(DOI): 10.22092/ISFJ.2026.135413 35(1) 61-73 Iranian Scientific Fisheries Journal

Effect of Tek Cell Plus probiotic on the abundance of *Vibrio* genus bacteria in western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) broodstock rearing ponds

Bazdar S.[1]; Ghaffari M.[1]*; Ajdari A.[2]; Kord Z.[1]

*mgmostafaghaffari@gmail.com

1-Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
2-Off-shore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran

Received: November 2024 Accepted: July 2025 Published: May 2026

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introduction

Aquaculture, as one of the most important sources of animal protein, plays an increasingly significant role in global food security, and its importance has grown further due to the depletion of natural stocks and the rising demand for seafood (Madhana *et al*., 2021). In this context, shrimp farming has expanded rapidly, particularly in tropical countries, and has become a key sector of aquaculture production (HAU and Haryana, 2022). The Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is considered one of the most important cultured species due to its fast growth, high survival rate, relative resistance to diseases, and tolerance to a wide range of salinities, making it especially suitable for the environmental conditions of southern Iran (Chong-Robles *et al*., 2014; Laramore *et al*., 2001). Despite advances in management practices, bacterial diseases remain among the main challenges faced by shrimp farms, with vibriosis caused by *Vibrio* spp. being a major contributor to mortality and economic losses (Muthu *et al*., 2024). Vibrios are Gram-negative pathogenic bacteria that not only cause diseases in aquatic animals but can also lead to foodborne infections in humans (Bintsis, 2017). The excessive use of antibiotics to control these diseases has resulted in the emergence of antibiotic-resistant bacteria and disruption of the microbial balance in aquaculture environments (Kesarcodi-Watson *et al*., 2008). In this regard, environmentally friendly and preventive approaches, such as the use of probiotics as suitable alternatives to antibiotics, have gained increasing attention (Defoirdt *et al*., 2011; Proespraiwong *et al*., 2023). Probiotics contribute to disease reduction and improved survival by enhancing water quality, strengthening host immunity, and competing with pathogenic bacteria, particularly *Vibrio* spp. (Lahay *et al*., 2023; Verschuere *et al*., 2000). The efficacy of these compounds is commonly evaluated through in vitro antagonism assays (Kesarcodi-Watson et al., 2008).The native probiotic “Tek Cell Plus,” which was isolated from shrimp

farms in Bushehr Province and has reached industrial-scale production following global registration and extensive testing (Ghaednia *et al*., 2024; Mahjoub *et al*., 2019), was evaluated in the present study for its ability to reduce the bacterial load of vibrios in the pond water of Pacific white shrimp broodstock culture systems, as well as for its inhibitory effects on *vibrio* growth under laboratory conditions.

Methodology

Aqueous samples were procured from three discrete broodstock production ponds in the Konarak district utilizing stratified random sampling techniques at a standardized depth of 30 cm below the water surface interface. Comprehensive aquaculture management parameters were documented, including water quality management protocols, nutritional regimes, and physicochemical variables (salinity, pH, and thermal gradient). Laboratory analyses incorporated sample homogenization followed by selective and differential microbiological cultivation on MYP, TSA, and TCBS media, with triplicate inoculations to ensure statistical validity. The antagonistic properties of the commercial probiotic against indigenous *Vibrio* isolates were evaluated through quantitative inhibition zone assays using the agar well diffusion methodology. Positive controls consisted of pre-intervention *Vibrio* population densities, allowing for comparative efficacy assessment.

Result

Microbiological enumeration demonstrated a statistically significant reduction ($p<0.05$) in *Vibrio* spp. population densities following probiotic application across all experimental units. Specifically, Total *Vibrio* Count (TVC) and Total Heterotrophic Bacteria (THB) in ponds 1, 2, and 3 exhibited pre-intervention values of 3.2×10^2, 4.3×10^2, and 5×10^8 CFU/mL, respectively. Post-application analyses revealed substantial reductions to 3×10^2, 1.3×10^2, and 4×10^2 CFU/mL, respectively, indicating a logarithmic decrease in bacterial load, particularly in pond 3. In vitro antagonism assays utilizing the well diffusion technique revealed differential inhibitory capacities. The commercial probiotic suspension (C1) demonstrated maximum and minimum inhibition growth zones against A1-MYP (7.5±0.2 mm) and V.p-TSA (6.3±0.1 mm), respectively. When utilizing purified bacterial isolates from the commercial probiotic (C2), enhanced inhibitory efficacy was observed, with maximum and minimum zones of inhibition registered against A1-MYP (8.5±0.2 mm) and B2-MYP (6.0±0.1 mm), respectively. The most pronounced antimicrobial activity was consistently observed against the A1 isolate and *Vibrio* parahaemolyticus, suggesting strain-specific antagonistic mechanisms.

Discussion and conclusions

The present findings demonstrate that the native probiotic Tek Cell Plus, identified as *Bacillus vallismortis* with the GenBank accession number JQ085958.1, significantly reduced the bacterial load of *Vibrio*, the dominant bacterial genus in shrimp pond water, relative to the total bacterial population. Similar probiotic effects have been reported for *Bacillus cereus* and *Paenibacillus* spp., which were evaluated at concentrations of 10^4 and 10^5 CFU mL^{-1} in post-larval shrimp ponds. In vivo experiments revealed that these bacteria exerted strong probiotic activity against *Vibrio* species, resulting in a significant reduction in shrimp larval mortality. The antagonistic activity of *B. cereus* and *Paenibacillus* spp. against vibrios has

been attributed to the production of bioactive compounds such as zwittermicin-A and kanosamine (Ravi *et al*., 2007). These mechanisms are consistent with the outcomes of the present study, wherein the application of *B. vallismortis* led to a marked reduction in *Vibrio* abundance in pond water. Supporting evidence is provided by Temario *et al*. (2022), who demonstrated that dietary supplementation with *Bacillus subtilis* BF12 significantly increased survival, improved growth performance, and reduced the intestinal abundance of *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon*. Additional studies have emphasized the efficacy of *Bacillus*-based probiotics in *L. vannamei* culture systems. In a 45-day in vivo trial, *B. subtilis* IPA-S.51 and *Shewanella algae* IPA-S.111 inhibited *V. parahaemolyticus* growth while also enhancing shrimp growth performance. Agar-well diffusion assays further confirmed that probiotics, given sufficient contact time, can produce clear inhibition zones against pathogenic vibrios. Ramesh *et al*. (2014) isolated twelve *Bacillus* spp. strains from the gut of *P. monodon*, several of which showed strong inhibitory activity against *V. harveyi* VSH5, with inhibition zones reaching up to 19.0 ± 0.1 mm. These effects were attributed to pH modification, production of inhibitory metabolites, nutrient competition, and lactonase enzyme activity. Probiotic efficacy has also been demonstrated using other bacterial groups. Studies by Ravi *et al*. (2007) and Ferreira *et al*. (2015) confirmed that *Bacillus* spp. significantly reduced *Vibrio* abundance in shrimp ponds, while Thompson *et al*. (2022) showed that lactic acid bacteria, including *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, *L. plantarum*, and *Pediococcus acidolactici*, inhibited several pathogenic vibrios through the release of antimicrobial compounds. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND/EMS), primarily caused by toxigenic strains of *V. parahaemolyticus*, represents one of the most severe bacterial diseases in shrimp aquaculture. A meta-analysis by Ghaednia *et al*. (2024) concluded that direct addition of single-strain *Bacillus*-based probiotics to pond water is the most effective application method for AHPND control. The present study aligns with these findings, as water application of *B. vallismortis* yielded clear suppressive effects on pathogenic vibrios. Finally, bioinformatic analysis identified two *Vibrio* isolates closely related to *Vibrio sagamiensis* and *Vibrio fortis*, both belonging to the class *Gammaproteobacteria*. Previous studies have reported *V. sagamiensis* in tropical marine environments (Yoshizawa *et al*., 2010) and *V. fortis* as an emerging pathogen in aquatic organisms (Thompson *et al*., 2003; Wang *et al*., 2016), suggesting potential pathogenic risks in shrimp farming systems. Overall, the findings confirm the effectiveness of *Bacillus vallismortis* as a robust probiotic candidate for sustainable control of *Vibrio*-associated diseases in shrimp aquaculture.

