وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان:

دستیابی به دانش فنی طراحی و تولید کنسرسیوم میکروارگانیسم‌های بومی پروبیوتیک میگوی پرورشی

مجری مسئول:
محسن گذری

شماره ثبت
٦٤٩٨٠

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان طرح/پروژه: دستیابی به دانش فنی طراحی و تولید کنسرسیوم میکروارگانیسم های بومی پروبیوتیک میگوی پرورشی
کد مصوب: ۹۹۰۱۱-۰۰۱-۱۲-۷۵-۰۱٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: محسن گذری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : محسن گذری
نام و نام خانوادگی مجری: محسن گذری
نام و نام خانوادگی همکار(ان): -
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): مریم میربخش
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان هرمزگان
تاریخ شروع: ۱۳۹۹/٤/۱
مدت اجرا: ۲ سال و ۷ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۲
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: دستیابی به دانش فنی طراحی و تولید کنسرسیوم میکروارگانیسم های بومی پروبیوتیک میگوی پرورشی

کد مصوب : ۰۱٤-۷۵-۱۲-۰۰۱-۹۹۰۱۱

شماره ثبت (فروست) : ٦٤٩٨٠ تاریخ : ۱٤۰۲/۱۲/۱۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محسن گذری دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته میکروبیولوژی است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۱۴۰۲/۱۱/۲۹ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۵
۱-۱-وضعیت موجود صنعت آبزی پروری و راهبردهای توسعه آن ۵
۱-۲- فراورده های پروبیوتیک در صنعت آبزی پروری ۶
۱-۳- مفهوم کنسرسیوم میکروارگانیسم ها و چشم انداز کاربرد آن در صنعت آبزی پروری ۷
۱-۴-میکروبیوم روده میگو ۸
۱-۵-چشم انداز استفاده از کنسرسیوم میکروارگانیسم های پروبیوتیک در آبزی پروری ۹
۱-۶- مطالعات بازار پروبیوتیک در صنعت آبزی پروری کشور ۱۰
۱-۷- اهداف طرح ۱۱
۲-سوابق تحقیق ۱۲
۳-مواد و روش ها ۲۲
۳-۱- انتخاب سایت های نمونه برداری ۲۲
۳-۲- نمونه برداری ۲۲
۳-۳- جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم ها ۲۳
۳-۴- شناسایی جدایه ها ۲۳
۳-۴-۱-شناسایی اولیه جدایه ها ۲۳
۳-۴-۲- شناسایی ژنتیک جدایه ها ۲۳
۳-۴-۲-۱- استخراج DNA ۲۳
۳-۴-۲-۲- تکثیر ژن 16S rRNAجدایه ها ۲٤
۳-۴-۲-۳- تعیین الگوی تنوع زیستی با استفاده از RFLP fingerprints ۲٥
۳-۴-۲-۴- تعیین توالی ژن 16S rRNA ۲٥
۳-۴-۲-۵- آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه های مولد ۲٥
۳-۴-۲-۶- مطالعات فیلوژنتیک ۲٥
۳-۵- غربالگری توانمندی متابولیک میکروارگانیسم های جداسازی شده ۲۵
۳-۵-۱- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی ۲۵
۳-۵-۲- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی در سطح ژنوتیپی ۲۶

