شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
صفحات ۹۶-۸۵

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیای* جدا شده از شقایق دریایی (*Stichodactyla haddoni*) علیه *آئروموناس هیدروفیلا*

ندا فاضلی[۱]، اکرم سادات نعیمی[۲*]، سید امیرحسین جلالی[۳]، حجت‌اله زمانی[۲]

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰

چکیده

آئروموناس هیدروفیلا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان است که سالانه خسارات زیادی به مزارع پرورش ماهی وارد می‌کند. توانایی *آئروموناس هیدروفیلا* در تشکیل بیوفیلم باعث شده که این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت‌تر شود. از این رو، یافتن مواد ضدمیکروبی جدید با پتانسیل مهار تشکیل بیوفیلم با ارزش خواهد بود. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی وضدبیوفیلی عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* همزیست با شقایق دریایی (*Stichodactyla haddoni*) علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در شرایط آزمایشگاهی و درون جانداری است. برای تعیین فعالیت ضدباکتریایی، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و حداقل غلظت مهار رشد (MIC) عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا*، از روش براث میکرودایلوشن استفاده شد. توانایی ضدبیوفیلمی عصاره مذکور در مهار تشکیل بیوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از رنگ‌آمیزی کریستال ویوله در پلیت ۹۶ خانه و از طریق سنجش حداقل غلظت مهارکنندگی بیوفیلم (MBIC) انجام شد. به منظور تعیین قابلیت عصاره مذکور در مهار عفونت *آئروموناس هیدروفیلا*، از آزمون مواجه تجربی ماهی زبرا با باکتری استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* از رشد سلول‌ها و تشکیل بیوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* درMIC=MBIC به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ممانعت کرد. همچنین، با استفاده از تیمار فیزیکی و شیمیایی نشان داده شد ترکیبات فعال عصاره مورد آزمون ماهیت پروتئینی دارند و عمدتا پروتئاز هستند. نتایج حاصل از مواجه نشان داد تجویز خوراکی عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* در دو دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث افزایش بقا و کاهش تجمع *آئروموناس هیدروفیلا* در روده ماهی زبرا (*Danio rerio*) طی ۷ روز شد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیای* جدا شده از شقایق دریایی حاوی ترکیبات فعال زیستی با توانایی ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* است و به دلیل سمیت کم آن در ماهی، در صورت خالص‌سازی، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری باشد.

واژگان کلیدی: شقایق دریایی، باکتری‌های همزیست، ضدباکتری، ضدبیوفیلم، *آئروموناس هیدروفیلا*، ماهی زبرا

* نویسنده مسئول: اکرم سادات نعیمی
Email: a_naeemi@guilan.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 1, Spring 2021
pp. 85-96

Antimicrobial activity of extract derived from *Pseudoalteromonas piscicida* isolated from sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) against *Aeromonas hydrophila*

Neda Fazeli[1], Akram Sadat Naeemi[2*], Seyed Amir Hossein Jalali[3] and Hojjatolah Zamani[2]

1. Ph.D student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 26-Oct-2020 **Accepted: 08-Feb-2021**

Abstract

Aeromonas hydrophila is one of the most important aquatic pathogens that cause fish losses and poor product quality in fish farms. The ability of *Aeromonas hydrophila* to form a biofilm makes this bacterium resistant to antibiotics. Hence, finding new antimicrobials with the potential to inhibit biofilm formation would be valuable. The aim of the present study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of the extract from *Pseudoalteromonas piscicida*, isolated from the sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) against *Aeromonas hydrophila*. The Microdilution broth method was used to determine the minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum inhibitory concentration (MIC) of *Pseudoalteromonas piscicida* extract. The anti-biofilm ability of this extract against formation of *Aeromonas hydrophila* biofilm was assessed using crystal violet staining method in 96-well plates. The results showed that the extract of *Pseudoalteromonas piscicida* inhibited the growth and biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* at MIC=MBIC= 200 mg/ml. In addition, using physical and chemical treatments, it was shown that the active compounds are mainly proteinous in nature and are proteases. The results from the experimental challenge of zebrafish (*Danio rerio*) with the pathogen demonstrated that oral administration of *Pseudoalteromonas piscicida* extract in two safe doses of 200 and 400 mg mL^{-1} increased survival rates of the fish and decreased colonization of *Aeromonas hydrophila* in their intestine within 7 days. The results of the present study showed that *Pseudoaltromonas picisidia* extract contains bioactive compounds with antibacterial and antibiofilm ability against *Aeromonas hydrophila* and due to its low toxicity in fish, if purified, it can be a good alternative to antibiotics.

Keywords: Sea anemone, Symbiotic bacteria, Antibacterial, Antibiofilm, *Aeromonas hydrophila*, Zebrafish.