Conflict of interest

All authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgment

The authors would like to express their sincere appreciation to all those who contributed to this research through their guidance and scientific support.

مجله علمی شیلات ایران ۷۳-۶۱ (۱) ۳۵ (DOI): 10.22092/ISFJ.2026.135413

مقاله علمی – پژوهشی:

اثر پروبیوتیک تک‌سل پلاس بر فراوانی باکتری‌های جنس *Vibrio* در استخرهای پرورش مولدین میگو سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

سولماز بازدار[۱]، مصطفی غفاری*[۱]، اشکان اژدری[۲]، زینب کرد[۱]

*mgmostafaghaffari@gmail.com

۱-گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۲-مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۴ تاریخ چاپ: اردیبهشت ۱۴۰۵

چکیده

در حال حاضر، بیماری‌های فراوانی پرورش میگوی سراسر جهان را تحت تاثیر قرار داده‌اند. عوامل عفونی باکتریایی مهم‌ترین معضل بهداشتی میگوی پرورشی هستند. یک جایگزین مناسب برای عوامل ضد میکروبی شیمیایی برای جلوگیری از بیماری در آبزی پروری میگو، استفاده از پروبیوتیک‌هاست. به طور کلی، بیماری‌های ناشی از *Vibrio* spp.، علت اصلی مرگ‌ومیر در هچری‌های میگو به‌ویژه در مراحل اولیه لاروی است. در بررسی حاضر، نمونه آب مورد مطالعه از ۳ استخر مزارع مولدسازی در شهرستان کنارک از عمق ۳۰ سانتی‌متری از سطح آب به صورت تصادفی برداشت شد. اطلاعات مدیریتی مزرعه پرورش میگو (نحوه مدیریت آب و غذادهی) و برخی شاخص‌های کیفی آب (شوری، pH و درجه حرارت آب)، اندازه‌گیری و ثبت گردید. در آزمایشگاه نمونه‌ها همگن شده و کشت باکتریایی در محیط کشت‌های MYP، TSA و TCBS در سه تکرار به منظور جداسازی اولیه Vibrio غالب از آب استخر انجام شد. نتایج شمارش کل باکتری‌های جنس *Vibrio* نشان داد که پس از افزودن پروبیوتیک به آب استخرها، رشد باکتری‌های *Vibrio* شناسایی شده، نسبت به کنترل مثبت (تعداد باکتری‌های *Vibrio* قبل از افزودن پروبیوتیک)، به طور معنی‌داری کاهش یافت. تعداد کل باکتری جنس *Vibrio* و تعداد کل باکتری هتروترف در سه استخر شماره ۱، ۲ و ۳ قبل از افزودن پروبیوتیک به‌ترتیب اعداد $۳/۲\times۱۰^{۲}$، $۴/۳\times۱۰^{۲}$ و ۵×۱۰^{۸} واحد کلنی بر میلی‌لیتر و بعد از افزودن پروبیوتیک به‌ترتیب اعداد ۳×۱۰^{۲}، $۱/۳\times۱۰^{۲}$ و ۴×۱۰^{۲} واحد کلنی بر میلی‌لیتر نشان داد. نتایج حاصل از تعیین توانایی بازدارندگی رشد به روش انتشار از طریق چاهک بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی محصول تجاری پروبیوتک و استفاده از سوسپانسیون آماده شده (C1) به‌ترتیب در A1-MYP (۷/۵ میلی‌متر) و V.p-TSA (۶/۳ میلی‌متر) مشاهده شد و در باکتری خالص شده از محصول تجاری پروبیوتیک در محیط کشت اختصاصی (C2) بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی مربوط به A1-MYP (۸/۵ میلی‌متر) و B2-MYP (۶ میلی‌متر) مشاهده گردید. بیشترین فعالیت مهار کنندگی پروبیوتیک در تست چاهک گذاری علیه A1 و V.P مشاهده شد. نتایج نشان داد پروبیوتیک تک سل پلاس دارای خاصیت آنتی‌باکتریال در برابر *Vibrio* غالب جداسازی شده از استخر و *Vibrio parahaemolyticus* بود.

لغات کلیدی: پروبیوتیک تک سل پلاس، *Vibrio*، *Vibrio parahaemolyticus*، مولد، میگو، *Litopenaeus vannamei*

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

آبزی‌پروری فعالیتی است که در سرتاسر جهان، از لحاظ اقتصادی و تولید مواد غذایی به عنوان یک منبع مهم پروتئینی در دسترس، برای مصرف انسان در نظر گرفته می‌شود (Madhana *et al.,* 2021). اهمیت آبزی‌پروری در نتیجه صید بی‌رویه و افزایش تقاضا برای غذاهای دریایی، به طور چشمگیری افزایش یافته است. امروزه پرورش میگو یکی از فعالیت‌های مهم آبزی‌پروری در بسیاری از کشورهای گرمسیری بوده و با افزایش سریع تولید، همراه شده است (HAU and Haryana, 2022).

میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بومی آمریکای مرکزی است. این میگو به علت بقاء بالا، رشد سریع در سیستم کشت متراکم و مقاومت در برابر بیماری، به طور گسترده پرورش داده می‌شود. میگوی *L. vannamei* به دلیل تحمل نسبی طیف گسترده‌ای از شوری، به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در آبهای شور، لب شور و شیرین است. این میگو به دلیل مستعد بودن برای زندگی در آبهای بسیار شور تا ۵۰ppt و رشد بسیار خوب در ۴۰ppt، انتخابی مناسب برای پرورش در آبهای جنوب ایران است (Laramore *et al.,* 200l; Chong-Robles *et al.,* 2014).

همه سیستم‌های پرورشی دارای چالش‌های مرتبط با بیماری هستند و استفاده از شیوه‌های مدیریتی مناسب برای ذخیره‌دار کردن استخرها، خاک، آب، تغذیه و مدیریت محیط پرورش، بهترین راه حل در پیشگیری از بروز بیماری است. بیماری ناشی از *Vibrio* spp. یکی از شایع‌ترین عامل تلفات و خسارات اقتصادی در مزارع میگوست (Muthu *et al.,* 2024; Lavilla-Pitogo, *et al.,* 1998). *Vibrio* باکتری‌های گرم‌منفی و دارای شکل میله‌ای خمیده هستند و چندین گونه از آنها می‌توانند باعث عفونت ناشی از غذا در انسان و بروز بیماری در میگو و ماهیان شوند (Bintsis, 2017) برای کنترل بیماری vibriosis، آبزی‌پروران به استفاده بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها روی آورده‌اند که خود باعث ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، سازگاری یا تبادل ژنتیکی در میکروارگانیسم‌ها شده است (Cabello, 2006; Kesarcodi-Watson *et al.,* 2008).

