

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.

مقاله علمی - پژوهشی:

اثر پروبیوتیک تک سل 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 چاپ: اردیبهشت ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳

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 مرگ و میر در هجری‌های 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 TSA، MYP 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 به ترتیب اعداد 4×10^2 ، $3/2 \times 10^2$ و 5×10^8 واحد کلنی بر میلی‌لیتر و بعد از افزودن پروبیوتیک به ترتیب اعداد 3×10^2 ، $1/3 \times 10^2$ و 4×10^2 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) به ترتیب 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

آبزی پروری 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 آبزی پروری در نتیجه صید بی‌رویه و افزایش تقاضا برای غذاهای دریایی، به طور چشمگیری افزایش یافته است. امروزه پرورش میگو یکی از فعالیت‌های مهم آبزی پروری 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 مترکم 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 ۵۰ ppt و رشد بسیار خوب در ۴۰ ppt، انتخابی مناسب برای پرورش در آبهای جنوب ایران است (Laramore et al., 2001; 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). 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 (پتیدهای ضد باکتری، پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها) به‌ویژه با توجه به گرایش‌های جدید و سیستم‌های تولید ارگانیک، در آبزی پروری 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., 2023; Proespraiwong et al., 2011). 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 خارج سلولی 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 باکتری‌های *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 مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول ۲ ارائه

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	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
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 خالص سازی، شمارش، مواجهه باکتریایی با پروبیوتیک و شناسایی

مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت مهاري پروبیوتیک بومی تک سل پلاس در برابر رشد جدایه های 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

شده است. کدهای A و B براساس باکتری های خالص شده قبل و بعد از افزودن پروبیوتیک، به کل استخرها هستند. شاخص های دما، شوری، اکسیژن محلول و pH به صورت میانگین در طول انجام آزمایش ها با اکسیژن متر پرتابل (مدل Oxi5320، آلمان)، شوری سنج آتاگو (MASTER-28M)، pH سنج (Inolab7010، آلمان)، سنجش و ثبت شد. اطلاعات ثبت شده در جدول ۳ ارائه شده است.

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 ضد عفونی 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 می شود.

شمارش بار باکتریایی

شمارش بار باکتری با استفاده از روش¹ AOAC و² APHA انجام شد. شمارش باکتری ها با استفاده از دستگاه کلنی

¹ Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

² American Public Health Association (APHA)

کانتور صورت گرفت. شمارش بار باکتریایی به صورت اختصاصی، تعداد کل باکتری جنس *Vibrio* (TVC)^۱ و تعداد کل باکتری هتروتروف (THB)^۲ انجام شد (McLandsborough, 2004):

(میلی لیتر) رقت/تعداد پرگنه ها (واحد کفی) = (CFU ml⁻¹) تعداد باکتری

خالص سازی

نمونه‌ها در محیط کشت‌های TSA، TSB، برات 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 مهار پروبیوتیک بومی تکسل 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 (Rattanachua et al., 2007; Mahjoub et al., 2019).

شناسایی مولکولی

برای استخراج ماده ژنتیکی از سویه‌های مورد نظر از روش CTAB معمولی (CTAB) دو درصد حجمی/وزنی، ۱/۴ NaCl موالر، ۲۰ EDTA میلی موالر، تریس ۱۰۰-HCl میلی موالر با pH=۸، استفاده شد. به میزان ۱۰ میلی گرم از پلیت باکتری و ۸۰۰ میلی لیتر لیز بافر اضافه شد. سپس برای ۳۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد، در حمام آب گرم گذاشته شد. یک حجم کلروفرم به محلول اضافه گردید و سپس سانتریفیوژ برای ۱۰ دقیقه (دمای اتاق، ۵۰۰۰×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، ۱۰۰۰۰×g) انجام شد. فاز بالا دور ریخته و به پلیت DNA ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. سپس برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (دمای اتاق، ۵۰۰۰×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 16S rRNA از آغازگرهای عمومی 27F، 1492R استفاده گردید (Basim et al., 2020).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار 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)

