

بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در بندر دیلم استان بوشهر

مریم ابوعلی درویش طاهری^{۱*}

سعید ضیایی نژاد^۲

نفیسه سادات نقوی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد
فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران
۲. گروه شایلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه
صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، بهبهان، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی،
واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلام ی، فلاورجان،
ایران

* مسئول مکاتبات:

aboali.maryam@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۵

کد مقاله: ۱۳۹۳-۲۰۱۵۶

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی
است.

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی فعالیت ضد باکتریایی باکتری های بالقوه پروبیوتیکی *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* جدا شده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی در برابر دو باکتری بیماری‌زای آبزیان شامل *Vibrio harveyi* [ATCC:700104] و *Elizabethkingia meningoseptica* [ATCC:33953T] صورت پذیرفت. برای این منظور ۱۵ قطعه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) جوان و سالم حاصل از صید در بندر دیلم در بهار ۱۳۹۲ انتخاب گردید. در شرایط استریل قطعاتی از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش بریده و نمونه - برداری شد. پس از کشت در محیط‌های اختصاصی *Bacillus cereus* agar و *MRS* agar و انجام تست‌های بیوشیمیایی مربوط به تشخیص جنس های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* و جداسازی، خالص‌سازی و کد گذاری جدایه‌های باکتریایی مختلف، تست آنتاگونیسم *in vitro* با روش انتشار دیسک در گامی جهت یافتن پروبیوتیک های مؤثر انجام شد و میانگین قطر هاله عدم رشد به همراه خطای استاندارد در مورد هر جدایه با استفاده از نرم افزار *SAS* و آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد با هم مقایسه گردید. یافته‌های حاصل نشان داد که ۸ جدایه باکتریایی کاندید برای پروبیوتیک شدن دارای اثر مہاری بر روی پاتوژن های دریایی می باشند و از لحاظ قطر منطقه بازدارنده رشد، جدایه‌های باکتریایی کاندید برای پروبیوتیک شدن توانستند به میزان تقریباً ۱ الی ۲/۶ سانتی‌متر از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری نمایند.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس*، ماهی هامور معمولی.

مقدمه

آبزی پروری در کنار رشد قابل توجهی که در سال‌های گذشته داشته است همواره با مشکلاتی نیز روبرو بوده است که از آن جمله می‌توان به شیوع بیماری‌ها اشاره کرد. به نحوی که شیوع بیماری‌ها به عنوان مشکل عمده آبزی‌پروری، گسترش اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است. در مورد ماهیان نیز تلفات لاروهای تولیدی مهم ترین معضل سیستم‌های پرورش متراکم ماهی است (Lauzon et al., 2008) و طول عمر پایین و متناقض در پرورش لارو ماهی هامور نیز یک تنگنای بزرگ تولید محسوب می‌شود (Hussain and Higuchi, 1980; Kohno et al., 1997) و بیماری‌های باکتریایی، اصلی ترین علت مرگ و میر در تفریح‌گاه‌های میگو و ماهیان به شمار می‌روند (Gomez-Gil et al., 2000). کنترل بیماری‌ها در صنعت آبزی پروری از طریق استفاده از روش‌های سنتی، مواد شیمیایی سنتزی و داروهای آنتی بیوتیکی بوده است (Sahu et al., 2008) و هم اکنون در مراکز آبزی پروری برای مقابله با بیماری‌های باکتریایی، به طور گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Lauzon et al., 2008). ولی به خاطر اثرات

منفی آن‌ها، استفاده از این قبیل داروهای شیمیایی گران قیمت جهت کنترل بیماری‌ها، به میزان زیادی نكوهش شده است. این آثار منفی شامل تجمع پس مانده‌ها، توسعه مقاومت دارویی و مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا، توقف پاسخ ایمنی، مشکلات زیست محیطی و مانند آن میل مصرف کننده را برای تولیدات آبی پروری درمان شده با آنتی بیوتیک و روش‌های سنتی که در برابر کنترل بیماری‌های جدید در سیستم آبی‌پروری وسیع بی اثر هستند، کاهش می‌دهد (Sahu et al., 2008).

به دلیل گسترش کنترل نشده‌ای که اجتماعات میکروبی در مراکز تکثیر آبزیان دارند و این یکی از علت‌های عمده کسب نتایج نامطلوب و غیر قابل پیش بینی می‌باشد، از این رو انجام فعالیت‌های کنترل میکروبی با استفاده از پروبیوتیک‌ها ممکن است تأثیر مفیدی بر عملکرد مراکز تکثیر ماهی داشته باشد (Verschuere et al., 2000). اگر چه مطالعات زیادی در مورد استفاده از پروبیوتیک‌ها در دوره لاروی ماهیان در ده سال گذشته منتشر شده است، اما به کارگیری پروبیوتیک‌ها در سیستم‌های متراکم پرورش لارو ماهیان دریایی کمتر تحقیق شده است. لارو ماهیان دریایی در طول مراحل اولیه تکامل لاروی خود نیازمند غذای زنده می‌باشند (Yufera et al., 2000). بنابراین در طول این مرحله می‌توان از غذاهای زنده (جلبک‌های تک سلولی، آرتمیا، روتیفر) به عنوان یک ناقل پروبیوتیک‌ها جهت رساندن آن‌ها به دستگاه گوارش لارو ماهیان دریایی استفاده کرد. اگر باکتری‌های پروبیوتیکی قبل از باکتری‌های فرصت طلب روده را اشغال نمایند، از این طریق لارو ماهیان قبل از این که سیستم ایمنی آن‌ها به طور کامل استقرار یابد در برابر بیماری‌های باکتریایی ایمن می‌شوند، زیرا اتصال باکتری بیماری‌زا به موکوس دستگاه گوارش اولین مرحله از فرآیند بیماری عفونی است (Olafsen, 2001). با توجه به موفقیت‌های اخیر این روش جایگزین، سازمان خواروبار جهانی استفاده از پروبیوتیک‌ها و اصلاح زیستی برای بهبود کیفیت محیط زیست آبزیان را به عنوان موارد عمده تحقیقات آینده در آبی‌پروری تعیین نموده است (Subasinghe, 1997).