استفاده از راهکارهای پیشگیرانه و سازگار با محیط زیست (پپتیدهای ضد باکتری، پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها) به‌ویژه با توجه به گرایش‌های جدید و سیستم‌های تولید ارگانیک، در آبزی‌پروری اهمیت زیادی پیدا می‌کند. بنابراین، استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد میکروبی برای کنترل و مدیریت مقابله با بیماری، پیشنهاد شده است (Defoirdt *et al.,* 2011; Proespraiwong *et al.,* 2023). پروبیوتیک‌ها به بهبود میزان بقاء، کیفیت آب، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها از طریق رقابت فضایی با باکتری‌های عامل بیماری مانند *Vibrio* spp کمک می‌کنند. افزایش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک رشد و حضور باکتری‌های بیماری‌زا را سرکوب می‌کند و باعث کاهش حساسیت به بیماری می‌شود (Hai, 2015; Verschuere *et al.,* 2000; Lahay *et al.,* 2023).

در حال حاضر، معمولاً از چهار روش میکروبیولوژی برای غربالگری مواد بازدارنده در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) استفاده می‌شود. یک روش رایج برای انتخاب پروبیوتیک‌ها، شناسایی باکتری‌های هدف و انجام آزمون‌های آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی است؛ به این صورت که عوامل بیماری‌زای میگو در معرض پروبیوتیک‌های منتخب یا محصولات خارج‌سلولی آن‌ها قرار می‌گیرند (Kesarcodi-Watson *et al.,* 2008).

پروبیوتیک تک‌سل پلاس، پروبیوتیک بومی جداسازی شده از مزارع پرورش میگو در استان بوشهر است. این محصول پس از آزمایش‌های متعدد و ثبت جهانی باکتری‌های آن در پژوهشکده میگوی کشور، در شرکت دانش‌بنیان تک‌ژن زیست، تولید صنعتی شده است (Mahjoub *et al.,* 2019; Ghaednia *et al.,*2024). در مطالعه حاضر، از این محصول تولیدی استفاده گردید و به بررسی اثر پروبیوتیک بومی تک‌سل پلاس در نمونه آب استخر پرورش پیش مولدین میگو سفید غربی پرورشی برای کاهش بار باکتریایی *Vibrio* و بررسی تاثیر پروبیوتیک تک‌سل پلاس در بازدارندگی رشد باکتری های *Vibrio* (جنس غالب *Vibrio*) در محیط پرورش پیش مولدین و به صورت آزمایشگاهی پرداخته شد.

مواد و روش کار

محل تهیه نمونه‌ها

در مطالعه حاضر، نمونه آب برای بررسی از ۳ استخر مزارع پرورش مولد میگوی سفید غربی واقع در شهرستان کنارک از عمق ۳۰ سانتی‌متری از سطح آب استخر، به صورت تصادفی جمع آوری شد. خصوصیات استخرها در جدول ۱ ارائه شده است.

کد باکتری مورداستفاده در تحقیق حاضر در جدول ۲ ارائه شده است. کدهای A و B براساس باکتری‌های خالص شده قبل و بعد از افزودن پروبیوتیک، به کل استخرها هستند. شاخص‌های دما، شوری، اکسیژن محلول و pH به صورت میانگین در طول انجام آزمایش‌ها با اکسیژن‌متر پروتابل (مدل Oxi5320، آلمان)، شوری‌سنج آتاگو (MASTER-S28M)، pH سنج (Inolab7010، آلمان)، سنجش و ثبت شد. اطلاعات ثبت شده در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۱: خصوصیات استخرهای نگهداری مولدین میگو

Table 1: Characteristics of shrimp brooders maintenance ponds

Characteristic	Pool No. 1 (Treatment 1)	Pool No. 2 (Treatment 2)	Pool No. 3 (Treatment 3)
Water change method	Once a week	Once every 4 days	Once every 4 days
Type of substrate	Concrete (breeding hall)	Geomembrane	Soil
Feeding	4 meals a day	4 meals a day	4 meals a day

جدول ۲: کد باکتری مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 2: Bacterial code used in the present study

A1	Purified isolate (green) before adding probiotics to the pool
A2	Purified isolate (green) after adding probiotics to the pool
B1	Purified isolate (yellow) before adding probiotics to the pool
B2	Purified isolate (yellow) after adding probiotics to the pool
V.P	*Vibrio parahaemolyticus*
Pro	Probiotic TekCell Plus
C1	Tekcell Plus Probiotic and the use of prepared suspension
C2	Bacteria purified from a commercial probiotic product in a proprietary culture medium

جدول ۳: پایش فیزیکی آب استخر پرورش میگو

Table 3: Physical monitoring of shrimp pond water

Dissolved Oxygen (ppm)	pH	Salinity (ppt)	Temperature (c)
3.8	7.6	39	24.5

مراحل خالص‌سازی، شمارش، مواجهه باکتریایی با پروبیوتیک و شناسایی

مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت مهاری پروبیوتیک بومی تک‌سل پلاس در برابر رشد جدایه‌های باکتری جنس *Vibrio* در میگو در دو شرایط *in vitro* و *in vivo* انجام شد. مراحل انجام *in vitro* شامل مراحل شمارش، خالص سازی، شناسایی و مواجهه باکتریایی با پروبیوتیک و مراحل *in vivo* شامل مرحله افزودن پروبیوتیک به آب استخرهای پرورش میگو بود. مرحله افزودن پروبیوتیک بدین صورت بود که پروبیوتیک به میزان یک گرم در هر مترمکعب آب محاسبه شد و در آب ضدعفونی و فیلتر شده، به مدت سه ساعت هیدراته شده و سپس به صورت روزانه به میزان مورد نیاز هر استخر اضافه شد. در ادامه به مراحل مختلف این مطالعه حاضر پرداخته می‌شود.

شمارش بار باکتریایی

شمارش بار باکتری با استفاده از روش AOAC[1] و APHA[2] انجام شد. شمارش باکتری‌ها با استفاده از دستگاه کلنی

[1] Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
[2] American Public Health Association (APHA)

کانتر صورت گرفت. شمارش بار باکتریایی به صورت اختصاصی، تعداد کل باکتری جنس *Vibrio* (TVC)[1] و تعداد کل باکتری هتروترف (THB)[2] انجام شد (McLandsborough, 2004):

تعداد باکتری (CFU ml^{-1}) =رقت/تعداد پرگنه ها (واحد کنی) (میلی‌لیتر)

خالص سازی

نمونه‌ها در محیط کشت‌های TSA، TSB براث و TCBS (محیط کشت اختصاصی *Vibrio*) در سه تکرار به منظور جداسازی اولیه *Vibrio* غالب از آب استخر انجام گرفت. پس از خالص‌سازی تست‌های تشخیص تفریقی بر جدایه‌های خالص شده برای شناسایی باکتری انجام شد. برای تشخیص ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری خالص شده از تست‌های آنزیمی (کاتالاز و اکسیداز)، تست O-F استفاده شد (Tarh, 2020). برای شناسایی گرم‌مثبت یا منفی بودن و شکل باکتری، رنگ‌آمیزی صورت گرفت. برای تشخیص جنس و گونه‌های باکتریایی از استاندارد بریتانیا (. Public Health Engl) استفاده شد (Ratnaraja *et al.,* 2021). برای خالص‌سازی پروبیوتیک بومی تک‌سل پلاس تجاری به این ترتیب که یک گرم از پروبیوتیک توزین شده و در یک لیتر آب دریای فیلتر و اتوکلاو شده (C1) ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط گذاشته شد. بعد از ۲۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از پروبیوتیک در محیط کشت MYP کشت داده شده و در محفظه‌ای با شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸-۷۲ ساعت قرار داده شدند. یک گونه باکتری (C2) از پروبیوتیک جداسازی و خالص شد و برای تست‌های چاهک‌گذاری و کشت خطی مورد استفاده قرار گرفت. (Mohammadi Makvandi *et al.,* 2019).