Corresponding author: Akram sadat Naeemi Email: a_naeemi@guilan.ac.ir

۱. مقدمه

یکی از عوامل محدودکننده در توسعه آبزی‌پروری شیوع بیماری‌های عفونی با منشأ باکتریایی است (Gram *et al*., 2010). یکی از عوامل بیماری‌زا در آبزیان، باکتری *آئروموناس هیدروفیلاست*. این باکتری از خانواده آئروموناداسه،گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت، بدون اسپور و متحرک است و به‌طور وسیع در رسوبات، آب دریاچه‌ها و رودخانه‌ها یافت می‌شود. طبق گزارش‌های موجود، این باکتری در انواع ماهیان مانند کپور، مارماهی، شیرماهی، گربه‌ماهی، میگو، لابستر، تیلاپیا و قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهیان خاویاری باعث ظهور علایم بیماری و تلفات می‌شود. از علائم آلوده شدن آبزی به این باکتری ایجاد سپتی سمی هموراژیک، زخم، خونریزی و بیرون‌زدگی چشم‌ها است که نهایتاً منجر به مرگ آبزی می‌شود (Rasmussen-Ivey *et al*., 2016).

برای کنترل عفونت‌های باکتریایی در آبزیان رایج‌ترین راه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار است. متأسفانه استفاده بیش‌ازحد از این داروها

باعث بروز مشکلاتی نظیر پیدایش مقاومت دارویی شده است (Surette and Wright, 2017). مشکل بزرگ‌تر زمانی رخ می‌دهد که این باکتری‌ها روی سطوح مختلف بیوفیلم تشکیل می‌دهندکه آن‌ها را تا ۱۰۰۰ برابر نسبت به زمانی که بیوفیلم تشکیل نداده‌اند به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم تر می‌کند (Vasudevan, 2014). بنابراین پیشگیری از رشد و انتشار باکتری‌های بیماری‌زا با قابلیت تشکیل بیوفیلم می‌تواند منجر به کاهش اثرات زیان‌آور و هزینه‌های وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها شود (Kraemer *et al*., 2019).

استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی در آبزی‌پروری یکی از بهترین جایگزین‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌های تجاری است. تحقیقات جدید نشان داده است که ترکیبات فعال زیستی باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های همزیست با موجودات دریایی اثر ضدمیکروبی در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا دارند (Kraemer *et al*., 2019). برای مثال، باکتری‌های جدا شده از مرجان‌های دریایی (Nithyanand and Pandian, 2009; Shnit-Orland, and Kushmaro, 2009)، شقایق‌های دریایی (Williams *et al*., 2007; Leo´n-Palmero *et al*.,2018)، آبسنگ‌های مرجانی (Thenmozhi *et al*., 2009) حلزون دریایی (Böhringer *et al*., 2017) و اسفنج‌ها (Parimala *et al*. 2018) توانایی مهار رشد و تشکیل بیوفیلم را بر ضد انواع باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده‌اند. در این بین، سویه‌های *سودوآلتروموناس* همزیست با جانوران دریایی از شناخته شده ترین باکتری‌های دریایی هستند که به دلیل توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی متنوع و مهار باکتری‌های بیماری‌زای انسان، مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (Richards *et al*., 2017; Böhringer *et al*., 2017; Offret *et al*., 2016) با این وجود، تاکنون تحقیقی در رابطه با اثر عصاره آن‌ها بر عوامل بیماری‌زای آبزیان انجام نشده است. بنابراین، در مطالعه حاضر، اثر عصاره باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* جدا شده از شقایق دریایی (*Stichodactyla haddoni*) بر رشد و تشکیل بیوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* بررسی شد. سپس اثر درمانی عصاره باکتری مذکور بر ماهی زبرا (*Danio rerio*) در مواجهه با *آئروموناس هیدروفیلا* مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. باکتری جدا شده از شقایق دریایی، شرایط رشد و استخراج عصاره خام

در این تحقیق، فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* که قبلا از شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* جدا، شناسایی و در بانک ژن ثبت شده بود مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). برای استخراج عصاره باکتریایی از روش (Bakkiyara and Pandian, 2010) استفاده شد. بطور خلاصه، کشت تازه *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* به ارلن

محتوی محیط کشت مایع Marine broth (MB, Difco) تلقیح شد. ارلن‌های محتوی MB به مدت ۵ روز در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۸۰ انکوبه شدند. سپس محتوی ارلن سانتریفیوژ و مایع رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون و با استفاده از فریز درایر خشک شد. عصاره خشک شده باکتری مذکور (E53) تا انجام آزمون‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱-مشخصات باکتری *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* جدا شده از شقایق دریایی.

سویه باکتری	GenBank accession number	نام عصاره خام
سودوآلتروموناس پیسیسیدیا *Pseudoalteromonas piscicida*	MN563129	E53

۲.۲. ارزیابی اثر ضدمیکروبی E53

برای تعیین خاصیت ضدمیکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی E53، از روش براث میکرودایلوشن (Gudina *et al*., 2010) و پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* ATCC7966 (OD_{600nm}= ۰/۰۸) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت Muller Hinton broth (MHB, Merck) حاوی غلظت‌های مختلف E53 (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت MHB بدون عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. کمترین غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و کمترین غلظت کشندگی(MBC) بر اساس روش (Sindambiwe *et al*., 1999) تعیین گردید.