بیشتر پروبیوتیک‌هایی که تاکنون به عنوان عوامل کنترل کننده بیولوژیک در آبی‌پروری معرفی شده‌اند، به باکتری‌های اسیدلاکتیک (مانند *Carnobacterium* و *Lactobacillus*)، جنس *Vibrio* (مانند *Vibrio alginolyticus*)، *Bacillus* و جنس *Pseudomonas* تعلق دارند (Verschuere et al., 2000). باسیلوس‌ها از جمله پروبیوتیک‌هایی می‌باشند که به طور گسترده‌ای در آبی‌پروری استفاده می‌شوند و در بیشتر موارد نتایج مثبتی داشته‌اند و همچنین دارای بیشتر مشخصات و مکانیسم‌های عملی پروبیوتیک‌ها هستند. در رابطه با ویژگی باسیلوس‌ها می‌توان گفت که این باکتری‌ها به طور طبیعی ترکیبات آنتی بیوتیکی مختلفی تولید می‌کنند و بعید است که سایر باکتری‌ها در یک زمان دارای ژن‌های مقاوم به تمام این آنتی بیوتیک‌ها باشند، مخصوصاً اگر قبلاً در معرض باسیلوس‌ها قرار نگرفته باشند (Moriarty, 1998).

باکتری‌های پروبیوتیک یک نوع از ترکیبات شیمیایی را که نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و همچنین نسبت به باکتری‌های گرم منفی خاصیت بازدارندگی دارند را منتشر می‌کنند (Sahu et al., 2008). مسلماً حضور باکتری‌های تولید کننده مواد بازدارنده در روده میزبان، بر سطح بدن و یا در محیط پرورشی مانعی را در برابر تکثیر عوامل بیماری‌زا تشکیل می‌دهد.

گونه‌های متنوعی از اسید لاکتیک باکتری‌ها (از جمله *Lactococcus*، *Lactobacillus* و *Streptococcus* و گونه‌های *Carnobacterium* و *Leuconostoc*) نیز ثابت شده است که بخشی از میکروب‌های روده ماهی را شامل می‌شوند (Denev et al., 2009). این باکتری‌ها در میان میکروب‌های روده‌ای نرمال ماهی غالبیت ندارند، اما برخی از سویه‌ها می‌توانند در روده کلونی زایی کنند (Ringo and Gatesoupe, 1998; Balcazar et al., 2007) و یا این که از چسبیدن پاتوژن‌های متعدد ماهی ممانعت نمایند (Balcazar et al., 2006 و 2008).

Gomez-Gil و همکاران (۲۰۰۰) گروه‌های باکتریایی را به عنوان پروبیوتیک در پرورش لارو آبزیان مورد آزمایش قرار دادند. محققین یاد شده نشان دادند که باسیلوس‌ها با تغییرات عوامل محیطی آبزیان به ویژه با دگرگونی در پاسخ ایمنی‌شان توانایی ایجاد اثرات ممانعت کننده دارند.

در آبی‌پروری انتخاب پروبیوتیک‌ها معمولاً بر پایه توانایی آنتاگونیسمی *in vitro* آن‌ها در برابر باکتری‌های پاتوژن استوار است (Vine et al., 2004a) و انتخاب پروبیوتیک‌های داوطلب بر اساس تست‌های آنتاگونیسم *in vitro* معمولاً به یافتن پروبیوتیک‌های مؤثر منجر می‌شود (Verschuere et al., 2000). همچنین طبق تحقیقات سایر محققین که نشان دادند باکتری‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* دارای پتانسیل خوبی به عنوان باکتری پروبیوتیکی برای آبزیان هستند (Vine et al., 2004; Keysami et al., 2005; Ziaei - Nejad et al., 2006; Suzer et al., 2008). در این تحقیق این باکتری‌ها به عنوان باکتری‌های هدف برای جداسازی در نظر گرفته شدند. بنابراین این مطالعه با هدف تعیین فعالیت ضد باکتریایی باکتری‌های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی هامور در برابر دو نمونه از باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان در جهت رسیدن به پروبیوتیک‌های مؤثر شکل گرفت.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این بررسی در بهار ۱۳۹۲، ۱۵ قطعه ماهی هامور معمولی جوان و سالم حاصل از صید در بندر دیلم استان بوشهر انتخاب گردید. جهت استریل نمودن سطح خارجی بدن، ماهیان به مدت یک دقیقه به وسیله بنزالکونیوم کلراید (۰/۱ درصد) شسته شدند. در شرایط استریل قطعاتی از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش بریده شد و نمونه‌ها به طور جداگانه در آب شور استریل هموژن شدند و به د فیلتر گردیدند. سپس نمونه‌ها را شوک حرارتی داده و بعد به طور سریالی رقیق سازی شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های رقیق شده به روش کشت سطحی به طور جداگانه در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت پخش گردید که در این مرحله از دو محیط کشت انتخابی جهت جداسازی جدایه‌های باکتریایی متعلق به دو جنس *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* استفاده شد که عبارت بودند از: ۱- محیط کشت *Bacillus cereus agar* برای انتخاب جنس *باسیلوس*. ۲- محیط کشت *MRS agar* برای انتخاب جنس *لاکتوباسیلوس*. پتری دیش‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند و سپس کلونی‌های باکتریایی تشکیل شده شمارش شدند و کلونی‌ها براساس ویژگی‌های ظاهری‌شان شامل رنگ، فرم و اندازه در محیط‌های کشت انتخابی (Vine et al., 2004) و همچنین بر اساس انجام تست‌های بیوشیمیایی رایج توصیه شده توسط Holt (۱۹۹۴) و Brooks و همکاران (۱۹۹۸) و نیز Adams و Moss (۲۰۰۲)، جداسازی، خالص‌سازی و کدگذاری گردیدند.