بررسی فعالیت مهاری پروبیوتیک بومی تک سل پلاس در برابر باکتری‌های جنس *Vibrio* خالص‌سازی شده

از لیوفلیزه باکتری *Vibrio parahaemolyticus* (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران کد: IBRC-M 10706)، به عنوان باکتری استاندارد استفاده شد. باکتری‌های استاندارد و *Vibrio* خالص‌شده (A1، A2) در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت MYP به صورت چمنی کشت داده شدند و درون چاهک‌های ایجاد شده پروبیوتیک تجاری (C1) و باکتری پروبیوتیک خالص‌سازی شده (C2) ریخته شد (Chythanya *et al.,* 2002). برای تست خطی باکتری‌های خالص‌شده A1، A2 به تفکیک رنگ کلونی سبز و زرد به صورت ۳ خط افقی و پروبیوتیک به صورت عمودی بر آنها به وسیله سوآپ کشیده شد. در نهایت محیط کشت‌ها در شرایط بی‌هوازی (جار) به مدت ۷۲-۴۸ ساعت قرار داده شدند (Rattanachuay *et al.,* 2007; Mahjoub *et al.,* 2019).

شناسایی مولکولی

برای استخراج ماده ژنتیکی از سویه‌های مورد نظر از روش CTABمعمولی (CTAB دو درصد حجمی/ وزنی، 1/4 NaCl موالر، ۲۰ EDTA میلی مولار، تریس ۱۰۰-HCl میلی مولار با pH=۸)، استفاده شد. به میزان ۱۰ میلی‌گرم از پلیت باکتری و ۸۰۰ میلی‌لیتر لیز بافر اضافه شد. سپس برای ۳۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، در حمام آب گرم گذاشته شد. یک حجم کلروفرم به محلول اضافه گردید و سپس سانتریفیوژ برای ۱۰ دقیقه (دمای اتاق، 5000× g) انجام شد. ۶۰۰ میلی لیتر از فاز بالایی به ویال جدید منتقل شده و هم حجم آن ایزوپروپانول ۱۰۰ ٪ افزوده شده، مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (دمای اتاق، g 10000×) انجام شد. فاز بالا دور ریخته و به پلیت DNA ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. سپس برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (دمای اتاق، 5000× g) انجام شد. مجدد فاز بالا دور ریخته و رسوب DNA تاحدودی خشک شده و ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر اتوکلاو شده به آن اضافه گردید. برای تکثیر ژن rRNA 16S از آغازگرهای عمومی 27F,1492R استفاده گردید (Basim *et al.,* 2020).

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و برنامه Excel نسخه ۲۰۱۹ انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون

[1] Total viable count (TVC)
[2] Total Heterotrophic Bacteria (THB)

کولموگراف-اسیمرنوف و بررسی همگنی واریانس‌ها با آزمون Leven و برای بررسی اختلاف آماری معنی‌دار در آزمایش، از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح $p<0/05$ و برای بررسی تفاوت معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن استفاده شد.

نتایج

بیماری Vibriosis از بیماری‌های باکتریایی عامل تلفات در مزارع پرورش میگو بعد از ویروس‌ها به‌شمار می‌رود. این باکتری‌های بیماری‌زا نه‌تنها برای میگوها بلکه برای مصرف‌کننده آنها نیز ایجاد خطر می‌نماید (Chandrakala and Priya, 2017).

بررسی فعالیت مهاری پروبیوتیک با توجه به شمارش باکتریایی در شرایط *in vivo*

در بررسی فعالیت مهاری پروبیوتیک تک سل پلاس بر باکتری‌های *Vibrio* نشان داد که پروبیوتیک تک سل پلاس باعث کاهش معنادار شمارش بار میکروبی آب استخرهایی با بسترهای مختلف شد به‌طوری‌که تعداد کل باکتری جنس *Vibrio* (TVC) در تیمار ۱، تیمار ۲ و تیمار ۳ قبل از پروبیوتیک به‌ترتیب اعداد $۳/۲\times۱۰^{۲}$، $۴/۳\times۱۰^{۲}$ و ۵×۱۰^{۸} واحد کنی بر میلی‌لیتر و بعد از افزودن به‌ترتیب اعداد ۳×۱۰^{۲}، $۱/۳\times۱۰^{۲}$ و ۴×۱۰^{۲} واحد کنی بر میلی‌لیتر به ثبت رسیده است (جدول ۴).

جدول ۴: تعداد کل بار باکتریایی TVC وTHB آب استخر

Table 4: Total bacterial load of TVC and THB pool water

	Bacterial load	Before pro		After pro	
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}
Pool No. 1	TVC	TNTC	TNTC	2×10^{3}	TNTC
	THB	TNTC	TNTC	2×10^{3}	TNTC
Pool No. 2	TVC	TNTC	TNTC	2×10^{3}	TNTC
	THB	TNTC	TNTC	8×10^{2}	6×10^{2}
Pool No. 3	TVC	5×10^{8}	TNTC	4×10^{2}	2.9×10^{2}
	THB	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC

بررسی مهار باکتریایی با روش‌های انتشار از طریق چاهک و کراس استریک

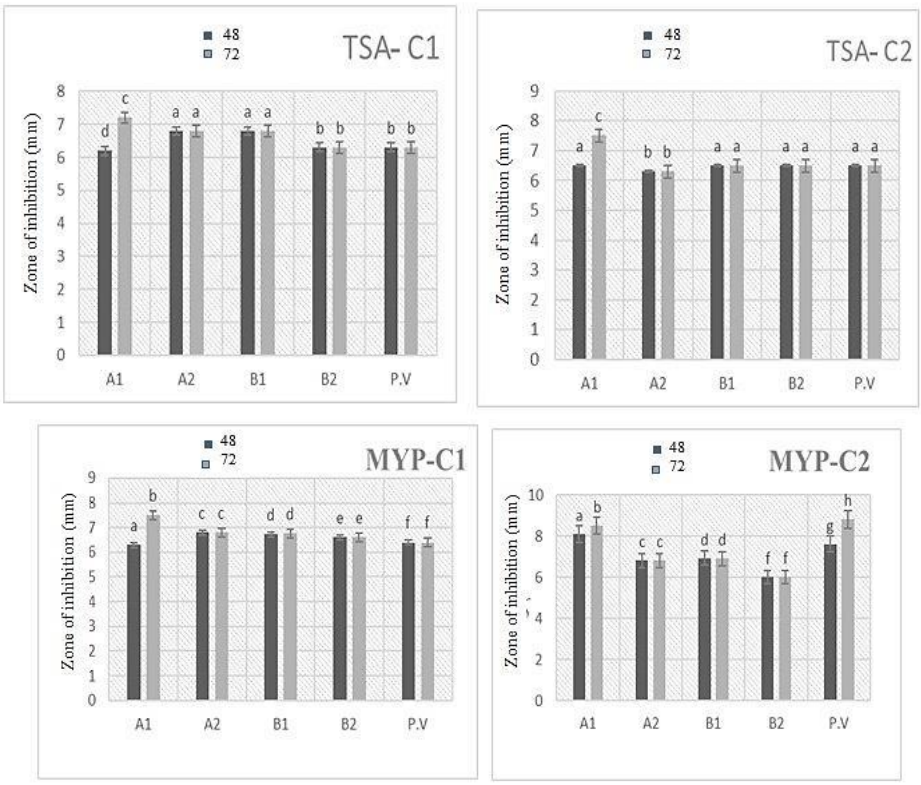
در مرحله بعدی پژوهش، فعالیت مهاری پروبیوتیک تک‌پلاس (باکتری *Bacillus vallismortis* با کد بانک ژن JQ085958.1) علیه ایزوله‌های ویبریوی شناسایی‌شده و همچنین سویه استاندارد ویبریو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تأثیرگذاری مطلوب این پروبیوتیک بر تمامی باکتری‌های مورد آزمایش بود.