۳-۵-۳- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد آنزیم های هدف ۲۶
۳-۵-۳-۱- غربالگری فنوتیپی فعالیت پروتئاز ۲۶
۳-۵-۳-۲-غربالگری فنوتیپی فعالیت آمیلاز ۲۷
۳-۵-۳-۳-غربالگری فنوتیپی فعالیت لیپاز ۲۷
۳-۵-۳-۴- غربالگری ژنوتیپی فعالیت های آمیلاز و پروتئاز ۲۷
۳-۵-۴- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات آنتی اکسیدانت ۲۸
۳-۶- ارزیابی ایمنی زیستی ۲۸
۳-۶-۱- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات توکسیک ۲۸
۳-۶-۲- سنجش سمیت متابولیت های استخراج شده در مقابل لارو میگو ۲۹
۳-۶-۳- سنجش سمیت متابولیت های استخراج شده در مقابل جلبک های مفید ۲۹
۳-۶-۵- بررسی فعالیت های همولیزیس و لسیتناز در سویه های منتخب ۳۰
۳-۷- شناسایی ویژگیهای فنوتیپی باکتریهای توانمند منتخب ۳۱
۳-۷-۱- شناسایی بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک ۳۱
۳-۷-۲- شناسایی بر اساس ویژگیهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ۳۱
۳-۸- ارزیابی دینامیک جمعیت گونه های دارای مشارکت در کنسرسیوم پروبیوتیک ۳۲
۳-۸-۱- بررسی تاثیرات متقابل سویه‌های مشارکت کننده در کنسرسیوم پروبیوتیک ۳۲
۳-۸-۲- بررسی تحمل سویه‌های مشارکت کننده در کنسرسیوم میکروبی به اسید ها و نمک های صفراوی ۳۳
۳-۸-۳- بررسی رقابت سویه‌های مشارکت کننده در کنسرسیوم پروبیوتیک در جذب آهن ۳۴
۳-۹- شناسایی متایولیت های ثانویه موثر در میانکنش های شناسایی شده در کنسرسیوم پروبیوتیک ۳۴
۳-۹-۱- تولید و استخراج متایولیت های ثانویه ۳۴
۳-۹-۲- خالص سازی متابولیت های تولید شده توسط سویه‌های توانمند ۳۵
۳-۹-۳- تعیین ساختار شیمیایی متابولیت های ثانویه فعال ۳۶
۳-۱۰- ارزیابی تنوع زیستی میکروفلور طبیعی روده میگو بعد از تیمار با کنسرسیوم میکروبی ۳۷
۳-۱۰-۱- تهیه میگو و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی ۳۷
۳-۱۰-۲- تهیه غذا ، فرموله کردن با کنسرسیوم پروبیوتیک و غذادهی ۳۸
۳-۱۰-۳- سنجش فراوانی، شناسایی و تعیین الگوی تنوع زیستی باکتریهای موجود در روده میگو ۳۸
۳-۱۲- روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها ۳۹
۳-۱۲-۱- آنالیز های آماری بخش برون تنی ۳۹

۳-۱۳- آماده سازی و تلقیح میکروارگانیسم های بیماریزا ۳۹
۳- ۱۴- تعیین دوز بیماریزایی عوامل میکروبی مورد آزمون: ۴۰
۳-۱۵- انجام آزمون مواجهه با عوامل بیماریزا ۴۰
۳-۱۶- سنجش بیان نسبی ژن‌های لیزوزیم و کراستین ۴۱
۳-۱۶-۱- نمونه‌برداری جهت مطالعات بیان ژن ۴۱
۳-۱۶-۲- استخراج RNA ۴۱
۳-۱۶-۳- ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده ۴۲
۳-۱۶-۴- ارزیابی کمی(تعیین غلظت) RNA ۴۲
۳-۱۶-۵-حذف DNA ۴۳
۳-۱۶-۶- سنتز cDNA ۴۳
۳-۱۶-۷- طراحی پرایمر برای ژن‌های لیزوزیم و کراستین ۴۳
۳-۱۶-۸- انجام PCR برای تست cDNA و پرایمرها ۴۴
۳-۱۶-۹- Real time PCR ۴۴
۳-۱۶-۱۰- ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کار رفته با استفاده از منحنی استاندارد ۴۴
۳-۱۷ -بافت‌شناسی هپاتوپانکراس ۴۵
۳-۱۸- استخراج همولنف ۴۶
۳-۱۸-۱- اندازه‌گیری گلوکز ۴۶
۳-۱۸-۲- اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید ۴۶
۳-۱۸-۳- اندازه‌گیری کلسترول ۴۶
۳-۱۸-۴- سنجش غلظت پروتئین ۴۷
۳-۱۸-۵- اندازه‌گیری آلبومین ۴۷
۳-۱۸-۶- شمارش سلول‌های هموسیت کل ۴۷
۳-۱۸-۷- شمارش تفریقی هموسیت‌ها ۴۷
۳-۱۹- جمع آوری و اندازه گیري مواد باقیمانده ۴۸
۳-۲۰- اندازه گیري فاکتورهاي فیزیکي و شیمیائي آب ۴۸
۳-۲۱- ارزیابي فراوانی میکروفلور تانک پرورش بعد از تیمار با کنسرسیوم میکروبي ۴۹
۳-۲۲- زیست سنجي و اندازه گیري پارامترهاي رشد ۴۹
۳-۲۳- روش تجزیه‌وتحلیل آماري داده‌ها ۴۹