۳.۲. ارزیابی اثر ضدبیوفیلمی E53

خاصیت ضدبیوفیلمی E53 طبق روش Nostro *et al*. (2007) و با استفاده ازپلیت ۹۶ خانه انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر ازکشت شبانه و رقیق شده *آئروموناس هیدروفیلا* ($OD_{600\ nm}$= ۰/۰۵) و ۱۰۰ میکرولیتر E53 در غلظت‌های MIC و کمتر از MIC درون هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط ایستا قرار گرفتند. چاهک حاوی کلرامفنیکل به عنوان کنترل مثبت و چاهک حاوی محیط کشت بدون عصاره به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت هر چاهک با وارونه کردن پلیت خارج و بیوفیلم هر چاهک با استفاده از کریستال ویوله طبق روش (Thenmozhi *et al*.,2009) و همچنین فرمول زیر محاسبه شد:

((OD_{570nm} کنترل / [OD_{570nm} نمونه − OD_{570nm} کنترل]) ×۱۰۰

کمترین غلظتی از عصاره که بیش از ۸۰ درصد بیوفیلم را مهارکند، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی بیوفیلم (MBIC) در نظر گرفته شد (Muthamil and Pandia, 2016).

۴.۲. ارزیابی ماهیت ترکیبات فعال E53

ماهیت ترکیبات موثر E53 با استفاده از تیمار فیزیکی (حرارت) و شیمیایی (پروتئیناز K) طبق روش انجام شده توسط Papa *et al*.(2015) ارزیابی شد. برای ارزیابی فیزیکی، E53 به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت. برای ارزیابی شیمیایی، E53 با پروتئیناز K (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تیمار شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه‌هایی که در معرض گرما و پروتئیناز K قرار نگرفتند به عنوان شاهد استفاده شدند. پس از انجام هر تیمار، اثر ضدبیوفیلمی E53 با استفاده از

پلیت ۹۶ خانه و رنگ کریستال ویوله (همانطور که توضیح داده شد) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۵.۲. مواجهه با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

۱.۵.۲. شرایط نگهداری ماهی زبرا

ماهی زبرا سالم (*Danio rerio*)، با وزن متوسط ۰/۴ ± ۰/۲۶ گرم (میانگین ± انحراف معیار) خریداری و به آزمایشگاه حیوانات آبزی درپژوهشکده بیوتکنولوژی و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شد. ماهی‌ها به مدت دو هفته در مخزن‌های پلاستیکی نگهداری و با شرایط آزمایش سازگار شدند. تغذیه ماهی‌ها با غذای تجاری (شرکت فرادانه، اصفهان) به صورت دستی و دو بار در روز به میزان ۲ درصد از وزن بدن انجام شد. تعویض آب هر ۲ روز یکبار صورت گرفت. در طول دوره آزمایش دمای آب ۱/۱۰±۲۷/۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۷/۰±۰/۰۸، اکسیژن محلول ۱۱/۴۰±۳۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر، سختی ۱۱۸ و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی ثبت شد.

۲.۵.۲. تعیین دوزهای بی ضرر E53

۷۲ ماهی زبرا به طور تصادفی به چهار گروه در سه تکرار (شش ماهی در هر آکواریوم) تقسیم شدند. ۲۴ ساعت پس از آخرین غذادهی، ماهی‌ها با غوطه وری در عصاره گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شدند. سپس غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر E53 طبق روش Chereen *et al.* (2013) به دهان ماهی‌ها ریخته شد. برای اینکار، و برای جلوگیری از آلودگی عصاره و همچنین برداشت دقیق ۵ میکرولیترعصاره، از میکروتیوپ‌های ۲۰۰ میکرولیتری و سمپلر ۱۰میکرولیتر استفاده شد. ابتدا با استفاده از سمپلر ۱۰ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر از عصاره برداشته و در میکروتیوپ‌های ۲۰۰ میکرولیتری ریخته شد (در هر میکروتیوپ ۵ میکرولیتر). در هر بار استفاده از عصاره، با استفاده از سرسمپلر ۱۰ میکرولیتری متصل به سرنگ انسولین، عصاره از هر میکروتیوپ برداشته و به حلق ماهی چکانده شد. خوراندن عصاره به ماهی‌ها به مدت ۷ روز انجام شد. در این مدت تغییر در رفتار مانند تغییر در شنا یا اشتها، و میزان مرگ و میر ماهیان بطور روزانه ثبت شد. غلظت‌هایی از عصاره که تأثیر منفی بر رفتار و زنده مانی ماهی نداشتند به عنوان دوزهای بی خطر برای مراحل بعدی در نظر گرفته شدند.