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

در بررسی فعالیت مهار 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 به طوری که تعداد کل باکتری جنس *Vibrio* (TVC) در تیمار ۱، تیمار ۲ و تیمار ۳ قبل از پروبیوتیک به ترتیب اعداد $3/2 \times 10^2$ ، $4/3 \times 10^2$ و 5×10^2 واحد کنی بر میلی لیتر و بعد از افزودن به ترتیب اعداد 3×10^2 ، $1/3 \times 10^2$ و 4×10^2 واحد کنی بر میلی لیتر به ثبت رسیده است (جدول ۴).

کولموگراف-اسیمرنوف و بررسی همگنی واریانس‌ها با آزمون Leven و برای بررسی اختلاف آماری معنی‌دار در آزمایش، از آنالیز واریانس یک طرفه 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 به شمار می‌رود. این باکتری‌های بیماری‌زا نه تنها برای میگوها بلکه برای مصرف‌کننده آنها نیز ایجاد خطر می‌نماید (Chandrakala and Priya, 2017).

جدول ۴: تعداد کل بار باکتریایی TVC و THB 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

مشاهده شد. در پروبیوتیک C2 بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی مربوط به A1-MYP (۸/۵ میلی لیتر) و (۶ میلی لیتر) B2-MYP مشاهده گردید.

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

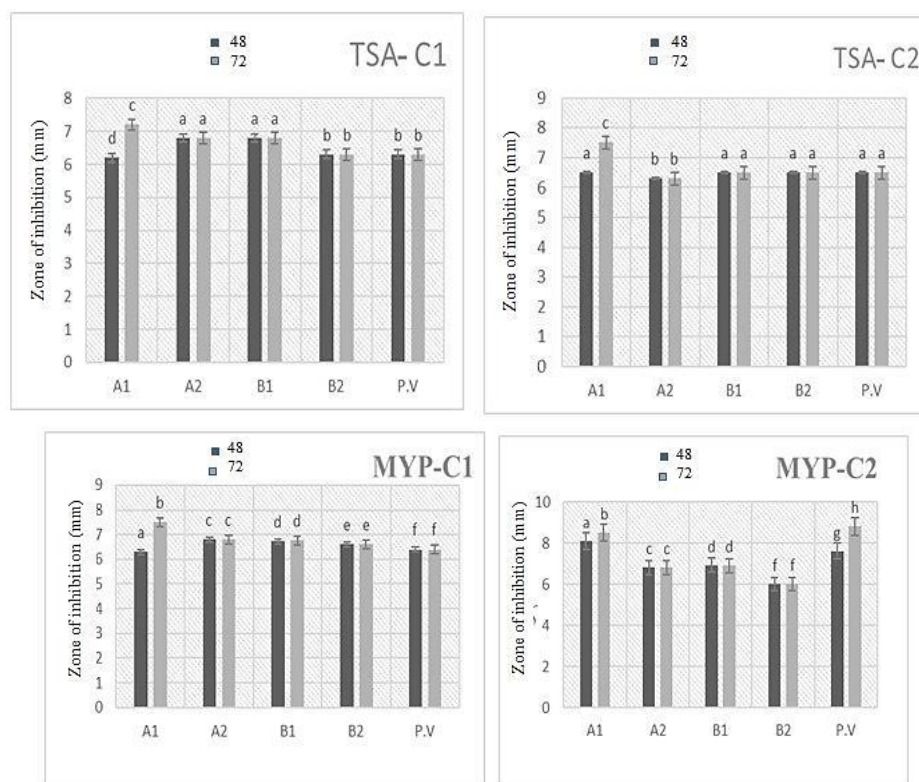
شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌ها

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.