۴-نتایج ۵۰
۴-۱-۱-ارزیابی وضعیت سلامت و قابلیت مزارع پرورش میگو به عنوان منبع جداسازی باکتریهای پروبیوتیک ۵۰
۴-۱-۱-۱- نتایج ارزیابی کمّی کیفیت میکروبی مزارع پرورش میگو ۵۰
۴-۱-۲- الگوی تنوع زیستی باکتریهای جداسازی شده از نمونه های محیطی و روده میگو ۵۲
۴-۱-۲-۱- الگوی تنوع زیستی باکتریهای جداسازی شده از نمونه های آب ۵۳
۴-۱-۲-۲- الگوی تنوع زیستی باکتریهای های جداسازی شده از نمونه های رسوب ۵۳
۴-۱-۲-۳- الگوی تنوع زیستی باکتریهای جداسازی شده از نمونه های روده میگو ۵۴
۴-۱-۳-آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از نمونه های محیطی و روده میگو ۵۵
۴-۱-۳-۱- روابط فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از آب استخر ۵۵
۴-۱-۳-۲-روابط فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از نمونه های رسوب ۵۵
۴-۱-۳-۳- روابط فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از نمونه های روده میگو ۵۶
۴-۱-۴- نتایج غربالگری توانمندی متابولیک میکروارگانیسم های جداسازی شده ۵۷
۴-۱-۴-۱- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی ۵۸
۴-۱-۴-۲- غربالگری و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی میکروارگانیسم های جداسازی شده ۶۶
۴-۱-۴-۳- غربالگری فعالیت آنزیمی باکتریهای جداسازی شده ۶۹
۴-۱-۴-۴- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات سمی در سطح فنوتیپی ۷۶
۴-۱-۴-۵- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات سمی در سطح ژنوتیپی ۸۴
۴-۱-۵- ارزیابی دینامیک جمعیت و میانکنش های سویه های توانمند ۸۵
۴-۱-۵-۱- بررسی تاثیرات متقابل سویه‌های مشارکت کننده در کنسرسیوم پروبیوتیک ۸۵
۴-۱-۶- تعیین ویژگیهای فنوتیپی سویه‌های موجود درکنسرسیوم پروبیوتیک ۱۴۲
۴-۱-۷- طراحی کنسرسیوم بر اساس توانمندی های میکروارگانیسم های پروبیوتیک ۱۴۴
۴-۱-۸- آزمون های درون تنی ۱۴۶
۴-۱-۸-۱- ارزیابی تغییرات الگوی تنوع زیستی میکروفلور طبیعی روده میگو بعد از تیمار با کنسرسیوم پروبیوتیک ۱۴۶
۴-۲- پروژه: ارزیابی اثر بازدارندگی کنسرسیوم میکرو ارگانیسم های پرو بیوتیک بومی بر میکروارگانیسم های بیماری زای شاخص میگوی سفید غربی در شرایط درون تنی ۱۴۸
۴-۲-۱- ارزیابی اثر بازدارنده کنسرسیوم پروبیوتیک در آزمون مواجهه ۱۴۸
۴-۲-۱-۱- ارزیابی اثر بازدارنده کنسرسیوم پروبیوتیک در آزمون مواجهه با *V. harveyi* ۱۴۸