۳.۵.۲. مواجهه (چالش با پاتوژن)

۲۴ ساعت قبل از شروع مواجهه، غذا دهی قطع شد. سپس ۷۲ ماهی به طور تصادفی به چهار گروه و سه تکرار تقسیم شدند (۶ ماهی در هر آکواریوم). گروه‌های آزمایشی به شرح زیر طراحی شدند: گروه ۱ (کنترل حلال) فقط سرم فیزیولوژی به مدت ۷ روز به ماهی‌ها خورانده شد، گروه ۲، به ماهی‌ها ۴ ساعت پس از دریافت پاتوژن به مدت ۷ روز به آنها عصاره (غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خورانده شد، گروه ۳ به ماهی‌ها ۴ ساعت پس از دریافت پاتوژن به مدت ۷ روز عصاره (غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خورانده شد وگروه ۴ (کنترل بیمار) ماهی‌ها روز اول پاتوژن دریافت کردند و به منظور یکسان‌سازی شرایط آزمایش، به آن‌ها ۷ روز سرم فیزیولوژی خورانده شد. در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ پاتوژن خورانده شده 6×10^{6} CFU mL^{-1} (LD_{50}) از کشت شبانه و به مقدار ۵ میکرولیتر بود. همچنین در تمام گروه‌ها عصاره/سرم فیزیولوژی خورانده شده به مقدار ۵ میکرولیتر و طبق پروتوکل ذکر شده صورت پذیرفت. ماهی‌های تحت تیمار قبل از هر بار تجویز با غوطه ور شدن در عصاره گل میخک بیهوش شدند. ماهی‌ها در هر چهار گروه آزمایشی دو بار در روز کنترل می‌شدند و میزان بقا و علائم بیماری روزانه ثبت می‌شد. ماهیان رو به مرگ از گروه کنترل آلوده به باکتری (گروه ۴) با دوز کشنده عصاره گل میخک (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشته شده و برای آنالیز روده استفاده شدند.

۴.۵.۲. تعیین تجمع *آئروموناس هیدروفیلا* در روده

در پایان دوره آزمایش، از هرآکواریوم ۲ ماهی بصورت

تصادفی انتخاب شد و نمونه‌برداری با رعایت شرایط استریل طبق روش Al-Harbi and Uddin (2004) انجام شد. برای کشت باکتری‌های *آئروموناس هیدروفیلا* روده از محیط کشت اختصاصی Aeromonas isolation agar (AIA, Sigma-Aldrich) استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گرماگزاری شدند. تعداد کلنی‌های رشد کرده روی هر پلیت به عنوان واحد تشکیل کلونی در هر نمونه Colony Forming (CFU) Unit شمارش شد (Mahious *et al*., 2006).

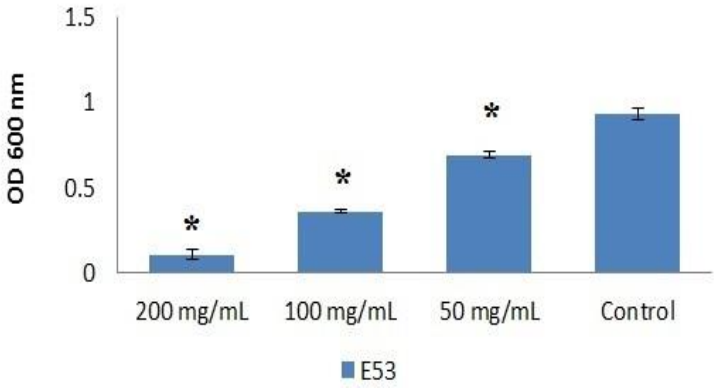
۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. تفاوت بین میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه ارزیابی شد. برای مقایسه گروه‌ها و شاهد از آزمون دانت استفاده شد. اختلاف میانگین‌ها در سطح $P < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها با SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شد و داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

۳. نتایج

۱.۳. اثر ضدباکتریایی E53

بررسی کدورت و شفافیت چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه نشان داد عصاره مورد آزمون به‌طور مؤثر از رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جلوگیری کرد. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون ضدمیکروبی، مقادیرMIC و MBC عصاره این باکتری‌ها به ترتیب ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۱).



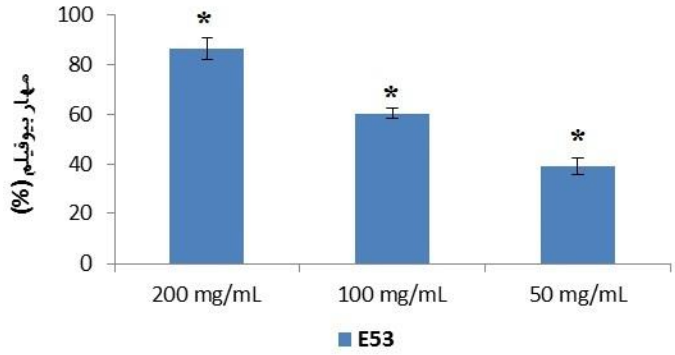
شکل۱-نمودار اثرضدباکتریایی عصاره *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* (E53) بر ضد *آئروموناس هیدروفیلا* در گروههای تیماری مختلف.