نتایج مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری با استفاده از روش انتشار از طریق چاهک با پروبیوتیک C1 و C2 در مواجهه با باکتری‌های (V.P،B2،B1،A2،A1) در محیط کشت‌های MYP و TSAدر شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج مطالعه حاضر، نشان داد که بعد از گذشت زمان و فرصت دادن (۷۲-۴۸ ساعت) به پروبیوتیک‌ها، آنها قادر به تاثیرگذاری خواهند بود. به طور کلی، با توجه به نمودارها، بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی C1 به‌ترتیب در (۷/۵ میلی‌لیتر) MYP-A1 و (۶/۳ میلی‌لیتر) P.V-TSA مشاهده شد. در پروبیوتیک C2 بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی مربوط به A1-MYP (۸/۵ میلی‌لیتر) و (۶ میلی‌لیتر) B2-MYP مشاهده گردید.

با توجه به شکل ۲، میزان خاصیت ضدمیکروبی پروبیوتیک C1 و C2 در مواجهه با باکتری‌های *Vibrio* به روش کراس استریک مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود، C1 باعث عدم رشد باکتری A1 شده است.

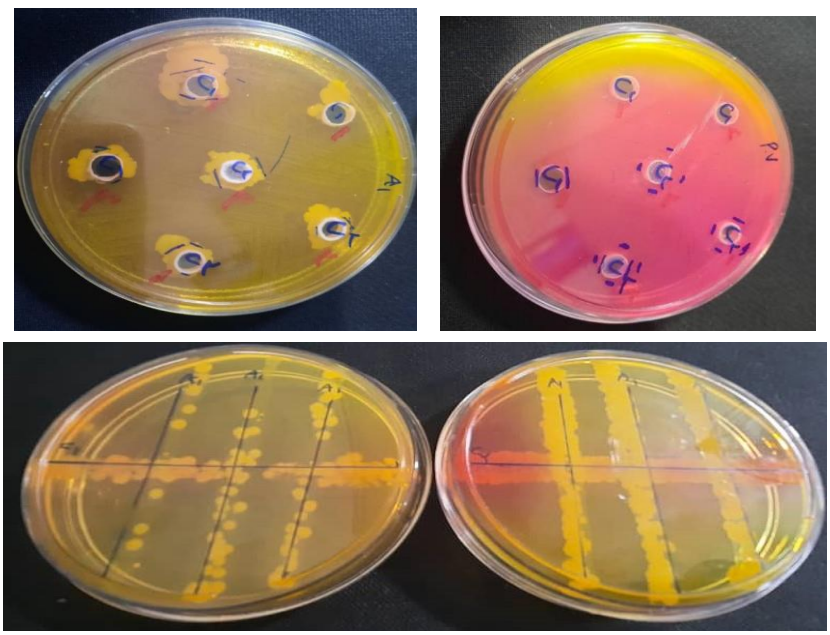
شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌ها

نمونه‌های خالص شده از آب استخر پس از بررسی مورفولوژی و شکل ظاهری کلنی‌ها مورد آزمون‌های تست کاتالاز و اکسیداز و رنگ آمیزی گرم قرار گرفتند. علاوه بر جدایه‌های جنس *Vibrio* جداسازی شده از استخرهای مولدسازی باکتری‌های *Vibrio* استاندارد شامل *Vibrio parahaemolyticus* و باکتری حاصل از کشت پروبیوتیک نیز مورد آزمایش بیوشیمیایی قرار گرفتند. نتایج این شناسایی بیوشیمیایی در جدول ۵ ارائه شده است.



شکل۱: مقایسه هاله عدم رشد باکتری‌های جداسازی شده از استخرها (A1، A2، B1، B2، V.P) در مواجهه با پروبیوتیک C1 و C2 در دو محیط کشت MYP و TSA به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت با انحراف استاندارد (±0.05)

Figure 1: Comparison of the growth inhibition zone of bacteria isolated from pools (A1, A2, B1, B2, V.P) in contact with probiotics C1 and C2 in two culture media MYP and TSA for 48 and 72 hours with standard deviation (±0.05)



شکل ۲: تصاویر مربوط به تست‌های خاصیت ضد میکروبی به روش‌های کراس استریک و انتشار از طریق چاهک

Figure 2: Images of antimicrobial property tests using cross-streak and well-plate methods

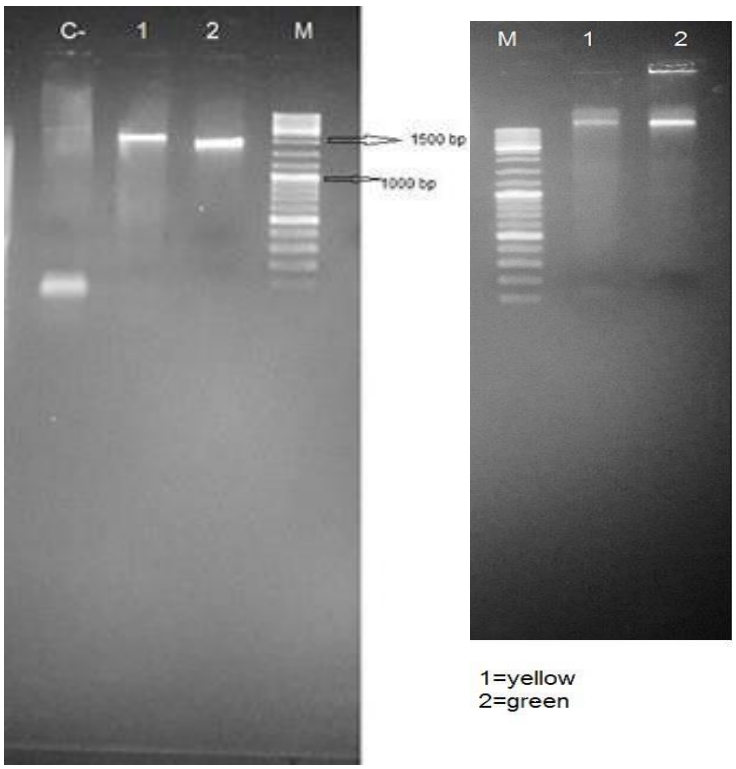
جدول ۵: شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها

Table 5: Biochemical identification of bacteria

Bacteria	Gram stain	Catalase test	Oxidase test
A1	−	+	+
A2	−	+	+
B1	−	+	+
B2	−	+	+
V.P	−	+	+
Probiotics	+	+	−

شناسایی مولکولی بر اساس توالی ژن S rRNA۱۶

بر اساس نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیکی، با دیتابیس‌های NCBI و EzBioCloud انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، نتایج نشان داد که دو گونه باکتری جداسازی شده و شناسایی شده شامل *Vibrio sagamien sis* و *Vibrio fortis* بودند که به‌ترتیب ۹۲/۰۵ و ۹۹/۷۱ بیشترین قرابت را با اعضای خانواده *Vibrionaceae* از رده *Gammaproteobacteria* و شاخه *Proteobacteria* نشان دادند (شکل ۳، جدول ۶).