تست‌های بیوشیمیایی مربوط به *باسیلوس*‌ها شامل رنگ‌آمیزی گرم، تشکیل اسپور، تست کاتالاز، تست بی‌هوازی مطلق (در اینجا جهت تمایز جنس *Bacillus* از جنس *Clostridium* از جار بی‌هوازی استفاده شد) بودند.

تست‌های بیوشیمیایی مربوط به *لاکتوباسیلوس*‌ها شامل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ آمیزی اسیدفست، تست کاتالاز، تست هیدرولیز آرژنین (جهت تمایز جنس *Lactobacillus* از جنس *Leuconostoc*، تست هیدرولیز آرژنین انجام شد) بودند.

باکتری‌های *باسیلوس* با کد B و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* با کد L مشخص شدند. بعد از جداسازی باکتری‌ها، ذخایر خالص‌سازی شده این باکتری‌ها بر اساس روش Vine و همکاران (2004) هم بر روی آگار اسلنت و هم در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد (با استفاده از گلیسرول استریل) نگهداری گردید.

با توجه به این که حضور باکتری‌های تولید کننده مواد بازدارنده در روده میزبان، بر سطح بدن و یا محیط پرورشی، مانعی را در برابر تکثیر عوامل بیماری‌زا تشکیل می‌دهد (Verschuere et al., 2000). بنابراین در تحقیق حاضر جهت بررسی توان تولید متابولیت‌های ضد باکتریایی و دارا بودن خواص آنتاگونیسم در ب رابر باکتری‌های بیماری‌زا از ۲ باکتری بیماری‌زا شامل [ATCC:700104]

Vibrio harveyi [ATCC:33953T] و *Elizabethkingia meningoseptica* تهیه شده از مؤسسه تحقیقات میگوی ایران واقع در بوشهر و از روش انتشار دیسک استفاده شد. در این روش این عوامل بیماری‌زا در محیط کشت مارین براث به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس در پلیت‌های خالص کشت داده شد. صفحه‌های دایره‌ای کاغذ صافی به متابولیت‌های حاصل

از باکتری‌های جداسازی شده آغشته شد و بعد از قرار گرفتن زیر هود و گرفته شدن رطوبت اضافی آن، روی پلیت های خالص باکتری بیماری‌زا قرار داده شد.

برای تعیین این که در چه مرحله ای از رشد باکتری ترکیبات بازدارنده تولید می شود، ۴ میلی‌لیتر از کشت باکتری با ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مارین برات در ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. هر ۴ ساعت یک بار ۵ میلی‌لیتر از نمونه برداشت گردید و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس صفحات کوچک کاغذ صافی به سوپرناتانت حاصله از کشت باکتری (که روش تهیه آن ذکر شد) آغشته شد و در نهایت وجود و یا عدم وجود منطقه بازدارنده رشد به عنوان تولید ترکیبات بازدارنده و خاصیت ضد باکتریایی در نظر گرفته شد (Vine et al., 2004).

باکتری‌های جداسازی شده ای که حداقل دارای خواص آنتاگونیسم در برابر یک عامل بیماری‌زا بودند به عنوان باکتری‌های کاندید برای پروبیوتیک شدن مدنظر قرار گرفتند. برای بررسی کمی خواص آنتاگونیسم نیز، قطر منطقه بازدارنده رشد در اطراف دیسک اندازه‌گیری شد و به منظور کاهش خطا، هر آزمون ۱۰ بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد به همراه خطای استاندارد در مورد هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار SAS اندازه‌گیری و ثبت شد. در ادامه نیز قطر منطقه بازدارنده رشد جدایه‌های مختلف توسط آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد با هم مقایسه گردید.

نتایج

جدایه‌های باکتریایی به دست آمده از محیط کشت *باسیلوس سرئوس* آگار (جدول ۱) و محیط *MRS* آگار (جدول ۲) همگی به ترتیب دارای مشخصات مربوط به جنس *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* بودند. به علاوه انجام تست بی‌هوازی مطلق و عدم رشد جدایه‌ها در محیط جار بی‌هوازی، جنس *باسیلوس* را تأیید کرد و آن را از جنس *کلستریدیوم* متمایز گرداند (شکل ۱). همچنین انجام تست هیدرولیز آرژنین جنس *لاکتوباسیلوس* را تأیید کرد و آن را از جنس *لوکونوستوک* متمایز ساخت (شکل ۱). بنابراین ۴ جدایه از باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* با کدهای L_1, L_2, L_3, L_4 و ۱۰ جدایه از باکتری‌های جنس *باسیلوس* با کدهای $B_1, B_2, B_3, \dots, B_{10}$ جداسازی، خالص‌سازی و کدگذاری گردید.

جدول ۱: مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های *باسیلوس* حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲).

