

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

عنوان:

**طراحی و ارزیابی پتانسیل کنسرسیوم
میکروارگانسیم‌های بومی پروبیوتیک جهت استفاده در
تکثیر و پرورش میگوی سفید غربی**

مجری:

محسن گذری

شماره ثبت

۶۴۸۲۷

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

عنوان طرح/ پروژه: طراحی و ارزیابی پتانسیل کنسرسیون میکروارگانیسم‌های بومی پروبیوتیک جهت استفاده در

تکثیر و پرورش میگوی سفید غربی

کد مصوب: ۲۴-۷۵-۱۲-۰۰۲-۹۹۰۲۶۳

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: محسن گذری

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری: محسن گذری

نام و نام خانوادگی همکار(ان): مریم میربخش، بابک فاندنیا، محمدصدیق مرتضوی، سیده لیلی محبی نوذر،

محمود حافظیه، سعید تمدنی جهرمی، سجاد پورمظفر، محمدگریج، امیر رضا جاسبی، رامین کریم زاده،

محمدرضا زاهدی، کیومرث روحانی قادیکلای، ذبیح اله بهمنی، هادی کوهکن، مریم معزی، حجت‌اله فروغی فرد،

الهه عباسی، محمد شاهی، جواد دهقانی سراجی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): علیرضا شناور ماسوله

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان هرمزگان

تاریخ شروع: ۱۳۹۹/۴/۱

مدت اجرا: ۲ سال و ۸ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۲

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: طراحی و ارزیابی پتانسیل کنسرسيوم میکروارگانيسم‌های
بومی پروبیوتیک جهت استفاده در تکثیر و پرورش میگوی سفید
غربی

کد مصوب: ۲۴-۷۵-۱۲-۰۰۲-۹۹۰۲۶۳

شماره ثبت (فروست): ۶۴۸۲۷ تاریخ: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶

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

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در

تاریخ ۱۴۰۲/۱۱/۱ مورد ارزیابی و بارتبه 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.

صفحه	«فهرست مندرجات»	عنوان
۱	چکیده
۲	۱-مقدمه
۳	۱-۱- ضرورت توسعه پایدار و دانش بنیان صنعت آبرزی پروری
۴	۱-۲- جایگاه سیستم های میکروب بنیان در توسعه آبرزی پروری
۴	۱-۳- بیماریها به عنوان چالش اصلی صنعت پرورش میگو
۴	۱-۴- نقش فناوری پروبیوتیک در صنعت پرورش میگو
۵	۱-۵- مکانیسم عملکرد پروبیوتیک ها
۷	۱-۶- میکروبیوم روده میگو
۸	۱-۶-۱- تنوع زیستی میکروبیوم روده آبریان
۸	۱-۶-۲- نقش میکروبیوم در پاسخ ایمنی
۸	۱-۶-۳- عوامل موثر بر میکروبیوم روده میگو
۹	۱-۷- ملاحظات و تهدیدات استفاده از فراورده های پروبیوتیک غیر بومی
۱۰	۱-۸- کنسرسیوم میکروارگانیسم های پروبیوتیک
۱۱	۱-۸-۱- استفاده از کنسرسیوم میکروارگانیسم ها در صنایع مختلف
۱۱	۱-۸-۲- چشم انداز استفاده از کنسرسیوم میکروارگانیسم های پروبیوتیک در آبرزی پروری
۱۲	۱-۹- اهداف پروژه
۱۳	۲- مروری بر منابع
۱۹	۳- مواد و روش ها
۱۹	۳-۱- تجهیزات و مواد غیر مصرفی
۲۰	۳-۲- مواد مصرف شدنی
۲۱	۳-۲- روش ها
۲۱	۳-۲-۱- انتخاب سایت های نمونه برداری
۲۵	۳-۲-۲- نمونه برداری
۲۸	۳-۲-۳- جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم ها
۲۹	۳-۲-۴- شناسایی جدایه ها
۲۹	۳-۲-۴-۱- شناسایی اولیه جدایه ها