۴-۲-۱-۲- ارزیابی تاثیر بازدارنده میکروارگانیسم های پروبیوتیک در آزمون مواجهه با *V. parahaemolyticus* ۱۴۹
۴-۲-۱-۳-ارزیابی تاثیر بازدارنده میکروارگانیسم های پروبیوتیک در آزمون مواجهه با Fusarium oxysporum ۱۵۰
۴-۲-۱-۴- ارزیابی تاثیر بازدارنده میکروارگانیسم های پروبیوتیک در آزمون مواجهه با *Lagenidium* sp. ۱۵۱
۴-۳- پروژه: ارزیابي تاثير كنسرسيوم ميكروارگانيسم هاي پروبيوتيک بومي بر كيفيت آب، ميزان رسوب گذاري و تنوع ميكروبي تانک هاي پرورش ميگوي سفيد غربي تحت سيستم پرورش فوق متراكم با تعويض آب كم ۱۵۲
۴-۳-۱- ارزیابی تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر کیفیت آب ۱۵۲
۴-۳-۱-۱- تغییرات میزان دمای آب مخازن پرورش میگو ۱۵۲
۴-۳-۱-۲-میزان شوری آب مخازن پرورش میگو ۱۵۳
۴-۳-۱-۳- میزان pH آب مخازن پرورش میگو ۱۵۴
۴-۳-۱-۴-میزان اکسیژن محلول آب مخازن پرورش میگو ۱۵۶
۴-۳-۱-۵-مقایسه میزان آمونیاک آب مخازن پرورش میگو ۱۵۷
۴-۳-۱-۶- مقایسه میزان نیترات آب مخازن پرورش میگو ۱۵۸
۴-۳-۱-۷- مقایسه میزان نیتریت آب مخازن پرورش میگو ۱۵۹
۴-۳-۱-۸-مقایسه غلظت فسفات آب مخازن پرورش میگو ۱۶۰
۴-۳-۲- مقایسه میزان رسوب‌گذاری در مخازن پرورش میگو ۱۶۱
۴-۳-۳- ارزیابی تغییرات تنوع زیستی میکروفلور آب مخازن پرورش میگو ۱۶۳
۴-۳-۳-۱- سنجش فراوانی باکتریهای هتروتروف در آب مخازن در تیمارهای مختلف ۱۶۳
۴-۳-۳-۲- ارزیابی تغییرات تنوع زیستی میکروفلور آب مخازن پرورش میگو ۱۶۳
۴-۳- پروژه: ارزیابی تأثیر کنسرسیوم پروبیوتیک تولید شده بر پاسخ‌های ایمنی و وضعیت تغذیه‌ای میگو سفید غربی (*Penaeus vannamei*) ۱۶۴
۴-۳-۱- ارزیابی تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر پاسخ‌های ایمنی و وضعیت تغذیه‌ای ۱۶۴
۴-۳-۳-۱- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر بیان ژن‌های کراستین و لیزوزیم ۱۶۴
۴-۳-۳-۲-تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر میزان گلوکز همولنف ۱۶۷
۴-۳-۳-۳- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر میزان تری‌گلیسرید ۱۶۷
۴-۳-۳-۴- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر میزان کلسترول ۱۶۸
۴-۳-۳-۵- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر میزان پروتئین ۱۶۹