شکل ۳: تصویر ژل محصول PCR

Figure 3: Photo of PCR product gel

جدول۶: شناسایی تاکسونومی و میزان شاهت ژنتیکی جدایه‌های باکتریایی بر اساس تجزیه‌وتحلیل توالی‌یابی ژن 16S rRNA

Table 6: Identification of bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequencing

Top-hit taxonomy	Similarity (%)	Top-hit strain	Top-hit taxon
Bacteria;Proteobacteria; *Gammaproteobacteria*; *Vibrionales*; *Vibrionaceae*;*Vibrio*	92.05	LC2-047	*Vibrio sagamiensis*
Bacteria; Proteobacteria; *Gammaproteobacteria*; *Vibrionales*;*Vibrionaceae*; *Vibrio*	99.71	fortis LMG21557	*Vibrio fortis*

بحث

مزارع پرورش میگو به عنوان یک تجارت و اقتصاد فعال برای پرورش میگوهای دریایی و غیردریایی در عرصه تولید پروتئین در دسترس بشر به طور فزاینده‌ای در حال گسترش است که این پدیده منجر به گسترش بعضی از بیماری‌ها و در نهایت منجر به مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک می‌شود. اخیراً پروبیوتیک‌ها به عنوان بهترین جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های تجاری با بهبود ایمنی ذاتی، باعث افزایش مقاوت آبزیان از جمله میگوها، در برابر بیماری‌های ویروسی و میکروبی (عامل اصلی ضرر و زیان در مزارع پرورش میگو)، مورد استفاده است. نتایج حاکی از آن است که پروبیوتیک تک سل پلاس - باکتری *Bacillus valismortis* با کد بانک ژن JQ085958.1- باعث کاهش معنادار در بار باکتریایی *Vibrio* جنس غالب آب استخر نسبت به بار باکتریایی کل شده است. فعالیت پروبیوتیک دو گونه باکتری *Bacillus cereus* و *Paenibacillus* spp به صورت جداگانه در غلظت های 10^4 و 10^5 واحد کلنی بر میلی‌لیتر در استخر پست لاروها، مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج در شرایط *in vivo* نشان داد که این باکتری‌ها فعالیت پروبیوتیک مطلوبی علیه گونه‌های *Vibrio* داشتند به‌طوری‌که مرگ‌ومیر لاروهای میگو، به طور معنی‌داری کاهش یافت.

B. cereus و *Paenibacillus* spp. تاثیرات ضدمیکروبی و آنتاگونیستی علیه *Vibrio* نشان دادند که دلیل این فعالیت مهاری را می‌توان به دلیل تولید ترکیبات زیست‌فعال مانند zwittermicin-A و kanosamine به‌وسیله *Bacillus* دانست (Ravi *et al.,* 2007). این نتایج را می‌توان با تحقیق حاضر هم‌سو دانست زیرا بعد از افزودن باکتری *Bacillus valismortis* به عنوان پروبیوتیک، کاهش معنی‌داری در تعداد باکتری‌های استخر مشاهده شد. در مطالعه Temario و همکاران (۲۰۲۲) بر تاثیر پروبیوتیک *Bacillus subtilis* BF12 علیه عفونت باکتریایی *V. parahaemolyticus* در میگوی *P. monodon*، ابتدا باکتری *V. parahaemolyticus* به صورت جداگانه بر میگوی مورد نظر، مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که این باکتری برای میگوی *P. monodon* عامل بیماری‌زا نبوده است. در ادامه، میگوها با پروبیوتیک مذکور تغذیه شدند. نتایج نشان داد که پروبیوتیک باعث افزایش زنده‌مانی و بهبود رشد میگوها شدند. همچنین تعداد کمتری باکتری *V. parahaemolyticus* در معده میگوها نسبت به گروه شاهد گزارش شد (Temario *et al.,* 2022).

نتایج این تحقیقات هم‌سو با پژوهش حاضر مبنی بر کنترل و کاهش میزان باکتری *Vibrio* بعد از افزودن پروبیوتیک *Bacillus valismortis* است. طبق مطالعه Interaminense و همکاران بر فعالیت پروبیوتیک باکتری‌های *B. subtilis* و *Shewanella algae* در استخر پرورش میگوی *L. vannamei*، تاثیر مهاری باکتری‌های *B. subtilis* (IPA-S.51) و *Sh. algae* (IPA-S.111) جدا شده از *L. vannamei* علیه باکتری‌های *L. vannamei* و *V. parahaemolyticus* در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت. در شرایط *in vivo*، پروبیوتیک‌های مذکور به استخر میگوی جوان *L. vannamei* به مدت ۴۵ روز افزوده شد و یک پروبیوتیک تجاری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. هپاتوپانکراس، امعاء و احشاء و مدفوع میگوها به صورت هفتگی برای تجزیه‌وتحلیل تعداد کل باکتری‌های هتروتروف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که پروبیوتیک IPA-S.51 علاوه بر مهار رشد *Vibrio*، قادر به بهبود رشد میگوها بوده است (Interaminense *et al.,* 2018).

نتایج مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری با استفاده از روش چاهک با پروبیوتیک نشان داد که با فرصت دادن به پروبیوتیک‌ها، آنها قادر به تاثیرگذاری خواهند بود. در مطالعه Ramesh و همکاران (۲۰۱۴) بر پروبیوتیک‌های ضد *Vibrio* علیه *V. harveyi* VSH5 در شرایط آزمایشگاهی و *in vivo*، ۱۲ باکتری پروبیوتیک از معده میگو *P. monodon* جداسازی شد و به‌ترتیب AVP01 الی AVP1نامگذاری شد. این باکتری‌ها با عنوان *Bacillus* sp. شناسایی شدند. در این میان باکتری‌های AVP03، AVP04، AVP07 و AVP11 تاثیر مهاری بر رشد *V. harveyi* VSH5 داشتند که این تاثیر مهاری می‌تواند به دلیل تغییراتpH در محیط کشت، تولید ترکیبات فرار و

استفاده از ترکیبات تغذیه‌ای ضروری باشد. باکتری‌های AVP07، AVP03 و AVP11 دارای بیشترین فعالیت مهاری علیه باکتری *V. harveyi* VSH5 در شرایط آزمایشگاهی به‌ترتیب با هاله‌های عدم رشد۱/۰±۱۹/۰، ۰/۶±۱۶/۹، و ۰/۸±۱۴/۳ و در استخر پست‌لاروها بودند که این نتایج را می‌توان با تحقیقات حاضر هم‌سو دانست. از آن‌جایی‌که باکتری مورد مطالعه پروبیوتیک حاضر نیز از جنس *Bacillus* بود، دلیل مقاربت در نتایج را می‌توان به تولید آنزیم‌های لاکتوناز از *Bacillus* نسبت داد (Ramesh *et al.*, 2014).