آزمایش تشخیصی	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀
رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تشکیل اسپور	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تست بی‌هوازی مطلق	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۲: مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های لاکتوباسیلوس حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲).

آزمایش تشخیصی	L ₄	L ₃	L ₂	L ₁
رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+	+
تشکیل اسپور	-	-	-	-
رنگ‌آمیزی اسید فست	-	-	-	-
کاتالاز	-	-	-	-
هیدرولیز آرژنین	+	+	+	+



(الف)



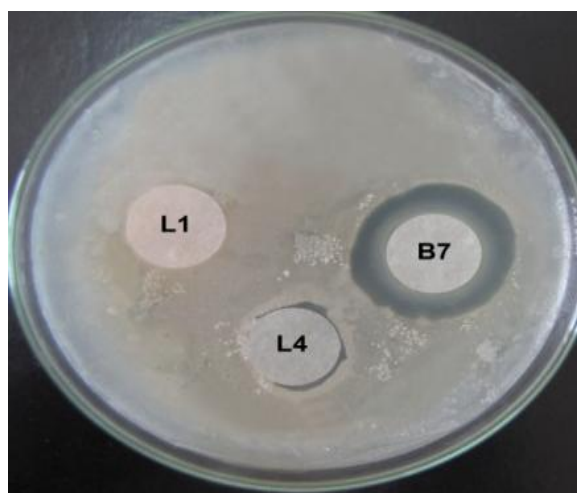
(ب)

شکل ۱: تست بی‌هوازی مطلق در جدایه‌های باسیلوس (الف) و تست هیدرولیز آرژنین در جدایه‌های لاکتوباسیلوس (ب) جداسازی شده از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲).

در مورد تست هیدرولیز آرژنین، لوله سمت راست همان محیط براث مولر دکربوکسیلاز محتوی آرژنین قبل از افزودن باکتری می باشد و لوله ارغوانی‌رنگ سمت چپ، محیط براث بعد از افزودن باکتری می‌باشد.

آن گونه که نتایج حاصل از فعالیت آنتاگونیسم باکتری های جداسازی شده در برابر باکتری های بیماری زای *Vibrio harveyi* و *Elizabethkingia meningoseptica* نشان می‌دهد، از میان ۱۴ جدایه به دست آمده (شامل ۱۰ جدایه مربوط به باسیلوس و ۴ جدایه مربوط به لاکتوباسیلوس)، ۶ جدایه باسیلوس شامل جدایه‌های B₂, B₃, B₅, B₇, B₈ و B₉ و ۲ جدایه لاکتوباسیلوس شامل جدایه‌های L₃ و L₄ توانستند در روش انتشار دیسک و در مرحله سکون رشد، حداقل از رشد یک باکتری بیماری زا جلوگیری نمایند و بقیه جدایه ها هیچ گونه فعالیت ضد باکتریایی را نشان ندادند. در این میان جدایه‌های B₇ و L₃ توانایی مهار هر دو نوع باکتری بیماری زا یعنی ویبریو

هارویی و الیزابتکینگیا منینگوسپتیکا را نشان دادند. از لحاظ قطر منطقه بازدارنده رشد نیز نتایج نشان داد که باکتری های کاندید برای پروبیوتیک شدن توانستند به میزان تقریباً ۱ تا ۲/۶ سانتی‌متر از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (جدول ۳). همان‌طور که نتایج این مرحله نیز نشان می‌دهد، باکتری B₇ بیشترین قطر بازدارندگی را در برابر باکتری های بیماری‌زا از خود نشان داد و توانست به قطر ۲/۶±۰/۴ و ۲/۲±۰/۳ سانتی‌متر به ترتیب از رشد باکتری های ویبریو هارویی و الیزابتکینگیا منینگوسپتیکا جلوگیری نماید که اختلاف معنی‌داری میان اکثر باکتری‌های جداسازی شده از لحاظ میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد وجود نداشت (جدول ۳). لازم به ذکر است که در رابطه با فعالیت ضد باکتریایی در برابر ویبریو هارویی، بیشترین و کمترین فعالیت بازدارندگی به ترتیب در جدایه‌های B₇ و L₄ مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < 0.05$) (شکل ۲ و جدول ۳). در مورد فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری بیماری‌زای الیزابتکینگیا منینگوسپتیکا نیز بیشترین و کمترین قطر بازدارندگی به ترتیب در جدایه های B₉ و B₂ وجود داشت که آن‌ها نیز اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < 0.05$) (جدول ۳). در مرحله رشد تصاعدی، فقط جدایه‌های B₃ و B₉ دارای فعالیت بازدارندگی بودند و از لحاظ قطر بازدارندگی، جدایه B₃ به میزان ۰/۳±۰/۱^a سانتی‌متر و جدایه B₉ به میزان ۰/۴±۰/۱^a سانتی‌متر در مرحله رشد تصاعدی توانستند به ترتیب از رشد باکتری ویبریو هارویی و الیزابتکینگیا منینگوسپتیکا جلوگیری نمایند که اختلاف معنی‌داری نیز میان جدایه‌های مذکور از لحاظ میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد وجود نداشت (جدول ۴).



شکل ۲: فعالیت ضد باکتریایی برخی از جدایه‌های حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲) در برابر باکتری بیماری‌زا *Vibrio harveyi* در مرحله سکون رشد.

جدول ۳: قطر منطقه بازدارنده رشد (سانتی‌متر) در جدایه‌های لاکتوباسیلوس (الف) و باسیلوس (ب) حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲) در مرحله سکون رشد.