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

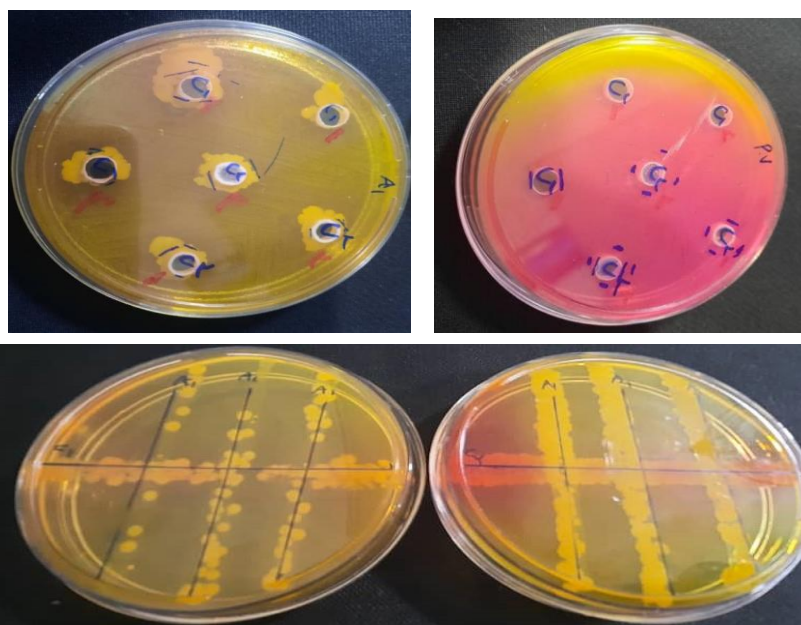
در مرحله بعدی پژوهش، فعالیت مهار پروبیوتیک تک پلاس (باکتری *Bacillus vallismortis* با کد بانک ژن JQ085958.1) علیه ایزوله‌های ویبریوی شناسایی شده و همچنین سویه استاندارد ویبریو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده تأثیرگذاری مطلوب این پروبیوتیک بر تمامی باکتری‌های مورد آزمایش بود.

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 TSA در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج مطالعه حاضر، نشان داد که بعد از گذشت زمان و فرصت دادن (۲۲-۴۸ ساعت) به پروبیوتیک‌ها، آنها قادر به تأثیرگذاری خواهند بود. به طور کلی، با توجه به نمودارها، بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی C1 به ترتیب در (۷/۵ میلی لیتر) MYP-A1 و (۶/۳ میلی لیتر) P.V-TSA



شکل ۱: 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 TSA و MYP 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

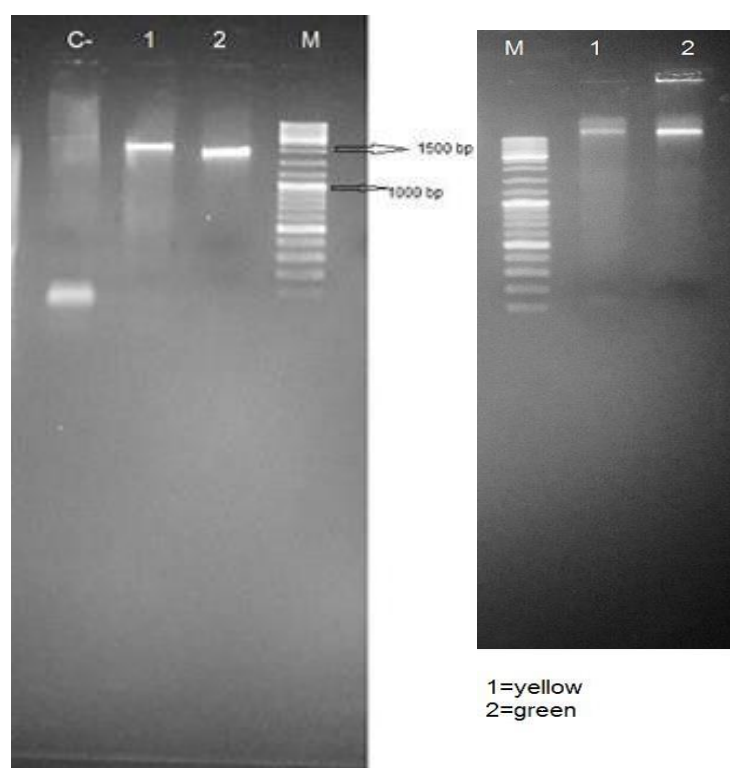
Figure 2: Images of antimicrobial property tests using cross-streak and well-plate methods