در مطالعه Ravi و همکاران (۲۰۰۷) در زمینه ارزیابی پروبیوتیک‌ها به عنوان بیوکنترل علیه گونه‌های مختلف *Vibrio* در استخر لارو میگو، 10^9 گونه باکتری از آب دریا، رسوبات دریایی و معده ماهی جداسازی شد و فعالیت آنتاگونیستی آنها علیه گونه‌های مختلف *Vibrio* ارزیابی شد. باکتری‌های *B.cereus* (با عنوان Q1)، *Paenibacillus* spp (Q) و *Paenibacillus polymyxa* (M) ازخود فعالیت آنتاگونیستی نشان دادند (Ravi *et al*., 2007). در مطالعه Ferreira و همکاران (۲۰۱۵) به جداسازی *Bacillus* sp. از آب و بررسی کیفیت آب و ایمنی استخر پرورشی *L. vannamei* پرداختند که *Bacillus* sp. به آب و غذای میگوها برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی و آنتاگونیستی به مدت ۷ روز افزوده شد. در شرایط آزمایشگاهی و در بین *Bacillus* جدا شده، CPQBA 07 DRM 12-571 تنها گونه‌ای بود که قادر به ایجاد بیشترین هاله عدم رشد علیه *V. alginolyticus* به قطر ۲۰ میلی‌متر بود درحالی‌که هیچ‌گونه فعالیت آنتاگونیستی از خود نشان نداد. بعد از افزودن *Bacillus* sp. به مدت ۷ روز به استخر پست لاروها، کاهش معنی‌داری در شمار گونه‌های مختلف *Vibrio* ($10^4\times1$) نسبت به کنترل، ایجاد شد. این نتایج با مطالعه حاضر همسو بود، زیرا افزودن پروبیوتیک به استخر منجر به کاهش بار باکتریایی *Vibrio* جنس غالب آب استخر شد (Ferreira *et al.*, 2015).

در مطالعه Thompson و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی فعالیت آنتاگونیستی و پروبیوتیک سوپرناتانت باکتری‌های اسید لاکتیک علیه *Vibrio* عوامل بیماری‌زا میگوی *L. vannamei* پرداخته شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های *L. Lactobacillus curvatus subsp. Curvatus*، *plantarum* و *Pediococcus acidolactici* قادر به مهار رشد گونه‌های بیماری‌زا میگو شامل *V. (Listonella) anguillarum*، *V. alginolyticus* و *V. harveyi* شدند. یکی از دلایل موفقیت مهار رشد باکتری‌های مذکور را می‌توان رهاسازی ترکیبات ضدمیکروبی در محیط کشت دانست. این پژوهش با تحقیق حاضر تطابق داشت، زیرا رشد باکتری در مقایسه با کنترل، پس از افزودن پروبیوتیک کاهش معنی‌داری داشت و فعالیت مهاری افزایش یافت (Thompson *et al.*, 2022).

یکی دیگر از بیماری‌های ناشی از گونه‌های *Vibrio*، بیماری نکروز حاد کبدی پانکراس (AHPND)[1] (سندرم مرگ زودرس)[2] است. یک بیماری باکتریایی جدید و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های استخرهای میگو که چندین سویه *V. parahaemolyticus* به عنوان عامل اصلی آن شناسایی شدند. با توجه به شیوع AHPND در جنوب ایران، Ghaednia و همکاران (۲۰۲۴) یک متاآنالیز برای تعیین تأثیر سویه‌های باکتریایی در مطالعات مختلف بر AHPND انجام دادند. نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از این متاآمالیز مطابقت داشت. بدین‌ترتیب که بهترین روش استفاده از پروبیوتیک‌ها افزودن آنها به آب استخر پروش است. زمانی که پروبیوتیک‌ها به آب اضافه می‌شوند، باکتری‌های پروبیوتیک رشد کرده و حضور باکتری‌های بیماری‌زا را سرکوب می‌کنند که این امر، حساسیت را به بیماری کاهش می‌دهد. نتیجه دیگر حاصل از این متاآنالیز این بود که پروبیوتیک‌های تک‌سویه بهتر از پروبیوتیک چند سویه بودند و استفاده از باکتری‌های جنس *Bacillus* در پروبیوتیک‌ها مفیدتر هستند. در پژوهش حاضر نیز پروبیوتیک‌ها به آب استخرها اضافه شد و پروبیوتیک مورداستفاده *Bacillus valismortis* بوده که تاثیرات مثبت آن قابل مشاهده بود (Ghaednia *et al.*, 2024).

بر اساس نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیکی، دو گونه باکتری جداسازی شده و شناسایی شده، به باکتری‌های رده:

[1] Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)
[2] Early Mortality Syndrome (EMS)

Gammaproteobacteria، راسته: Vibrionales، خانواده: Vibrionaceae، جنس:*Vibrio* ، گونه: *Vibrio sagamiensis*و *Vibrio fortis* قرابت داشتند. در مطالعه Yoshizawa و همکاران (۲۰۱۰) به نمونه‌برداری از آب دریای خلیج Sagami (منطقه استوایی) از عمق ۵۰ متری پرداختند که گونه شناسایی شده متعلق به جنس جدیدی از *Vibrio* به نام باکتری *V. sagamiensis* به ثبت رسید (Yoshizawa *et al.,* 2010). مطابقت ایزوله حاضر با *V. sagamiensis* (جدا شده از خلیجSagami) را می‌توان به تشابه در آشیان‌های اکولوژیک[1] نسبت داد. اگرچه این دو منطقه فاصله جغرافیایی زیادی دارند، اما هر دو تحت تأثیر توده‌های آب گرم و پارامترهای محیطی مشابه هستند که شرایط بهینه‌ای را برای استقرار سویه‌های مشابه فراهم می‌کنند. علاوه بر این، نقش حمل‌ونقل دریایی در جابه‌جایی جهانی میکروارگانیسم‌ها نباید نادیده گرفته شود. براساس مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۶) باکتری *V. fortis* به عنوان یک گونه جدید بیماری‌زا به عنوان عامل ایجاد کننده التهاب روده در اسب دریایی پرورشی معرفی و شناسایی شد که دو گونه باکتری *V. fortis* IFSI 1 و IFSI 2 شناسایی شده به گونه *V. fortis* CAIM 629 بسیار نزدیک بودند و جداسازی گونه مذکور از آب استخر میگو را می‌توان احتمالاً اشاره به بیماری‌زا بودن آن برای سایر آبزیان نیز دانست (Wang *et al.,* 2016). در مطالعه Thompson و همکاران (۲۰۰۳) دو گونه باکتری جدید *V. fortis* sp. و *Vibrio hepatarius* sp. از موجودات دریایی جداسازی شده است. این باکتری‌ها به‌ترتیب به باکتری‌های*Vibrio Pelagius* و *Vibrio xuii* ۹۹٪/۱ -۹۸٪/۸ مشابهت و نزدیکی داشتند (Thompson *et al.,* 2003).

در مطالعه حاضر، پروبیوتیک بومی با نشان تجاری تکسل پلاس (ساخت شرکت تک ژن زیست)، اثرمعنی‌دار بر مهار رشد و تکثیر جدایه‌های غالب نشان داد و سبب کاهش معنی‌دار در رشد سویه‌های *Vibrio* جداسازی شده از استخرهای پرورش میگو سفید غربی شد. بنابراین، این باکتری از پتانسیل مهار عوامل بیماری‌زا باکتریایی در سیستم آبزی‌پروری برخوردار است.