۲.۳. اثر ضدبیوفیلمی E53

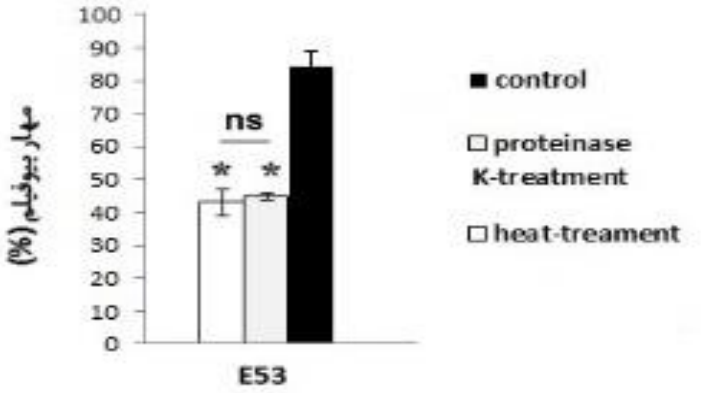
نتایج حاصل از آزمون ضدبیوفیلمی نشان داد که E53 قادر به مهار تشکیل بیوفیلم در *آئروموناس هیدروفیلا* بود. از آنجا که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار تشکیل بیوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* به میزان ۸۶ درصد بود، این غلظت به عنوان (MBIC) تعیین شد (شکل ۲). مهار بیوفیلم در هرسه غلظت عصاره بطور معناداری با یکدیگر و همچنین با نمونه کنترل تفاوت معنادار نشان داد ($P <۰/۰۵$).

۳.۳. ارزیابی ماهیت E53

نتایج نشان داد اثر ضدبیوفیلمیE53 پس از تیمار حرارتی و آنزیمی کاهش معنادار داشت ($P<0.05$). به عبارتی، این نتایج نشان داد ترکیبات فعال E53 ماهیت پروتئینی داشته و غالباً شامل پروتئازها و آنزیم‌های دخیل در مهار بیوفیلم بودند (شکل۳).



شکل۲-نمودار میزان مهار بیوفیلم *آئروموناس هیدروفیلا* توسط عصاره *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* (E53) در تیمارهای مختلف

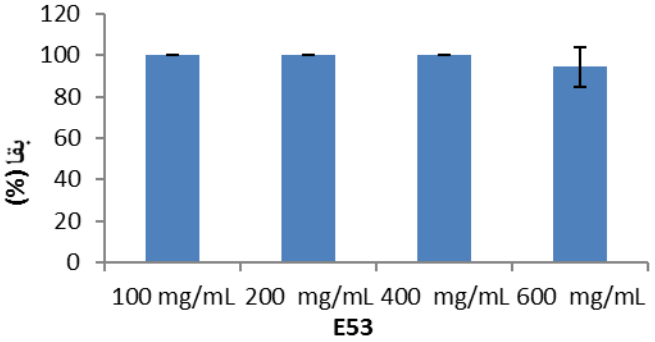


شکل۳- نمودار اثر تیمارهای حرارتی و آنزیمی بر فعالیت ضدبیوفیلمی E53
ns=not significantعدم وجود اختلاف معنادار، * = وجود اختلاف معنادر با کنترل

۴.۳. آزمون مواجهه

۱.۴.۳. تعیین دوزهای ایمن خوراکی E53

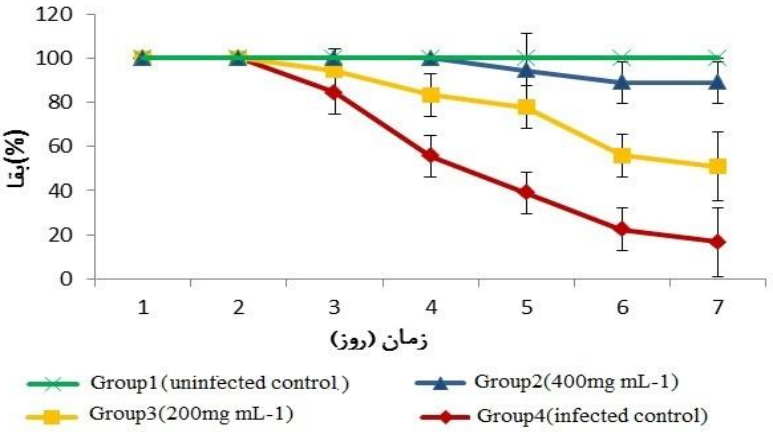
نتایج نشان داد گروهی که ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دریافت کرده بودند، نرخ زنده مانی ۹۴ درصد داشتند. در باقی گروه‌ها مرگ و میر و یا رفتار غیر عادی مشاهده نشد. بنابراین غلظت ۱۰۰،۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان غلظت‌های تحت کشنده درنظر گرفته شدند (شکل۴). دو دوز بالا و ایمن برای ماهی ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و برای آزمون مواجهه استفاده شد.