۴-۳-۳-۶- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر میزان آلبومین ۱۷۰
۴-۳-۳-۷- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر تعداد و ترکیب هموسیت‌ها ۱۷۰
۴-۳-۳-۸- تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر تعداد سلول‌های ترشحی ۱۷۳
۴-۴- پروژه: بررسي تاثير كنسرسيوم پروبيوتيک بومي بر پارامتر هاي رشد و بقاي ميگوي سفيد غربي *Penaeus vannamei* در شرايط آزمايشگاهي ۱۷۴
۴-۴-۱- بررسي تاثير كنسرسيوم پروبيوتيک بومي بر پارامتر هاي رشد و بقاي ميگوي سفيد غربي *Penaeus vannamei* در شرايط آزمايشگاهي ۱۷۴
۴-۴-۱-۱- زیست‌سنجی در تیمارهای آزمایشی-میانگین وزن در تیمارهای آزمایشی ۱۷٤
۴-۴-۱-۲- میانگین طول میگوی وانامی در تیمارهای آزمایشی ۱۷٦
۴-۴-۱-۳-میانگین طول نهایی به وزن در تیمارهای آزمایشی ۱۷۷
۴-۴-۱-۴- درصد بازماندگی در تیمارهای آزمایشی ۱۷۸
۴-۴-۱-۵- میزان FCR در تیمارهای آزمایشی ۱۷۸
۵-بحث ۱۸۰
۵-۱- تحلیل سلامت و توانمندی اکوسیستم بر اساس ترکیب جوامع باکتریایی ۱۸۰
۵-۲- ارزیابی توانمندی های متابولیک باکتریهای جداسازی شده ۱۸۴
۵-۲-۱- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی..... ۱۸۵
۵-۲-۲- غربالگری و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی باکتری های جداسازی شده..... ۱۸۷
۵-۲-۳- غربالگری فعالیت آنزیمی باکتری های جداسازی شده..... ۱۸۹
۵-۳- توانایی سویه های تشکیل دهنده کنسرسیوم در جذب آهن ۱۹۲
۵-۴- تحمل سویه های موجود در کنسرسیوم به اسید ها و نمک های صفراوی..... ۱۹۳
۵-۵- طراحی کنسرسیوم بر اساس توانمندی های میکروارگانیسم های پروبیوتیک ۱۹۳
۵-۶- ارزیابی تاثیر کنسرسیوم پروبوبیوتیک بر تنوع فلور میکروبی روده ۲۱۶
۵-۷- ارزیابی اثر بازدارندگی کنسرسیوم پروبیوتیک بر میکروارگانیسم های بیماری زا در شرایط درون تنی ۲۱۹
۵-۸- ارزيابي تاثير كنسرسيوم پروبيوتيک بر كيفيت آب، ميزان رسوب گذاري و تنوع ميكروبي تانک پرورش ميگو ۲۲۴
۵-۹- ارزیابی تأثیر کنسرسیوم پروبیوتیک تولید شده بر پاسخ‌های ایمنی و وضعیت تغذیه‌ای ۲۳۲
۵-۱۰- بررسي تاثير كنسرسيوم پروبيوتيک بومي بر پارامتر هاي رشد و بقاي ميگو ۲۳۹
۶- نتیجه گیری ۲۴۲