شناسایی مولکولی بر اساس توالی ژن ۱۶S rRNA
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* و *Vibrio fortis* بودند که به ترتیب ۹۲/۰۵ و ۹۹/۷۱ بیشترین قرابت را با اعضای خانواده *Vibrionaceae* از رده *Proteobacteria* و شاخه *Gammaproteobacteria* نشان دادند (شکل ۳، جدول ۶).

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	+	+	-



شکل ۳: تصویر ژل محصول PCR
Figure 3: Photo of PCR product gel

جدول ۶: شناسایی تاکسونومی و میزان شایستگی جدایه‌های باکتریایی بر اساس تجزیه و تحلیل توالی‌یابی ژن ۱۶S 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	<i>Vibrio sagamiensis</i>
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio	99.71	fortis LMG21557	<i>Vibrio fortis</i>

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 مقاومت 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 غلظت‌های 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 ضد میکروبی و آنتاگونیستی علیه *Vibrio* نشان دادند که دلیل این فعالیت مهاري را می‌توان به دلیل تولید ترکیبات زیست‌فعال مانند kanosamine و zwittermicin-A 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 تجزیه و تحلیل 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 VSH5 *V. harveyi* در شرایط آزمایشگاهی و *in vivo* ۱۲ باکتری پروبیوتیک از معده میگو *P. monodon* جداسازی شد و به ترتیب AVP01 الی AVP1 نامگذاری 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 تغییرات pH در محیط کشت، تولید ترکیبات فرار و

vannamei پرداخته شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های *L. Lactobacillus curvatus subsp. Curvatus* *Pediococcus acidolactici* و *plantarum* رشد گونه‌های بیماری‌زا میگو شامل *V. (Listonella)* *V. harveyi* و *V. alginolyticus* *anguillarum* شدند. یکی از دلایل موفقیت مهار رشد باکتری‌های مذکور را می‌توان رهاسازی ترکیبات ضد میکروبی 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)^۱ (سندرم مرگ زودرس)^۲ 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 متاآنالیز مطابقت داشت. بدین ترتیب که بهترین روش استفاده از پروبیوتیک‌ها افزودن آنها به آب استخر پرورش 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 مورد استفاده *Bacillus valismortis* بوده که تأثیرات 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:

استفاده از ترکیبات تغذیه‌ای ضروری باشد. باکتری‌های AVP07، AVP03 و AVP11 دارای بیشترین فعالیت مهاری علیه باکتری *V. harveyi* VSH5 در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب با هاله‌های عدم رشد $19/0 \pm 0/1$ ، $16/9 \pm 0/6$ و $14/3 \pm 0/8$ و در استخر پست‌لاروها بودند که این نتایج را می‌توان با تحقیقات حاضر هم‌سو دانست. از آنجایی که باکتری مورد مطالعه پروبیوتیک حاضر نیز از جنس *Bacillus* بود، دلیل مقاربت در نتایج را می‌توان به تولید آنزیم‌های لاکتوناژ 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) از خود 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 ضد میکروبی 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 درحالی که هیچ گونه 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* (1×10^4) 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.*

¹ Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)

² Early Mortality Syndrome (EMS)

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., Mohebbi, 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.

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 خلیج Sagami) را می‌توان به تشابه در آشیان‌های اکولوژیک^۱ 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 IFSI 1 و *V. fortis* 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 به ترتیب به باکتری‌های *Vibrio Pelagius* و *Vibrio xuii* ۹۸٪/۸-۹۹٪/۱۱ شباهت 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 آبی‌پروری برخوردار است.

¹ Ecological Niches

- 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., Mourinho, 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 Malidd, 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 probiotics 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., Jegathambal, 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 Suntainalert, 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/ij.s.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