(الف)

L ₄	L ₃	L ₂	L ₁	
۱/۹±۰/۳ ^b	۲/۱±۰/۳ ^a	-	-	<i>V. harveyi</i>
-	۱/۷±۰/۳ ^{ab}	-	-	<i>meningoseptica.E</i>

(ب)

B ₁₀	B ₉	B ₈	B ₇	B ₆	B ₅	B ₄	B ₃	B ₂	B ₁	
-	-	۲/۳±۰/۳ ^a	۲/۶±۰/۴ ^a	-	-	-	۲/۵±۰/۳ ^a	-	-	<i>V. harveyi</i>
-	۲/۴±۰/۵ ^a	-	۲/۲±۰/۳ ^a	-	۲/۰±۰/۳ ^a	-	-	۱/۰±۰/۳ ^b	-	<i>meningoseptica.E</i>

*اختلاف بین آن دسته از داده‌هایی که دارای حرف انگلیسی مشترک نیستند، معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). اعداد موجود در جدول نشان‌دهنده میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد برای هر کدام از جدایه‌هایی که دارای فعالیت آنتاگونیسم بوده‌اند به همراه خطای استاندارد می‌باشد. به منظور کاهش خطا، این آزمون در مورد هر جدایه ۱۰ بار تکرار گردید.

جدول ۴: قطر منطقه بازدارنده رشد (سانتی‌متر) در جدایه‌های لاکتوباسیلوس (الف) و باسیلوس (ب) حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲) در مرحله رشد تصاعدی.

(الف)

L ₄	L ₃	L ₂	L ₁
-	-	-	-
<i>V. harveyi</i>			
-	-	-	-
<i>meningoseptica.E</i>			

(ب)

B ₁₀	B ₉	B ₈	B ₇	B ₆	B ₅	B ₄	B ₃	B ₂	B ₁
-	-	-	-	-	-	-	۰/۳±۰/۱ ^a	-	-
<i>V. harveyi</i>									
-	۰/۴±۰/۱ ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>meningoseptica.E</i>									

*اختلاف بین آن دسته از داده‌هایی که دارای حرف انگلیسی مشترک نیستند، معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). اعداد موجود در جدول نشان‌دهنده میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد برای هر کدام از جدایه‌هایی که دارای فعالیت آنتاگونیسم بوده‌اند به همراه خطای استاندارد می‌باشد. به منظور کاهش خطا، این آزمون در مورد هر جدایه ۱۰ بار تکرار گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌گونه که قبلاً نیز اشاره گردید بر طبق نظر بسیاری از محققین مبنی بر پتانسیل بالای باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک در آبزی پروری، این باکتری‌ها به عنوان باکتری‌های هدف برای جداسازی در نظر گرفته شدند. در ماهیان دریایی فلور باکتریایی دستگاه گوارش بین گونه‌های مختلف متفاوت است (Ringo and Birkbeck, 1999) و فاکتورهای متفاوتی از جمله شرایط محیط زیست، نوع تغذیه و مرحله رشد ماهی می‌تواند روی این فلور میکروبی تأثیر بگذارد. حتی در نواحی جغرافیایی مختلف فلور میکروبی مدفوع و فلور میکروبی روده یک گونه خاص از ماهی، متفاوت خواهد بود و همچنین این امکان وجود دارد که نوسانات روزانه زیادی، هم در تعداد و هم در ترکیب فلور میکروبی روده وجود داشته باشد (Sugita et al., 1990). گروه‌های عمده باکتریایی در دستگاه گوارش ماهیان دریایی سالم شامل باکتری‌های *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* و خانواده *Enterobacteriaceae* هستند (Ringo and Strom, 1994). البته باکتری‌های گرم مثبت همانند باکتری‌های اسیدلاکتیک نیز به طور معمول از روده ماهی جداسازی شده‌اند (Ringo and Gatesoupe, 1998). باکتری‌های اسیدلاکتیک از موکوس روده ماهی کاد (*Gadus morhua*)، ماهی ساید (*Pollachius virens*)، ماهی کاپل (*Mallotus villosus*)، ماهی هرینگ (*Clupea harengus*) و ماهی آزاد آتلانتیک جداسازی شده‌اند (Stroband and Kroon, 1981; Olafsen, 2001) که بیشتر این باکتری‌های اسیدلاکتیک از جنس *لاکتوباسیلوس* می‌باشند. به علاوه گزارشاتی موجود است که

باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهیان می توانند به عنوان پروبیوتیک عمل کنند (Ringo and Gatesoupe, 1998).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری‌های جنس *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* هر دو در دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی وجود دارند. به طوری که ۴ جدایه از باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* (L_1, L_2, L_3, L_4) و ۱۰ جدایه از باکتری‌های جنس *باسیلوس* ($B_1, B_2, \dots, B_{10}$) با استفاده از خصوصیات ظاهری کلونی‌ها در کشت‌های اختصاصی و همچنین بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و انجام تست‌های بیوشیمیایی (شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست بی‌هوازی مطلق و استفاده از جار بی‌هوازی جهت تمایز جنس *Bacillus* از جنس *Clostridium*، رنگ‌آمیزی اسیدفست جهت تمایز جنس *Lactobacillus* از *Mycobacterium*، تست کاتالاز جهت تمایز جنس *Lactobacillus* از *Corynebacterium*، تست هیدرولیز آرژنین جهت تمایز جنس *Lactobacillus* از جنس *Leuconostoc*) جداسازی، خالص‌سازی و کدگذاری گردیدند.