پیشنهادها ۲۴۴
منابع ۲۴۶
چکیده انگلیسی ۲۷۸

چکیده

بهره برداری از فراورده های پروبیوتیک نقشی کلیدی در حفظ تعادل و پایداری اکوسیستم آبزی پروری و افزایش مقیاس تولید ایفا می نماید. هدف از اجرای طرح حاضر طراحی فرمولاسیون‌هایی از فراورده پروبیوتیک مشتمل بر کنسرسیوم میکروارگانیسم های بومی واجد عملکردهای مفید برای میگوی پرورشی بود. بدین منظور وضعیت سلامت و توانمندی اکوسیستم در ۱۰ سایت پرورش میگوی استان هرمزگان بر اساس تحلیل فراوانی باکتریها، الگوی تنوع زیستی و مطالعات فیلوژنتیک ارزیابی گردید. الگوی تنوع زیستی باکتریها مبتنی بر آنالیز ژن 16S rRNA با استفاده از روشPCR-RFLP انجام شد. الگوی تجمیعی تنوع زیستی باکتریها در نمونه روده میگو بیانگر حضور غالب جنس های *Vibrio*، *Bacillus* و *Photobacterium* با بترتیب ۳۳/۳۸ ، ۱۱/۵۹ و ۷/۸ درصد بود. در حالیکه در آب استخر جنس های *Vibrio*، *Marinomonas* و *Photobacterium* با بترتیب ۲۸/۵۹ ،۱۹/۹۶ و ۱۰/۷۹ درصد تنوع غالب را تشکیل دادند. همچنین این الگو در رسوبات فراوانی غالب جنس های *Bacillus*، *Vibrio* و *Streptomyces* به میزان بترتیب ۲۵/۱۶، ۱۶/۱۹ و ۱۵درصد را نشان داد. ارتباط تکاملی نزدیک سویه های جداشده از برخی استخرها با سویه های بیماریزا با استفاده از آنالیز فیلوژنتیک بیانگر ریسک بالا و وضعیت دیسبیوز در استخر و در نتیجه حذف آن استخر از برنامه جداسازی پروبیوتیک گردید. نتیجه غربالگری‌های متابولیک و ژنتیک ۳۰۰ سویه متمایز از میان ۱۸۰۰ جدایه بدست آمده نشان داد ۵۵ سویه دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل ٤ گونه باکتری و ۲ گونه قارچ بیماریزا بودند. فعالیت ضد باکتری سویه‌ها در محدوده MIC µg/ml ۱۹ تا ٦۲۵ و فعالیت ضد قارچی آنها در محدودهMFC µg/ml ۷۸ تا۱۲۵۰ متغیر بود. غربالگری ژنتیکی مسیرهای بیوسنتز ترکیبات ضد میکروبی نشان داد ۲۲ سویه واجد ژن PKS-1 ، ۱۹ سویه واجد ژن PKS-2 و ۲۳ سویه واجد ژن NRPS بودند. سنجش توانمندی سویه‌ها درمهار رادیکالهای آزاد DPPH نشان داد ۴۵ سویه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی در محدوده µg/ml ۱۸/۵۳ تا ۸۳۰/۱ متغیر بودند. غربالگری فعالیت آنزیمی سویه‌ها منتج به شناسایی ۳٦ سویه معادل ۱۱/٦۱ درصد کل سویه ها مولد آنزیم آمیلاز گردید. غربالگری ژن های مولد آمیلاز نشان داد بترتیب ۱۹، ۱۷، ۳ و ۲ سویه واجد ژنهای amyA، amyP، amy 63 و amySTU بودند. همچنین ۳۵ سویه معادل ۱۱/۲۹ درصد سویه های مورد بررسی مولد پروتئاز بودند. حضور ژنهای مولد پروتئاز aprE و sprA بترتیب در ۱۳ و ۲ سویه ردیابی شدند. غربالگری فعالیت آنزیم لیپاز نشان داد ۱۸ سویه معادل ۵/۸۰ درصد مولد این آنزیم بودند. در نتیجه غربالگری های متابولیک ۳۵ سویه توانمند انتخاب و ایمنی زیستی آنها در مقابل طیفی از ارگانیسم های جانوری و گیاهی مرتبط با اکوسیستم آبزی پروری و رده سلولی طبیعی انسان ارزیابی گردید. همچنین توانایی همولیز، تولید لسیتیناز و حضور ژنهای

شاخص بیماریزایی در این سویه ها بررسی شد. نتایج ارزیابی مرحله ای ایمنی زیستی منجر به حذف ٤ سویه بدلیل سمیت در مقابل آرتمیا، ۳ سویه بدلیل سمیت در مقابل میکروجلبک های مفید، ۷ سویه بدلیل سمیت بر لارو میگو، ٦ سویه بدلیل سمیت علیه سلول بندناف انسان، ۲ سویه بدلیل تولید لسیتیناز و ۱ سویه بدلیل وجود ژنهای بیماریزایی گردید. در مرحله بعدی این پروژه مطالعات دینامیک جمعیت ۱۲ سویه توانمند باقیمانده نشان داد ۹ سویه دارای روابط سینرژیستی متقابل بودند و ۳ سویه بدلیل تولید ترکیبات ضد میکروبی وسیع الطیف، حساسیت به فعالیت سایر سویه ها و فقدان میانکنش از طراحی فرمولاسیون کنسرسیوم حذف شدند. رابطه سینرژیستی متقابل ۹ سویه توانمند بر کینتیک رشد یکدیگر در محیط مایع تایید شد. همچنین میانکنش سینرژیستی متابولیت های تولید شده توسط سویه های توانمند در افزایش فعالیت های ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی ثبت شد. نتایج سنجش میزان سیدروفور و قابلیت جذب آهن این سویه ها نشان داد واحد تولید سیدروفور از ۵۱ درصد توسط سویه NT 12 تا ۸۷/۳۳ درصد توسط سویه B 1083 متغیر بود. سویه‌های مذکور قادر به تحمل و بازماندگی بیش از ۵۰ درصد در غلظت های ۱ تا ۴ درصد نمک های صفراوی و pH های ۲ تا ۵ بودند. متابولیت های استخراج شده از این سویه ها با استفاده از روش های کروماتوگرافی لایه نازک، ستونی، مایع با کارایی بالا (HPLC) خالص سازی شدند. غربالگری شیمیایی بیانگر ماهیت پلی کتایدی متابولیت های فعال سویه های NT 8، H 303، H 386 و NT 12، ماهیت فنولی متابولیت های فعال سویه های NT 107 وB 1083، ماهیت پپتیدی متابولیت های فعال سویه های NT 73، H 331 و NT 72 و ماهیت ماکرولیدی متابولیت های فعال سویه ST 85 بود. تعیین ساختار ترکیب فعال سویه ST85 بر اساس نتایج مطالعات اسپکتروسکوپی نشان داد این ترکیب یک ماکرولید نیتروژن دار با جرم ملکولی ۴۸۹ گرم بر مول بود. بر اساس جمع بندی توانمندی های متابولیک، ویژگیهای ژنتیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بدست آمده از ۹ سویه پروبیوتیک ۸ فرمولاسیون مختلف کنسرسیوم طراحی شد. این فرمولاسیون با بکارگیری سویه های *B. velezensis* strain NT 8، *B. subtilis* strain NT 73، *B. safensis* strain H 303، *B. velezensis* strain H 331 به عنوان هسته کنسرسیوم و آرایه های مختلف *Alteromonas macleodii* strain ST 85، *Pseudomonas stutzeri* strain NT 10، *Psychrobacter celer* strain NT 72، *Aeromonas media* strain B 1083 و *Virgibacillus salarius* strain NT 12 طراحی شدند. ارزیابی تاثیر فرمولاسیون های کنسرسیوم تولید شده بر الگوی تنوع زیستی باکتریهای روده میگو با استفاده از روش PCR-RFLP نشان داد فرمولاسیون های ۳، ٤ و ٥ بیشترین تاثیر را در کاهش فراوانی باکتریهای بیماریزای فرصت طلب بویژه *Vibrio* را در میکروبیوتای روده میگو نشان دادند. فرمولاسیون