- ۳-۲-۴-۲-۳ شناسایی ژنتیک جدایه ها ۳۰
- ۳-۲-۵-۲-۳ غربالگری توانمندی متابولیک میکروارگانیسم های جداسازی شده ۳۲
- ۳-۲-۵-۱-۳ غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی ۳۲
- ۳-۲-۵-۲-۳ غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی در سطح ژنوتیپی ۳۳
- ۳-۲-۵-۲-۳ غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد آنزیم های هدف ۳۳
- ۳-۲-۵-۳-۳ غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات آنتی اکسیدانت ۳۵
- ۳-۲-۶-۳-۳ ارزیابی ایمنی زیستی ۳۶
- ۳-۲-۶-۱-۳ غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات توکسیک ۳۶
- ۳-۲-۶-۲-۳ سنجش سمیت متابولیت های استخراج شده در مقابل لارو میگو ۳۷
- ۳-۲-۶-۳-۳ سنجش سمیت متابولیت های استخراج شده در مقابل جلبک های مفید ۳۷
- ۳-۲-۶-۴-۳ سنجش سمیت متابولیت های استخراج شده در مقابل سلولهای انسانی ۳۸
- ۳-۲-۶-۵-۳ بررسی فعالیت های همولیزیس و لسیتناز در سویه های منتخب ۳۹
- ۳-۲-۷-۷-۳ شناسایی ویژگیهای فنوتیپی باکتریهای توانمند منتخب ۴۰
- ۳-۲-۷-۱-۳ شناسایی بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک ۴۰
- ۳-۲-۷-۳-۳ شناسایی بر اساس ویژگیهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ۴۰
- ۳-۲-۸-۸-۳ ارزیابی دینامیک جمعیت گونه های دارای مشارکت در کنسرسیوم پروبیوتیک ۴۱
- ۳-۲-۸-۱-۳ بررسی تاثیرات متقابل سویه های مشارکت کننده در کنسرسیوم پروبیوتیک ۴۱
- ۳-۲-۸-۲-۳ بررسی تحمل سویه های مشارکت کننده در کنسرسیوم میکروبی به اسید ها و نمک های صفرآوری ۴۲
- ۳-۲-۸-۳-۳ بررسی رقابت سویه های مشارکت کننده در کنسرسیوم پروبیوتیک در جذب آهن ۴۳
- ۳-۲-۹-۹-۳ شناسایی متابولیت های ثانویه موثر در میانکنش های شناسایی شده در کنسرسیوم پروبیوتیک ۴۳
- ۳-۲-۹-۱-۳ تولید و استخراج متابولیت های ثانویه ۴۳
- ۳-۲-۹-۲-۳ خالص سازی متابولیت های تولید شده توسط سویه های توانمند ۴۴
- ۳-۲-۹-۳-۳ تعیین ساختار شیمیایی متابولیت های ثانویه فعال ۴۷
- ۳-۲-۱۰-۱۰-۳ ارزیابی تنوع زیستی میکروفلور طبیعی روده میگو بعد از تیمار با کنسرسیوم میکروبی ۴۸
- ۳-۲-۱۰-۱-۳ تهیه میگو و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی ۴۸
- ۳-۲-۱۰-۲-۳ تهیه غذا، فرموله کردن با کنسرسیوم پروبیوتیک و غذادهی ۴۹
- ۳-۲-۱۰-۳-۳ سنجش فراوانی، شناسایی و تعیین الگوی تنوع زیستی باکتریهای موجود در روده میگو ۵۱

- ۳-۲-۱۱- روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها.....۵۱
- ۴- نتایج.....۵۲
- ۴-۱- ترکیب جوامع میکروبی در نمونه های محیطی و میکروبیوم روده میگو.....۵۲
- ۴-۱-۱- جداسازی و شمارش باکتریها در نمونه های محیطی و میکروبیوم روده میگو.....۵۲
- ۴-۱-۱-۱- جداسازی و شمارش میکروارگانیسم ها در نمونه های آب استخر.....۵۲
- ۴-۱-۱-۲- جداسازی و شمارش میکروارگانیسم ها در نمونه های رسوبات استخر.....۵۳
- ۴-۱-۱-۳- جداسازی و شمارش میکروارگانیسم ها در نمونه های روده میگو.....۵۳
- ۴-۱-۲- تنوع زیستی باکتریهای جداسازی شده از نمونه های محیطی و سیستم گوارش میگو.....۵۴
- ۴-۱-۲-۱- تنوع زیستی میکروارگانیسم های جداسازی شده از نمونه های آب.....۵۵
- ۴-۱-۲-۱- تنوع زیستی میکروارگانیسم های موجود در نمونه های رسوب.....۵۵
- ۴-۱-۲-۳- تنوع زیستی جدایه های بدست آمده از نمونه های روده میگو.....۵۶
- ۴-۱-۳- آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از نمونه های محیطی و روده میگو.....۵۷
- ۴-۱-۳-۱- آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از نمونه های آب استخر.....۵۷
- ۴-۱-۳-۲- آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از نمونه های رسوب.....۵۸
- ۴-۱-۳-۳- آنالیز فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده از روده میگو.....۵۹
- ۴-۲- غربالگری توانمندی متابولیک میکروارگانیسم های جداسازی شده.....۶۰
- ۴-۲-۱- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی.....۶۱
- ۴-۲-۱-۱- نتایج غربالگری فعالیت ضد میکروبی باکتریهای جداسازی شده در سطح فنوتیپی.....۶۱
- ۴-۲-۱-۲- نتایج سنجش کمی فعالیت ضد میکروبی باکتریهای جداسازی شده.....۶۳
- ۴-۲-۱-۲- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی در سطح ژنتیکی.....۶۶
- ۴-۲-۳- غربالگری و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی میکروارگانیسم های جداسازی شده.....۶۸
- ۴-۳-۳- غربالگری فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم های جداسازی شده.....۷۰
- ۴-۳-۳-۱- غربالگری فعالیت آنزیم آمیلاز در باکتریهای جداسازی شده.....۷۰
- ۴-۳-۳-۲- غربالگری فعالیت آنزیم پروتاز در باکتریهای جداسازی شده.....۷۴
- ۴-۳-۳-۳- غربالگری فعالیت آنزیم لیپاز در باکتریهای جداسازی شده.....۷۶
- ۴-۴- ارزیابی ایمنی زیستی میکروارگانیسم های دارای توانمندی متابولیک.....۷۸
- ۴-۴-۱- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات سمی در سطح فنوتیپی.....۷۸
- ۴-۴-۱-۱- ارزیابی سمیت باکتریهای توانمند در مقابل *Artemia salina*.....۷۸