Sun و همکاران (۲۰۰۹) فلور میکروبی روده‌ی ماهیان هامور جوان تند رشد و کند رشد را مورد بررسی قرار دادند. ترکیب باکتریایی روده‌ای مشاهده شده در هامور تند رشد و کند رشد شامل گونه‌های *Bacillus pumilus*, *Bacillus clausii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Psychrobacter sp.*, *Burkholderia cepacia*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Nocardioideis sp.* بودند. در راستای متمایز کردن جدایه‌های مربوط به جنس *لاکتوباسیلوس* از جنس *لوکونوستوک* از طریق انجام تست هیدرولیز آرژنین، باید افزود که بر طبق تحقیقات صورت گرفته توسط Sun و همکاران (۲۰۰۹) در رابطه با بررسی ترکیب باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان هامور جوان، این طور نتیجه می‌شود که در ترکیب روده‌ای ماهی هامور باکتری *لوکونوستوک* وجود ندارد. بنابراین می‌توان با توجه به تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفته و نیز با استناد به نتیجه حاصل از بررسی‌های محقق مذکور در رابطه با فلور باکتریایی روده‌ی ماهی هامور، یقین حاصل کرد که باکتری جداسازی شده، *لاکتوباسیلوس* بوده است و به واسطه تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفته در این تحقیق، جنس *لاکتوباسیلوس* از دیگر باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت که قادر به تشکیل اسپور نیستند نظیر گونه‌های *کورینه‌باکتریوم* و *مایکوباکتریوم* و نیز جنس *لوکونوستوک* متمایز گردید.

با توجه به این که در آبی پروری انتخاب پروبیوتیک‌ها معمولاً بر پایه توانایی آنتاگونیسمی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی در برابر باکتری‌های پاتوژن استوار است (Vine et al., 2004)، به طوری که بنا به نظر محققین، انجام دادن یک تست آنتاگونیسم در محیط آزمایشگاهی (که در آن پاتوژن‌ها در معرض تولیدات خارج سلولی کاندیداهای پروبیوتیک قرار می‌گیرند) یک گام مهم در غربالگری پروبیوتیک‌های بالقوه مطرح شده است (Gildberg et al., 1995 and 1997) و انتخاب پروبیوتیک‌های داوطلب بر اساس تست‌های آنتاگونیسم در شرایط آزمایشگاهی معمولاً به یافتن پروبیوتیک‌های مؤثر منجر می‌شود (Verschuere et al., 2000). از این رو در گامی جهت غربالگری باکتری‌های پروبیوتیکی بالقوه، توان تولید متابولیت‌های ضد باکتریایی جدایه‌های به دست آمده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی مورد ارزیابی قرار گرفت و برای بررسی خاصیت آنتاگونیسم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا از دو نمونه باکتری بیماری‌زا شامل *ویبریو هارویی* [ATCC:700104] و *ا.بتکینگیا منینگوسپتیکا* [ATCC:33953T] استفاده شد. فرض بر این است که باکتری‌های مفیدی که بتوانند در شرایط آزمایشگاهی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری نمایند، احتمالاً خواهند توانست در شرایط موجود در بدن آبی نیز رقابت بهتری با عوامل بیماری‌زا داشته باشند. لازم به ذکر است که بدانییم به طور معمول عوامل بیماری‌زا رشد سریعی دارند (Andrews and Harris, 1986). به همین دلیل اگر شاخصه‌های خاصی از رشد یک پروبیوتیک بهتر از باکتری‌های بیماری‌زا باشد، این امکان وجود دارد که بتواند در دستگاه گوارش کلونی‌سازی کرده و از رشد باکتری‌های بیماری‌زا یا فرصت‌طلب جلوگیری کند. در واقع باکتری‌ها برای تشکیل کلونی در روده، ابتدا باید بتوانند به موکوس دستگاه گوارش آبی متصل شوند (Ringo et al., 2007). مشاهدات

این محققین حاکی از آن است که اتصال یک گروه باکتریایی منجر به تغییراتی در سطح موکوس پوششی روده می‌شود و زمینه را برای اتصال گروه‌های بعدی، نامناسب می‌گرداند.

نتایج مطالعه‌ای که زیارتی و همکاران (۱۳۹۱) در رابطه با جداسازی و شناسایی میکروفلورای استخرهای پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غریبی انجام دادند در برگیرنده تولید یک ناحیه وسیع عدم رشد در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا آیزان از جمله ویبریوها بود. به این صورت که ویبریوها در درون سرم فیزیولوژی استریل در مدت ۱۲ ساعت به وسیله افزودن محتویات درون سلولی گونه *باسیلوس کاملاً* کشته شدند.