های طراحی شده جهت ادامه مطالعات درون تنی در ٤ پروژه دیگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. در یک پروژه اثرات بازدارنده ۸ فرمولاسیون مختلف از کنسرسیوم پروبیوتیک مرکب از ۶ تیمار تجویز شده از طریق جیره غذایی و ۲ تیمار تجویز شده از طریق آب با روش سنجش مرگ و میر تجمعی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد فرمولاسیون های شماره ٥ و ٤ در مواجهه با باکتریهای بیماریزای *V. harveyi* بترتیب با میانگین ۵۳/۳۳ و ۵۱/٦۷ درصد و در مواجهه با *V. parahaemolyticus* بترتیب ۴۸/۳۳ و ۴۰ درصد نسبت به تیمار کنترل بقاء لاروهای مورد آزمون را افزایش دادند. فرمولاسیون های ۵ و ۴ همچنین در مواجهه با قارچ *Fusarium oxysporum* بترتیب به میزان ۵۱/۶۶ و ۴۳/۳۳ درصد و در مقابل قارچ *Lagenidium* sp. بترتیب ۵۸/۳۳ و ۴۸/۳۳ درصدبقاء لاروهای میگو را افزایش دادند. در مجموع فرمولاسیون های ۵ مشتمل بر هسته باسیلوسی فوق الذکر بعلاوه سویه های NT 12 و ST 85 بیشترین عملکرد را در کاهش تلفات لارو میگوی وانامی نشان داد. نتایج پروژه درون تنی بعدی نشان داد میزان گلوکز در همولنف به جز در تیمار ۸ روندی کاهشی داشت به طوری‌که در تیمارهای ۴ و ۵ کمترین میزان گلوکز مشاهده شد (P<۰/۰۵). میزان تری گلیسیرید همولنف در تیمارهای ۳، ۴، ۵، ۷ و ۸ کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان کلسترول همولنف در تیمارهای ۴ تا ۸، نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین همولنف و تعداد سلول‌های ترشحی هپاتوپانکراس میان تیمارها مشاهده نشد (P > 0/05). تیمار ۵ کمترین میزان آلبومین همولنف را در مقایسه با سایر تیمارها داشت. به‌علاوه، میزان آلبومین در تیمارهای ۴، ۷ و ۸ کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P < 0/05). تعداد کل هموسیت‌ها و سلول‌های گرانولار بزرگ در تیمارهای ۲ تا ۶ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P < 0/05). به‌علاوه بیشترین میزان سلول‌های هیالینی و نیمه گرانولار در تیمار ۴ مشاهده شد (P < 0/05). افزایش معنی‌دار در بیان ژن لیزوزیم در تمام تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد وجود داشت (P < 0/001). همچنین افزایش معنی‌دار در بیان ژن کراستین در تیمارهای ۲، ۳، ۵، ۷ و ۸ مشاهده شد (P < 0/001). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تغذیه با کنسرسیوم پروبیوتیک تیمارهای ۵ و ۶ (حاوی هسته باسیلوسی و سویه های **1083** B و **107** NT) شاخص‌های ایمنی و غذایی سنجش شده را بهبود داد. نتایج سومین پروژه درون تنی نشان داد غلظت آمونیاک، نیتریت و نیترات در آب مخازن دریافت کننده پروبیوتیک بویژه تیمارها ۷و ۸ کاهش معناداری نسبت به تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵)، درصورتی که غلظت فسفات تغییر معناداری نشان نداد(P>۰/۰۵). میزان تجمع مواد دفعی تیمارهای ۲ ،۴ ،۵ و ۸ نسبت به شاهد کمتر بود(P<۰/۰۵). میانگین فراوانی باکتریهای هتروتروف در آب