شکل۴-نمودار تعیین دوزهای خوراکی ایمن عصاره *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* (E53) در ماهی زبرا

۲.۴.۳. مواجهه با *آئروموناس هیدروفیلا*

نتایج حاصل از مواجهه نشان داد ماهیان گروه ۲ (تجویز ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) میزان زنده مانی۸۳ درصد بود (شکل ۵). گروه ۳ (تجویز ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره) زنده مانی ۵۱ درصد نشان دادند (شکل ۴). ماهیان در گروه ۱ (شاهد حلال) و گروه ۴ (شاهد بیمار) به ترتیب ۱۰۰ و ۱۶ درصد زنده مانی داشتند (شکل ۶). نتایج حاصل از آزمون دانت نشان داد گروه‌های آزمایشی به طور معناداری نرخ زنده مانی بیشتری نسبت به گروه ۴ داشتند ($P < ۰/۰۵$).



شکل۵-نمودار درصد زنده مانی ماهی زبرا در مواجهه با *آئروموناس هیدروفیلا* پس از ۷ روز مصرف E53.

شکل۶- (الف) ماهی زبرا آلوده شده به *آئروموناس هیدروفیلا* در مقایسه با (ب) ماهی زبرای سالم نوک پیکان خون‌مردگی و کبودی زیر پوستی را نشان می‌دهد.

۳.۴.۳. تجمع *آئروموناس هیدروفیلا* در روده

نتایج حاصل کشت میکروبی روده در جدول ۲ آورده شده است. این نتایج نشان داد در هر دو تیماری که ماهیان با دو دوز عصاره درمان شده بودند بار میکروبی *آئروموناس هیدروفیلا* روده به طور معناداری کاهش یافت ($P <۰/۰۵$).

جدول ۲- میزان تجمع (بار میکروبی) *آئرومونا‌س هیدروفیلا* در روده ماهی زبرا پس از مواجهه

	گروه ۴	گروه ۳	گروه ۲	گروه ۱
آئرومونا‌س هیدروفیلا (CFU)	$۱/۵\times۱۰^{۷}\pm۱۵۰۰^{a}$	$۸/۹\times۱۰^{۵}\pm۱۶۷^{b}$	$۲/۹\times۱۰^{۳}\pm۹۱^{b}$	–

حروف متفاوت هر سطر بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح پنج صدم است ($P<۰/۰۵$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق موجود نشان داد عصاره باکتری *سودوآلترومونا‌س پیسیسیدیا* جدا شده از شقایق دریایی فعالیت ضدباکتریایی بر ضد *آئرومونا‌س هیدروفیلا* داشت. از آنجا که سویه‌های جنس *سودوآلترومونا‌س* (۱۶ سویه از ۴۱ سویه) به عنوان تولیدکنندگان ترکیبات ضدمیکروبی مانند ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌کتیدها و پپتیدها شناخته شده‌اند (Offret *et al*., 2016; Böhringer *et al*., 2017)، نتیجه حاصل از تحقیق موجود قابل انتظار بود. همچنین، علاوه بر توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط گونه‌های این جنس، تولید وزیکول‌های حاوی آنزیم‌های هضم‌کننده که می‌توانند با نفوذ به دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زا باعث انهدام و مرگشان شوند نیز به اثبات رسیده است (Richards *et al*., 2017).

نتیجه دیگر این تحقیق، قابلیت ضدبیوفیلمی عصاره *سودوآلترومونا‌س پیسیسیدیا* برضد تشکیل بیوفیلم *آئرومونا‌س هیدروفیلا* بود. تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در چهار مرحله اصلی رخ می‌دهد: ۱- اتصال باکتری به یک سطح، ۲- رشد میکروکلنی، ۳- تکامل بیوفیلم و ۴- پراکندگی باکتری‌های بیوفیلم. همچنین، تکامل بیوفیلم به روابط پیچیده بین سلول‌ها و فاکتورهای متعددی از قبیل قابلیت چسبندگی به سطح، قابلیت تولید پروتئین‌های متصل به شبکه خارج سلولی و ارتباط بین‌سلولی (کروم سنسینگ) بستگی دارد (Raffa *et al*., 2005). بنابراین انتظار می‌رود عوامل ضدبیوفیلمی حداقل در یکی از این موارد تأثیر بگذارد. تاکنون عملکرد ترکیبات ضدبیوفیلمی مختلف را به قابلیت مهار رشد باکتری‌ها، اختلال در کروم سنسینگ، تغییر آبگریزی سطح سلول و همچنین تولید آنزیم‌های لیزکننده شبکه بیوفیلم نسبت داده‌اند (Thenmozhi *et al*., 200; Stewart, 2015). در مطالعه موجود، از آنجا که عصاره *سودوآلترومونا‌س پیسیسیدیا* فعالیت ضدباکتری برضد *آئرومونا‌س هیدروفیلا* داشت، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره مذکور حاوی ترکیباتی است که با جلوگیری از رشد *آئرومونا‌س هیدروفیلا* قادر به جلوگیری از تشکیل بیوفیلم این پاتوژن شده است. علاوه بر آن، کاهش معنادار خاصیت ضدبیوفیلمی E53 پس از اعمال تیمارهای حرارتی و آنزیمی مشاهده شد که بر اساس آن می‌توان نتیجه گرفت بخش عمده ترکیبات فعال عصاره، ماهیت پروتئینی دارند و پروتئاز هستند. بنابراین، احتمالا، پروتئازهای موجود در عصاره نقش کلیدی در لیزکردن پروتئین‌های شبکه بیوفیلم و متعاقبا مهار تشکیل بیوفیلم *آئرومونا‌س هیدروفیلا* ایفا کرده‌اند. مشابه با نتایج موجود، محققان پیشین وجود خاصیت پروتئازی در عصاره سویه‌های *سودوآلترومونا‌س پیسیسیدیا* را ثابت کرده‌اند (Richards *et al*., 2017).