- ۸۰-۴-۲-۴- ارزیابی سمیت میکروارگانیزم های توانمند در مقابل جلبک های مفید.....
- ۸۲-۴-۳-۴- ارزیابی سمیت میکروارگانیزم های توانمند در مقابل لارو میگو.....
- ۸۴-۴-۴-۴- ارزیابی سمیت متابولیت های سویه های توانمند در مقابل رده سلولی نرمال انسانی.....
- ۸۵-۴-۵-۴- ارزیابی فعالیت های همولیزیس و لسیتناز در سویه های توانمند.....
- ۸۷-۴-۶-۴- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات سمی در سطح ژنوتیپی.....
- ۸۸-۴-۵-۵- ارزیابی دینامیک جمعیت و میانکنش های سویه های توانمند.....
- ۸۸-۴-۱-۵-۵- بررسی تاثیرات متقابل سویه های مشارکت کننده در کنسرسیوم پروبیوتیک.....
- ۸۸-۴-۱-۱-۵-۴- ارزیابی میانکنش های متقابل سویه های توانمند در محیط جامد.....
- ۹۰-۴-۱-۵-۲- ارزیابی تاثیر میانکنش های متقابل سویه های پروبیوتیک بر کینتیک رشد.....
- ۱۱۴-۴-۱-۳-۵-۴- ارزیابی تاثیر میانکنش متابولیت های تولید شده بر فعالیت ضد میکروبی.....
- ۱۱۵-۴-۱-۴-۵-۴- ارزیابی تاثیر میانکنش متابولیت های تولید شده بر فعالیت آنتی اکسیدانی.....
- ۱۱۶-۴-۱-۴-۵-۴- توانایی سویه های تشکیل دهنده کنسرسیوم در جذب آهن.....
- ۱۲۵-۴-۱-۵-۵- تحمل سویه های موجود در کنسرسیوم به اسید ها و نمک های صفراوی.....
- ۱۲۶-۴-۱-۶-۵-۴- خالص سازی و شناسایی متابولیت های ثانویه موثر در کنسرسیوم پروبیوتیک.....
- ۱۴۶-۴-۶-۶- تعیین ویژگیهای فنوتیپی سویه های موجود در کنسرسیوم پروبیوتیک.....
- ۱۴۸-۴-۷-۴- طراحی کنسرسیوم بر اساس توانمندی های میکروارگانیزم های پروبیوتیک.....
- ۱۵۰-۴-۸-۸- ارزیابی تغییرات تنوع زیستی میکروفلور طبیعی روده میگو بعد از تیمار با کنسرسیوم میکروبی.....
- ۱۵۰-۴-۱-۸-۱-۴- سنجش فراوانی باکتریها در روده میگو پس از تیمار با کنسرسیوم میکروبی.....
- ۱۵۱-۴-۲-۸-۲- ارزیابی تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر الگوی تنوع زیستی باکتریهای روده میگو.....
- ۱۵۳-۵- بحث.....
- ۱۵۳-۵-۱- تحلیل سلامت و توانمندی اکوسیستم بر اساس ترکیب جوامع باکتریایی.....
- ۱۵۷-۵-۲- ارزیابی توانمندی های متابولیک باکتریهای جداسازی شده.....
- ۱۵۸-۵-۱-۲- غربالگری وجود مسیرهای بیوشیمیایی مولد ترکیبات ضد میکروبی.....
- ۱۶۰-۵-۲-۲- غربالگری و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی باکتری های جداسازی شده.....
- ۱۶۲-۵-۳-۲- غربالگری فعالیت آنزیمی باکتری های جداسازی شده.....
- ۱۶۵-۵-۳- توانایی سویه های تشکیل دهنده کنسرسیوم در جذب آهن.....
- ۱۶۶-۵-۴- تحمل سویه های موجود در کنسرسیوم به اسید ها و نمک های صفراوی.....
- ۱۶۶-۵-۵- طراحی کنسرسیوم بر اساس توانمندی های میکروارگانیزم های پروبیوتیک.....