Rengpipat و همکاران (۲۰۰۰) نیز فعالیت ضد باکتریایی گونه *باسیلوس* را به عنوان پروبیوتیک روی میگوی ببری سیاه نشان دادند. Domrongpakkaphan و Wanchaitanawong (۲۰۰۶) نیز جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی گونه‌های *باسیلوس* بر علیه گونه‌های پاتوژن *Vibrio* (*V. harveyi* VHY02، *V. harveyi* VH03، *V. alginolyticus* VA01، *V. parahaemolyticus* VP02) در میگوی ببری سیاه، بیست و پنج نمونه از گونه‌های *باسیلوس* را از هپاتوپانکراس میگوی ببری سیاه غربالگری کردند. چهار جدایه از جنس *باسیلوس* (*B*₁₇، *B*₁₉، *B*₂₁ و *B*₂₅) در برابر تمام گونه‌های ویبریو از طریق روش انتشار در آگار، فعال مشاهده شدند و چهار جدایه دیگر از جنس *باسیلوس* (شامل *B*₀₆، *B*₁₀، *B*₁₃ و *B*₂₂)، قدری از درجات فعالیت ضد میکروبی را در برابر حداقل یک گونه از گونه‌های ویبریو نشان دادند. همچنین نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که *باسیلوس* *B*₁₇، *باسیلوس* *B*₂₁ و *باسیلوس* *B*₂₅ جداسازی شده از هپاتوپانکراس میگوی ببری سیاه، یک منطقه وسیع از مهار را در برابر گونه‌های ویبریو تولید کردند. *باسیلوس* *B*₁₇ و *باسیلوس* *B*₂₁ به تعداد 5×10^7 واحد کلونی در هر میلی‌لیتر، کافی بودند برای این که به طور کامل *V. harveyi* VH03 را در عرض ۱۲ ساعت سرکوب کنند و *باسیلوس* *B*₂₅ تنها قادر به کاهش دادن *V. harveyi* VH03 کمتر از گروه کنترل بود. این محققین نشان دادند که به طور کلی جدایه‌های *باسیلوس* *B*₁₇، *باسیلوس* *B*₂₁ و *باسیلوس* *B*₂₅ می‌توانند به طور بالقوه بر علیه ویبریو هارویی تحت شرایط آزمایشگاهی عمل کنند و ممکن است بتوانند به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در کشت میگوی ببری سیاه و نیز جهت جایگزین شدن با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مفید واقع شوند.

Ariole و Nyeche (۲۰۱۳) نیز فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتوباسیلوس را در برابر پاتوژن‌های میگوی ببری سیاه در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. این آزمایش نشان داد که لاکتوباسیلوس *L*₂ به تعداد 1×10^6 واحد کلونی در هر میلی‌لیتر، کافی بود برای این که ویبریو را در مدت ۱۲ ساعت سرکوب کند. سویه‌های جداسازی شده لاکتوباسیلوس *L*₁ و *L*₂ می‌توانند به طور بالقوه بر علیه ویبریو تحت شرایط آزمایشگاهی مصرف شوند و همچنین می‌توانند به عنوان پروبیوتیک‌های بالقوه در سیستم آبری پروری میگوها جهت کنترل عفونت‌های باکتریایی به کار برده شوند.

طبق نظر Koga و همکاران (۱۹۹۸) ممانعت از رشد گونه‌های ویبریو احتمالاً به دلیل تولید اسیدهای ارگانیک توسط گونه‌های لاکتوباسیلوس بوده است.

نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که از میان ۱۴ جدایه به دست آمده از دستگاه گوارش ماهی هامور معمولی، ۶ جدایه *باسیلوس* (*B*₂، *B*₃، *B*₅، *B*₇، *B*₈ و *B*₉) و ۲ جدایه لاکتوباسیلوس (*L*₃ و *L*₄) دارای توانایی تولید متابولیت‌های ضد باکتریایی در برابر حداقل یکی از باکتری‌های بیماری‌زا بودند که در این میان جدایه‌های *B*₇ و *L*₃ توانایی مهار هر دو نوع باکتری بیماری‌زا را از خود نشان دادند. به علاوه این جدایه‌های باکتریایی کاندید برای پروبیوتیک شدن، توانستند به میزان تقریباً ۱ تا ۲/۶ سانتی‌متر از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری نمایند. در رابطه با فعالیت ضد باکتریایی در برابر ویبریو هارویی در مرحله سکون رشد نیز بیشترین و کمترین فعالیت بازدارندگی به ترتیب در جدایه‌های *B*₇ ($2/6 \pm 0/4$) و *L*₄ ($1/9 \pm 0/3$) مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < 0/05$). در مورد فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری بیماری‌زا *اِلیز/تِکیگیا منیگوسپتیکا* نیز بیشترین و کمترین قطر بازدارندگی به ترتیب در جدایه‌های *B*₉ ($2/4 \pm 0/5$) و *B*₂ ($1/0 \pm 0/3$) وجود داشت که آن‌ها نیز اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < 0/05$).

بنابراین آن چه از نتایج استنباط می‌شود این است که باسیلوس‌ها از لحاظ فعالیت‌های بازدارندگی و به عبارتی ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌ها همواره فعال‌تر بودند و قطر هاله عدم رشد بیشتری در برابر باکتری‌های بیماری‌زا تولید نمودند. از بین جدایه‌های دارای فعالیت ضد باکتریایی، جدایه B7 از باسیلوس‌ها و جدایه L3 از لاکتوباسیلوس‌ها که بیشترین فعالیت بازدارندگی را داشتند و در این زمینه فعال‌تر از دیگر جدایه‌ها عمل کردند و نیز از رشد هر دو نوع باکتری بیماری‌زا ممانعت نمودند، جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک برای آبزیان دارای ارجحیت می‌باشند و ترکیبات تولید شده توسط این باکتری‌ها، احتمالاً پتانسیل مهار پاتوژن‌های باکتریایی را در سیستم آبزی پروری دارا می‌باشند. این موضوع به وسیله نتایج تحقیقاتی که باسیلوس سوبتیلیس را به عنوان تولیدکننده ترکیبات ضد باکتریایی و ضد جلبکی گوناگون و وسیعی نشان داده‌اند نیز تأیید می‌گردد (Zokaeifar et al., 2012). بنابراین استفاده از این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک‌های بالقوه در سیستم آبزی پروری جهت مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند از شیوع بیماری‌های مرتبط با آن و نهایتاً از میزان مرگ و میر آبزیان بکاهد. همان گونه که در بخش نتایج نیز مشخص شد در مورد کلیه باکتری‌های پروبیوتیکی بالقوه جداسازی شده، این بازدارندگی از رشد عمدتاً در مرحله سکون رشد متمرکز است. نتایج حاصل از تحقیقات Vine و همکاران (۲۰۰۴) نیز با تأیید این مطلب نشان داده‌اند که باکتری‌های جداسازی شده از ماهی دریایی *Amphiprion percula* بیشترین فعالیت بازدارندگی را در مرحله سکون رشد خود نشان می‌دهند. این مسئله می‌تواند به دلیل حداکثر بودن تعداد باکتری‌ها در این مرحله از رشد و مسلماً تولید بیشتر متابولیت‌های ضد میکروبی باشد که این نتیجه می‌تواند در تعیین استراتژی مصرف پروبیوتیک‌ها در مرحله به کار بردن در بدن آبزی و نیز در مزارع تکثیر و پرورش آبزیان کمک نماید.

