, south east coast of India. Indian journal of Marine Sciences. 34(3): 316-319.

Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., Thakker, J.N. 2014. Delineating Kocuria turfanensis 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. Journal of Plant Interactions. 9(1): 566-576.

Gram, L., Melchiorsen, J., Bruhn, J.B. 2010. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. Marine Biotechnology. 12(4): 439-451.

Jayanth, K., Jeyasekaran, G., Shakila, R.J. 2001. Biocontrol of fish bacterial pathogens by the antagonistic bacteria isolated from the coastal waters of Gulf of Mannar, India. Bulletin-European Association of Fish Pathologists. 21(1): 12-18.

Kaur, C., Kaur, I., Raichand, R., Bora, T.C., Mayilraj, S. 2011. Description of a novel actinobacterium Kocuria assamensis sp. nov., isolated from a water sample collected from the river Brahmaputra, Assam, India. Antonie Van Leeuwenhoek. 99(3): 721-726.

Krishnakumar, S., Dooslin Mercy Bai, V. 2014. Antagonistic characterization of marine microalgae epiphytic bacterium pseudomonas maltophilia SU2 against selected clinical pathogens. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 5(4): B954-B964.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, N., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Journal of Bioinformatics. 23(21): 2947-2948.

Mearns-Spragg, A., Bregu, M., Boyd, K., Burgess, J. 1998. Cross-species induction and enhancement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria. Letters in Applied Microbiology. 27(3): 142-146.

Nakayama, T., Lu, H., Nomura, N. 2009. Inhibitory effects of Bacillus probionts on growth and toxin production of Vibrio harveyi pathogens of shrimp. Letters in Applied Microbiology. 49(6): 679-684.

Pabba, S.K., Samatha, B., Prasad, M.R., Nidadavolu, S.H., Charya, M.S. 2017. Isolation and screening of marine bacteria for antimicrobial activity along Vishakapatanam Coast. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 1(2): 86-89.

Prieto, M.L., O'Sullivan, L., Tan, S.P., McLoughlin, P., Hughes, H., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Lawlor, P.G., Gardiner, G.E. 2012. Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. Marine Drugs. 10(10): 2280-2299.

Ranjan Kumar, R., Jadeja, V.J. 2017. Optimization for enhanced production of antibacterial metabolites by marine Actinomycetes *Kocuria* sp. strain rsk4. Current Trends in Biotechnology & Pharmacy. 11(3): 300-308.

Rao, H.Y., Rakshith, D., Satish, S. 2015. Antimicrobial properties of endophytic actinomycetes isolated from Combretum latifolium Blume, a medicinal shrub from Western Ghats of India. Frontiers in Biology. 10(6): 528-536.

Ravi, A., Musthafa, K., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., Pandian, S. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. Letters in Applied Microbiology. 45(2): 219-223.

Savari, Ah., Jahanpanah, M., Vazirizadeh, A. 2010. Investigation of species diversity and dominance of the top ten of the region between tides Bushehr rocky shores of the Persian Gulf. Scientific Journal of Oceanography. 1(3): 7-16. (in persian)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]

Sivasubramanian, K., Vijayapriya, M. 2011. Antagonistic activity of marine bacteria *Pseudoalteromonas tunicata* against microbial pathogens. African Journal of Microbiology Research. 5(5): 562-567.

Snesth, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2. Williams&Wilkins.

Sugathan, S., Manilal, A., Selvin, J., Idhayadhulla, A., Kumar, R.S., Panikkar, M. 2012. Evaluating the antagonistic potential of seaweed-associated marine bacteria collected from the Southwest Coast of India. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 7(7): 578-587.

Susilowati, R., Sabdono, A., Widowati, I. 2015. Isolation and characterization of bacteria associated with brown algae *Sargassum* spp. from Panjang Island and their antibacterial activities. Procedia Environmental Sciences. 23: 240-246.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30(12): 2725-2729.

Vaseeharan, B., Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology. 36(2): 83-87.

Zheng, L., Han, X., Chen, H., Lin, W., Yan, X. 2005. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. Annals of Microbiology. 55(2): 119-124.

Zhou, G., Luo, X., Tang, Y., Zhang, L., Yang, Q., Qiu, Y., Fang, C. 2008. Kocuria flava sp. nov. and Kocuria turfanensis sp. nov., airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58(6): 1304-1307.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.3.0]