۱۸۹	۵-۶- ارزیابی تاثیر کنسرسیوم پروبیوتیک بر تنوع فلور میکروبی روده
۱۹۳	۶- نتیجه گیری
۱۹۴	پیشنهادها
۱۹۶	منابع
۲۰۸	چکیده انگلیسی

چکیده

با توجه به توسعه صنعت پرورش میگو در کشور و رویکرد این صنعت به سوی پرورش متراکم بکارگیری استراتژی‌های جدید از قبیل محصولات پروبیوتیک نقشی کلیدی در برقراری تعادل و پایداری تولید در اکوسیستم آبی پروری ایفا می‌نمایند. هدف از اجرای این پروژه طراحی کنسرسیومی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک دارای ویژگی‌های شاخص یک محصول پروبیوتیک بود. بدین منظور نمونه برداری و جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی از ۱۰ سایت تکثیر و پرورش میگو در سراسر استان هرمزگان انجام شد. حدود ۱۸۰۰ جدایه میکروبی از نمونه‌های روده میگو، آب و رسوبات جداسازی گردید. الگوی تنوع زیستی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های مختلف بیانگر تفاوت معنادار در ترکیب جمعیتی میکروارگانیسم‌ها بود. فراوانی غالب میکروارگانیسم‌ها در نمونه روده میگو مربوط به جنس‌های *Bacillus*، *Vibrio* و *Photobacterium* با بترتیب ۲۸/۸۹، ۱۳/۳۳ و ۱۰/۵۶ درصد بود. نتایج غربالگری مرحله‌ای میکروارگانیسم‌های جداسازی شده نشان داد بترتیب ۵۵، ۴۸، ۳۸، ۳۵ و ۲۵ جدایه میکروبی مولد ترکیبات ضد میکروبی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانت، آنزیم‌های آمبلاز، پروتاز و لیپاز بودند. ارزیابی ایمنی زیستی ۳۵ جدایه توانمند منتخب نشان داد بترتیب ۴، ۳، ۷ و ۶ دارای اثر کشندگی در مقابل آرتمیا، جلبک‌های مفید، لارو میگو و سلول‌های طبیعی انسانی بودند. همچنین ۳ جدایه مولد آنزیم لسیتیناز بوده لیکن واکنش همولیز در هیچکدام از جدایه‌ها مشاهده نشد. پس از حذف جدایه‌های غیر ایمن، مطالعات دینامیک جمعیت ۲۰ جدایه توانمند و ایمن نشان داد ۵ جدایه در کشت همزمان با تولید ترکیبات ضد میکروبی وسیع الطیف دارای روابط آنتاگونیستی با دیگر جدایه‌های مورد بررسی بودند. ارزیابی میانکنش‌های سینرژیستی سایر جدایه‌های توانمند نشان داد اثرات ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده از ۸ جدایه با انجام تیمارهای ترکیبی افزایش معناداری فعالیت ضد میکروبی نشان داد. همچنین افزودن مایع تخمیری ۶ جدایه منجر به افزایش رشد ۸ جدایه باکتریایی و ۱ جدایه مخمیری در محیط کشت مایع گردید. نتایج شناسایی متابولیت‌های تولید شده در میانکشت‌های بین اجزای کنسرسیوم بیانگر حضور ترکیبات فعال حاوی طیفی از گروه‌های ماکرولیدی، فنولی و پلی‌کتیدی بود. نتایج بدست آمده امکان فرمولاسیون فراورده‌ای حاوی کنسرسیوم میکروارگانیسم‌های بومی پروبیوتیک جهت ادامه مطالعات حیوانی را فراهم نمود.

کلمات کلیدی: کنسرسیوم میکروبی، پروبیوتیک، میگوی پرورشی، فعالیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانت، آنزیم‌های هضم‌کننده، ایمنی زیستی