[1] Ecological Niches

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی افرادی که با راهنمایی‌ها و حمایت‌های علمی خود در انجام این پژوهش مشارکت داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Basim, Y., Mohebali, G., Jorfi, S., Nabizadeh, R., Ghadiri, A., Moghadam, M.A., Soleymani, F. and Fard, N.J.H., 2020. Comparison of performance and efficiency of four methods to extract genomic DNA from oil contaminated soils in southwestern of Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(2):463–468. DOI:10.1007/s40201-020-00474-z**.** (in Persian)

Bintsis, T., 2017. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology***,** 3(3):529. DOI:10.3934/microbiol.2017.3.529

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7):1137–1144. DOI:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x

Chandrakala, N. and Priya, S., 2017. Vibriosis in shrimp aquaculture: a review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 3(2):27–33.

Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L.M. and Giffard-Mena, I., 2014. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development.

Aquaculture, 422:261–267. DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.11.034

Chythanya, R., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208(1–2):1–10. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00714-1

Defoirdt, T., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3):251–258. DOI:10.1016/j.mib.2011.03.004

Ferreira, G.S., Bolivar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., do Nascimento Vieira, F., Mouriño, J.L.P. and Seiffert, W.Q., 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 448:273–279. DOI:10.1016/j.aquaculture.2015.06.006

Ghaednia, B., Mirbakhsh, M. and Kakoolaki, S., 2024. Effects of bacterial probiotics interventions on acute hepatopancreatic necrosis disease (*AHPND*) in shrimp: A meta-analysis. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 23(1):61–83. DOI:10.22092/ijfs.2024.130825 (in Persian)

Ghaednia, B., Mirbakhsh, M., Pazir, M.K., Bahmani, M. and Hafezieh, M., 2024. Effect of probiotic *Bacillus vallismortis* IS03 on growth performance and feed efficiency in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in earthen ponds. *Iranian Scientific Fisheries Journa*, 41–51. DOI:10.22092/ISFJ.2024.131217. (in Persian)

Hai, N.V., 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4):917–935. DOI:10.1111/jam.12886

Hau, C. and Haryana, H., 2022. Shrimp culture (*Litopenaeus vannamei*) and its management. *Agriculture Science*, VII:62–77.

Interaminense, J.A., Vogeley, J.L., Gouveia, C.K., Portela, R.W., Oliveira, J.P., Andrade, H.A., Peixoto, S.M., Soares, R.B., Buarque, D.S. & Bezerra, R.S., 2018. In vitro and in vivo potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and Shewanella algae for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. *Aquaculture*, 488:114–122. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.01.035.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. and Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1–4):1–14. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019

Lahay, A.F., Putriani, R.B., Reza, M., Septi Malidda, E.P., Md Afsar, A.S., Mamdoh, J. and Santanumurti, B., 2023. The role of probiotics in *vannamei* shrimp aquaculture performance: A review. *Veterinary World*, 16(3):638–649. DOI:10.14202/vetworld.2023.638-649

Laramore, S., Laramore, C.R. and Scarpa, J., 2001. Effect of low salinity on growth and survival of postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(4):385–392. DOI:10.1111/j.1749-7345.2001.tb00464.x

Lavilla-Pitogo, C.R., Leano, E.M. and Paner, M.G., 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164(1–4):337–349. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00198-7

Madhana, S., Kanimozhi, G. and Panneerselvam, A., 2021. Chapter 20 – Probiotics in shrimp aquaculture. Advances in Probiotics. Academic Press, pp. 309–325. DOI:10.1016/B978-0-12-822909-5.00020-4.

Mahjoub, M., Mirbakhsh, M., Afsharnasab, M., Kakoolaki, S. and Hosseinzadeh, S., 2019. Inhibitory activity of native probiotic *Bacillus vallismortis* IS03 against pathogenic *Vibrio harveyi* under in vitro and in vivo conditions in *Litopenaeus vannamei*. *Sustainable Aquaculture and Health Management Journal*, 5(2):54–66. DOI:10.29252/ijaah.5.2.54 (in Persian)

McLandsborough, L., 2004. *Food microbiology laboratory*. CRC Press.

Mohammadi Makvandi, Z., Mesbah, M., Gharibi, D., Alishahi, M. and Ghorbanpour, M. , 2019. Evaluation of antimicrobial activity of isolated bacteria from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) intestine, water and sediment in Choebde, Abadan. *Journal of Animal Environment*, 11(1):293–302. (in Persian)

Muthu, C.M., Vickram, A.S., Sowndharya, B.B., Saravanan, A., Kamalesh, R. and Dinakarkumar, Y., 2024. A comprehensive review on the utilization of probiotics in aquaculture towards sustainable shrimp farming. *Fish and Shellfish Immunology*, 147:109459. DOI:10.1016/j.fsi.2024.109459

Proespraiwong, P., Mavichak, R., Imaizumi, K., Hirono, I. and Unajak, S., 2023. Evaluation of *Bacillus* spp. as potent probiotics with reduction in AHPND-related mortality and facilitating growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farms. *Microorganisms*, 11(9):2176. DOI:10.3390/microorganisms11092176

Ramesh, K., Natarajan, M., Sridhar, H., Vanitha, M.U. and Umamaheswari, S., 2014. Feasibility of shrimp gut probionts with anti-vibrio and anti-QS in penaeid culture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(3):26–34.

Ravi, A.V., Musthafa, K., Jegathammbal, G., Kathiresan, K. and 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. DOI:10.1111/j.1472-765X.2007.02180.x

Ratnaraja, N.V., Davies, A.P., Atkins, B.L., Dhillon, R., Mahida, N., Moses, S., Herman, J., Checkley, A., Partridge, D. & Llewelyn, M.J., 2021. Best practice standards for the delivery of NHS infection services in the United Kingdom. *Clinical Infection in Practice*, 12:100095. DOI:10.1016/j.clinpr.2021.100095.

Rattanachuay, P., Kantachote, D. and Suntinanalert, P., 2007. Selection of proteolytic bacteria with ability to inhibit Vibrio harveyi during white shrimp

(*Litopenaeus vannamei*) cultivation. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(2):235–243.

Temario, E.E., Baure, J.G., Mameloco, E.J., Cadiz, R.E. and Traifalgar, R.F., 2022. Inhibitory activity of probiotic Bacillus subtilis BF12 against Vibrio parahaemolyticus infection and its growth-promoting effects on juvenile Penaeus monodon. *International Journal of Aquatic Biology*, 10(1):32–44. DOI:10.22034/ijab.v10i1.1511

Thompson, F., Thompson, C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M. and Swings, J., 2003. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5):1495–1501. DOI:10.1099/ijs.0.02658-0

Thompson, J., Weaver, M.A., Lupatsch, I., Shields, R.J., Plummer, S., Coates, C.J. and Rowley, A.F., 2022. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against pathogenic vibrios and their potential use as probiotics in shrimp (*Penaeus vannamei*) culture. *Frontiers in Marine Science*, 9:240. DOI:10.3389/fmars.2022.807989

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4):655–671. DOI:10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000

Wang, X., Zhang, Y., Qin, G., Luo, W. and Lin, Q., 2016. A novel pathogenic bacteria (*Vibrio fortis*) causing enteritis in cultured seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Journal of Fish Diseases*, 39(6):765–769. DOI:10.1111/jfd.12411

Yoshizawa, S., Wada, M., Yokota, A. and Kogure, K., 2010. *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56(6):499–507. DOI:10.2323/jgam.56.499