مخازن دریافت کننده پروبیوتیک در محدوده $13/1 \times 10^5$ CFU/ml در تیمار ۱ تا $7/46 \times 10^5$ CFU/ml در تیمار ۸ متغیر بود. میزان فراوانی باکتریهای جنس ویبریو در تیمارهای مختلف از ۳۸ درصد در تیمار شاهد تا ۱۵ درصد در تیمار۵ ؛کاهش یافت. در مجموع کنسرسیوم پروبیوتیک شماره ۸ متشکل از هسته باسیلوسی و سویه های *Vir. salarius* . NT 12 و *Ps. celer* . NT 72 عملکرد مناسبی در بهبود کیفیت آب، کاهش میزان مواد ته نشین شده و اصلاح فلور میکروبی آب مخازن نشان داد. نتایج پروژه چهارم از مطالعات درون تنی نشان داد میانگین وزن میگو در روز ۱۵ پس از ذخیره سازی و پایان دوره آزمایش در تیمارهای ۲ و ۵ به ترتیب ۴/۸۸ و ۴/۸۷ گرم نسبت به سایر تیمارها و شاهد (۴/۲۷ گرم) اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). همچنین میانگین طول نهایی میگو وانامی در تیمار ۵ (۹/۳۲ سانتی‌متر) نسبت به سایر تیمارها و شاهد (۸/۵۴ سانتی‌متر) اختلاف معنی‌دار داشت ($p<0/05$). نتایج درصد بازماندگی میگوی وانامی نشان داد در تیمارهای ۲، ۵ و ۷ به ترتیب برابر با ۷۱، ۶۷ و ۶۹ درصد نسبت به سایر تیمارها و شاهد (٪۶۴) اختلاف معنی‌دار داشت ($p<0/05$). همچنین ضریب تبدیل غذایی (FCR) طی دوره پرورش میگو در تیمار تغذیه شده با فرمولاسیون کنسرسیوم پروبیوتیک ۳ معادل ۰/۹ به میزان ۰/۲ نسبت به تیمار شاهد معادل۱/۱۰ بصورت معنی داری کاهش یافت($p<0/05$) . دستاورد این طرح منجر به تدوین دانش فنی طراحی و فرمولاسیون های مختلف کنسرسیوم پروبیوتیک گردید. چهار فراورده با فرمولاسیون های اختصاصی برای تقویت سیستم ایمنی میگو، بازدارندگی در مقابل عوامل شاخص بیماریزا، ارتقاء رشد و بازماندگی و کاهش FCR و بهبود کیفیت آب و رسوبات استخرهای پرورش میگو طراحی شد.

کلمات کلیدی: کنسرسیوم میکروبی، پروبیوتیک، میگوی سفید غربی، بیماری، سیستم ایمنی، کیفیت آب، رشد و بازماندگی