منابع

- زیارتی، م.، آوخ کیسمی، م. و کفیلزاده، ف.، ۱۳۹۱. جداسازی و شناسایی میکروفلورای استخرهای پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی (*لیتوپنئوس وانامی*) و ارزیابی آن‌ها به عنوان پروبیوتیک. مجله دنیای میکروب‌ها، سال پنجم، شماره سوم و چهارم، صفحات ۱۳۱-۱۲۲.
- Adams, M. R. and Moss, M. O., 2002. Food Microbiology. Second edition, Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad Publication, 611p.
- Andrews, J. H. and Harris, R. F., 1986. Selection in microbial ecology. Advanced Microbial Ecology, 9: 99-147.
- Ariole, C. N. and Nyeche, G. E., 2013. In vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus* isolates against shrimp (*Penaeus monodon*) pathogens. International Journal of Biosciences, 3(1): 7-12.
- Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Evora, M. D. and Muzquiz, J. L., 2006. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microbial Ecology in Health and Disease, 18: 61-63.
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., Blas, I. D., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L. and Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 278: 188-191.
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O. and Múzquiz, J. L., 2007. In vitro Competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Veterinary Microbiology, 122(3-4): 373-380.
- Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A., 1998. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. Twenty-first edition, Appleton & Lange Stamford, Connecticut, 740p.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. and Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. International Aquatic Research, 1: 1-29.
- Domrongpakkaphan, V. and Wanchaitanawong, P., 2006. In vitro antimicrobial activity of *Bacillus* spp. against pathogenic *Vibrio* spp. in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Kasetsart Journal (Natural Sciences), 40: 949 – 957.

- Gildberg, A., Johansen, A. and Bogwald, J., 1995.** Growth and survival of atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138: 23-34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ring, E., 1997.** Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352: 279-285.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J. F., 2000.** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259-270.
- Holt, J. G., 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. ninth edition, LWW, 787p.
- Hussain, N. A. and Higuchi, M., 1980.** Larval rearing and development of the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskål). *Aquaculture*, 19: 339-350.
- Keysami, M., Saad Che, R., Sijam, K., Mohd Daud, H. and Alimon, A., 2005.** Assessment of putative bacterial flora in rosenbergii as probiotic by antibacterial activity test. Symposium of the Malaysian Society for Microbiology, pp. 364-368.
- Koga, T., Mizobel, T. and Takumi, K., 1998.** Antibacterial activity of *Lactobacillus* species against *Vibrio* species. *Microbiological Research*, 153(3): 271-275.
- Kohno, H., Ordonio-Aguilar, R. S., Ohno, A. and Taki, Y., 1997.** Why is grouper larval rearing difficult?:an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Research*, 44: 267-274.
- Lauson, H. L., Gudmundsdottir, S., Pedersen, M. H., Budde, B. B. and Gudmundsdottir, B. K., 2008.** Isolation of putative probiotics from cod rearing environment. *Veterinary Microbiology*, 132: 328-339.
- Moriarty, D. J. W., 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.
- Olafsen, J. A., 2001.** Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200: 223-247.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 2000.** Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.
- Ringo, E. and Birkbeck, T. H., 1999.** Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30: 73-93.
- Ringo, E. and Gatesoupe, F. J., 1998.** Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- Ringo, E. and Strom, E., 1994.** Microflora of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture of Fish Management*, 25: 623-629.
- Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M. and Olsen, R. E., 2007.** Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268: 251-264.
- Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. and Kannan, L., 2008.** Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48: 299-308.
- Stroband, H. W. J. and Kroon, A. G., 1981.** The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell Tissue Research*, 215: 397-415.
- Subasinghe, R., 1997.** Fish health and quarantine. In Review of the State of the World Aquaculture – FAO Fisheries Circular, 886: 45-49.
- Sugita, H., Miyajima, C., Kobiki, Y. and Deguchi, Y., 1990.** The daily fluctuation and inter-individual variation of the faecal flora of carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 36: 103-105.
- Sun, Y., Yang, H., Ling, Z., Chang, J. and Ye, J., 2009.** Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(11): 713-720.
- Suzer, C., Coban, D., Kamaci, O. H., Saka, S., Firat, K., Otgucuoglu, O. and Kucuksari, H., 2008.** *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280: 140-145.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 655-671.

- Vine, N. G., Leukes, W. D. and Kaiser, H., 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters, 231: 145-152.
- Yufera, M., Fernandez-Diaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M. C., Moyano, F. J., Diaz, M., Alarcon, F. J., Garcia-Gallego, M. and Parra, G., 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. Aquaculture Nutrient, 6: 143-152.
- Ziaei – Nejad, S., Habibi-Rrzaei, M., Azari-Takami, G., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. and Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252: 516-524.
- Zokaeifar, H., Balcazar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A. and Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 33(4): 683-689.