یافته‌های موجود در این بررسی مطابق با مطالعات قبلی بود که در آن‌ها فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی *سودوآلترومونا‌س* و دیگر باکتری‌های همزیست دریایی مشاهده شده است. برای مثال، اثر ضدباکتریایی *سودوآلترومونا‌س*های جدا شده از حلزون دریایی بر ضد باکتری‌های بیماری‌زای انسان (Böhringer *et al*., 2017)، اثر ضدباکتریایی *سودوآلترومونا‌س*های جدا شده از شقایق دریایی بر ضد باکتری‌های بیماری‌زای انسان وآبزیان (Leo´n-Palmero *et al*., 2018)، اثر ضدمیکروبی *سودوآلترومونا‌س پیسیسیدیا* جداشده از آب دریا در از بین بردن *ویبریو پاراهمولیتیکوس* (Richards *et al*., 2017) گزارش شده است. همچنین، اثر ضدبیوفیلمی سویه‌های

جدا شده از مرجان بر ضد طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی مشاهده شده است (Papa *et al*., 2015; Bakkiyaraja and Pandian, 2010; Thenmozhi *et al*., 2009). علاوه بر این، هر دو خاصیت ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی (به واسطه وجود ترکیبات مختل‌کننده سیستم کروم سنسینگ) و آنزیم‌های هضم‌کننده شبکه بیوفیلمی در سویه‌های *سودوآلتروموناس* آزاد زی در آب دریا توسط Rypien *et al*. (2010) مشاهده شده است.

نتایج حاصل از مواجه با *آئروموناس هیدروفیلا* نشان داد که تجویز E۵۳ در ۲ دوز بی ضرر برای ماهی زبرا (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به طور قابل توجهی میزان بقای ماهی زبرای آلوده به *آئروموناس هیدروفیلا* را طی ۷ روز افزایش داد. این افزایش در میزان بقا با کاهش بار میکروبی باکتری مذکور در روده ماهی زبرا همسو بود. همچنین، نتایج موجود نشان داد که اثر E53 در دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ماهی زبرا نتایج بهتری نسبت به تجویز ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دنبال داشت. بطور کلی، نتیجه رضایت‌بخش تجویز E۵۳ را می‌توان به فعالیت ضدمیکروبی عصاره در کاهش بار میکروبی این باکتری در روده ماهی زبرا نسبت داد. در توافق با یافته‌های ما، اثر مثبت عصاره *باسیلوس* علیه *ویبریو کلرا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (Ravindran *et al*., 2016)، *باسیلوس* علیه *یرسینیا روکری* (Torabi *et al*., 2018)، *باسیلوس* علیه *آئروموناس هیدروفیلا* (Chu *et al*., 2014) و *باسیلوس مجاونسیس* در مواجهه با *یرسینیا روکری* (Capkin and Altinok, 2009) به کاهش تجمع باکتری‌های بیماری‌زا در روده ماهی نسبت داده شده که نهایتا منجر به کاهش نرخ مرگ و میر در ماهی شده است. بطورکلی، نتایج حاصل از تحقیق موجود نشان داد عصاره *سودوآلتروموناس پیسیسیدیا* حاوی ترکیبات فعال زیستی با قابلیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* بوده و به دلیل سمیت پایین در ماهی، در صورت خالص‌سازی و تایید ویژگی‌های دارویی آنان می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های تجاری در آبزی‌پروری باشد.

۵. منابع

References

Al-Harbi, A.H., Uddin, M.N., 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture* 229, 37–44.

Bakkiyaraj, D., Pandian, S.T.K., 2010. In vitro and in vivo antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms.*Biofouling* 26,711717. http://doi.org/10.1080/08927014.2010.511200

Böhringer, N., Fisch, K., Schillo, D., Bara, R., Hertzer, C., Grein, F., Eisenbarth, J., Kaligis, F., Schneider, T., Wägele, H., Gabriele, M., Schäberle, T., 2017. Antimicrobial Potential of Bacteria associated with marine sea slugs from North Sulawesi, Indonesia. *Frontiers in Microbiology* 8, 1092. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01092

Capkin, E., Altinok, I., 2009. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Appllied Microbiology* 106, 1147–1153. https://doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04080.x.

Chereen, C., Rasmussen, S., Ravi, J., Tolwani, R., 2013. Gavaging Adult Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*. https://doi.org/10.3791/50691.

Chu, W., Shuxin, Z., Wei, Z., Xiyi, Z., 2014. Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection. *Scientific Reports* 4, 5446. https:// doi: 10.1038/srep05446.

Gram, L., Melchiorsen, J., Bruhn, J.B, 2010. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. *Marine Biotechnology* 12, 439 – 451. https://doi.org/ 10.1007/s10126-009-9233-y.

Gudina, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2010. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. A20. *Letters in Applied Microbiology* 50, 419-424. https://doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02818.x.

Kraemer, S., Ramachandran, A., Perron, G., 2019. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms* 7, 180-104. https://doi.org/10.3390 /microorganisms7060180.

Leo´n-Palmero, E., Joglar, V., A´lvarez, P.A., Martı´n-Platero, A., Llamas, I. Reche, I., 2018. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLoS ONE* 13(5), e0196178.

Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture international* 14, 219–229.

Morelan, I.A., Gaulke, A., Christopher, S., Vega Thurber, R., Denver, D. R., 2019. Microbiome Variation in an Intertidal Sea Anemone Across Latitudes and Symbiotic States. *Frontiers in Marine Science* 6,7. https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00007

Muthamil, S., Pandian, S.K., 2016. Inhibitory effect of *Murraya koenigii* against *Candida albicans* virulence and biofilm development. *Biologia*. 71, 256-264. https://doi.org/10.1515/biolog 2016-0044.

Nithyanand, P., Pandian, K. S.,2009. Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral Acropora digitifera from Gulf of Mannar. *FEMS Microbiology Ecology* 69, 384–394. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00723.x.

Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., and Pizzimenti, F.C., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Medical Microbiology* 56, 519–523. https://doi: 10.1099/jmm.0.46804-0.

Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., Jégou, C., Fleury, Y., 2016. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: chemodiversity and ecological significance. *Marine drugs* 14, 129-138. https://doi.org/ 10.3390/md14070129.

Papa, R., Selan, L., Parrilli, E., Tilotta, M., Sannino, F., Feller, G., 2015. Anti-Biofilm Activities from Marine Cold Adapted Bacteria Against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* 6, 1333. doi: 10.3389/fmicb.2015.01333

Parimala, S., Kandhasamy, M., Chinnasamy, P., 2018. Antimicrobial activity of the crude extract derived from *Streptomyces* spp. Associated with sponges. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7(8),1187-1194. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.133.

Raffa, R.B., Lannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., 2005. Bacterial communication (‘Quorum Sensing’) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2, 417-23. doi: 10.1124/jpet.104.075150.

Rasmussen-Ivey, C.R., Figueras, M.J., McGarey, D., Liles M.R., 2016. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: In the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology* 7, 1337. https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2016.01337.

Ravindran, C., Govindhasamay, R.V., Rajasabapathy, R., Sreepada., 2016. Antibacterial activity of marine *Bacillus* substances against *V. cholerae* and *Saureus* and *in vivo* evaluation using embryonic Zebrafish test system. Indian *Journal of Pharmaceutical Sciences* 78, 417-422. https://DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000134.

Richards, G.P., Watson, M.A., Needleman, D.S., Uknalis, J., Boyd, E.F., Fay, J.P., 2017. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicidainduced* killing of vibrios and other bacterial pathogens. *Applied and environmental Microbiology* 83, e00175-17. https://doi.org/10.1128/AEM.00175-17.

Rypien, K.L., Ward, J.R., Azam, F., 2010. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environmental Microbiology* 1, 28-39. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02027.x.

Shnit-Orland, M., Kushmaro, A., 2009. Coral mucus associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiological Ecology* 67, 371–380. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00644.x.

Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A., 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activites. *Ethnopharmacology* 65(1), 71-77. https://doi.org/ 10.1016/s0378-8741(98)00154-8

Stewart, P.S., 2015. Prospects for anti-biofilm pharmaceuticals. *The Pharmaceutical Journal* 8, 504-511. https://doi.org/10.3390/ph8030504

Surette, M. D., Wright, G.D., 2017. Lessons from the environmental antibiotic resistome. *Annual Review of Microbiology* 71, 309–329. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093420.

Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J., Karutha Pandian, S.K., 2009. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 57, 284–294.

Torabi, D.S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Bossier, P., 2018. Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* in vitro and an in vivo evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *Journal of fish diseases* 41(9), 1429-1438. https://doi.org/10.1111/jfd.12840

Vasudevan, R., 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Microbiology and Experimentation* 1(3), 84-98. doi: 10.15406/jmen.2014.01.00014.

Williams, G.P., Babu, S., Ravikumar, S., Kathiresan, K., Prathap, S.A., Chinnapparaj, S., Marian, M.P., Alikhan, S.L., 2007. Antimicrobial activity of tissue and associated bacteria from benthic sea anemone *Stichodactyla haddoni* against microbial pathogens. *Environmental Biology* 28(4), 789-793.