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

مریم ابوعلی درویش طاهری[1*]
سعید ضیایی نژاد[2]
نفیسه سادات نقوی[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران

* **مسئول مکاتبات:**
abooali.maryam@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۵
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۲۰۱۵۶
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:33953T] و *Elizabethkingia meningoseptica* [ATCC:700104] 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 بخش های مختلف دستگاه گوارش بریده و نمونه - برداری شد. پس از کشت در محیط های 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 جدایه های 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 مهاری 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 سال های 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 بیماری های باکتریایی، اصلی ترین علت مرگ و میر در تفریح‌گاه‌ای میگو و ماهیان به شمار می روند (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

Archive of SID
www.SID.ir

منفی آن‌ها، استفاده از این قبیل داروهای شیمیایی گران قیمت جهت کنترل بیماری ها، به میزان زیادی نکوهش شده است. این آثار منفی شامل تجمع پس‌مانده‌ها، توسعه م‌قاومت دارویی و مقاوم شدن عوامل بیماری زا، توقف پاسخ ایمنی، مشکلات زیست محیطی و مانند آن میل مصرف کننده را برای تولیدات آبزی پروری درمان شده با آنتی بیوتیک و روش های سنتی که در برابر کنترل بیماری های جدید در سیستم آبزی‌پروری 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 علت های عمده کسب نتایج نامطلوب و غیر قابل پیش بینی می‌باشد، از این رو انجام فعالیت های کنترل میکروبی با استفاده از پروبیوتیک ها ممکن است تأثیر مفیدی بر عملکرد مراکز تکثیر ماهی داشته باشد (Verschuere *et al*., 2000). اگر چه مطالعات زیادی در مورد استفاده از پروبیوتیک ها در دوره لاروی ماهیان در ده سال گذشته منتشر شده است، اما به کارگیری پروبیوتیک ها در سیستم‌های متراکم پرورش لارو ماهیان دریایی کمتر تحقیق شده است. لارو ماهیان دریایی در طول مراحل اولیه تکامل لاروی خود نیازمند غذای زنده می باشند (Yufera *et al*., 2000). بنابراین در طول این مرحله می توان از غذاهای زنده (جلبک‌های تک سلولی، آرتمیا، روتیفر) به عنوان یک ناقل پروبیوتیک ها جهت رساندن آن ها به دستگاه گوارش لارو ماهیان دریایی استفاده کرد. اگر باکتری‌های پروبیوتیکی قبل از باکتری های فرصت‌طلب روده را اشغال نمایند، از این طریق لارو ماهیان قبل از این که سیستم ایمنی آن ها به طور کامل استقرار یابد در برابر بیماری های باکتریایی ایمن می شوند، 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 پروبیوتیک ها و اصلاح زیستی برای بهبود کیفیت محیط زیست آبزیان را به عنوان موارد عمده تحقیقات آینده در آبزی‌پروری تعیین نموده است (Subasinghe, 1997).

بیشتر پروبیوتیک هایی که تاکنون به عنوان عوامل کنترل کننده بیولوژیک در آبزی پروری معرفی شده اند، به باکتری های 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 آبزی‌پروری 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 باکتری ها به طور طبیعی ترکیبات آنتی بیوتیکی مختلفی تولید می کنند و بعید است که سایر باکتری‌ها در یک زمان دارای ژن‌های مقاوم به تمام این آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، مخصوصاً اگر قبلاً در معرض *باسیلوس‌ها* قرار نگرفته باشند (Moriarty, 1998).

باکتری‌های پروبیوتیک یک نوع از ترکیبات شیمیایی را که نسبت به باکتری های گرم مثبت و همچنین نسبت به باکتری های گرم منفی خاصیت بازدارندگی دارند را منتشر می کنند (Sahu *et al*., 2008). مسلماً حضور باکتری های 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 باکتری ها (از جمله *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Streptococcus* و گونه های *Carnobacterium* و *Leuconostoc*) نیز ثابت شده است که بخشی از میکروب‌های روده ماهی را شامل می‌شوند (Denev *et al*., 2009). این باکتری‌ها در میان میکروب های روده‌ای نرمال ماهی غالبیت ندارند ، اما برخی از سویه ها می‌توانند در روده کلونی زایی کنند (Ringo and Gatesoupe, 1998; Balcazar *et al*., 2007) و یا این که از چسبیدن پاتوژن های 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.

Archive of SID
www.SID.ir

در آبزی‌پروری 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 باکتری های *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 باکتری ها به عنوان باکتری های هدف برای جداسازی در نظر گرفته شدند. بنابراین این مطالعه با هدف تعیین فعالیت ضد باکتریایی باکتری های *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 بخش های مختلف دستگاه گوارش بریده شد و نمونه ها به طور جداگانه در آب شور استریل هموژن شدند و بع 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 دیش های حاوی محیط کشت پخش گردید که در این مرحله از دو محیط کشت انتخابی جهت جداساز ی جدایه های 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*. پتری‌دیش‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند و سپس کلونی های باکتریایی تشکیل شده شمارش شدند و کلونی‌ها براساس ویژگی های ظاهری‌شان شامل رنگ، فرم و اندازه در محیط های کشت انتخابی (Vine *et al*., 2004) و همچنین بر اساس انجام تست های 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 *باسیلوس‌ها* شامل رنگ‌آمیزی گرم، تشکیل اسپور، تست کاتالاز، تست بی هوازی مطلق (در اینجا جهت تمایز جنس *Bacillus* از جنس *Clostridium* از جار بی‌هوازی استفاده شد) بودند.

تست‌های بیوشیمیایی مربوط به *لاکتوباسیلوس‌ها* 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 باکتری ها، ذخایر خالص سازی 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 می دهد (Verschuere *et al*., 2000). بنابراین در تحقیق حاضر جهت بررسی توان تولید متابولیت های ضد باکتریایی و دارا بودن خواص آنتاگونیسم در ب رابر باکتری های بیماری زا از ۲ باکتری بیماری زا شامل [ATCC:700104] *Vibrio harveyi* و [ATCC:33953T] *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 پلیت های خالص کشت داده شد. صفحه‌های دایره‌ای کاغذ صافی به متابولیت های حاصل

Archive of SID
www.SID.ir

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 براث 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 سوپرناتنت 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 بازدار نده 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 بیماری زا بودند به عنوان باکتری های کاندید برای پروبیوتیک شدن مدنظر قرار گرفتند. برای بررسی کمی خواص آنتاگونیسم نیز، قطر منطقه بازدارنده رشد در اطراف دیسک اندازه گیری 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 جد ایه‌های 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 بی هوازی مطلق و عدم رشد جدایه ها 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 باکتری های 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,.....B_{10}) جداسازی، خالص‌سازی و کدگذاری گردید.

جدول۱: 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	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲: مشخصات بیوشیمیایی جدایه‌های لاکتوباسیلوس حاصل از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲).

آزمایش تشخیصی	L_1	L_2	L_3	L_4
رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+	+
تشکیل اسپور	–	–	–	–
رنگ‌آمیزی اسید فست	–	–	–	–
کاتالاز	–	–	–	–
هیدرولیز آرژنین	+	+	+	+

(الف)

(ب)

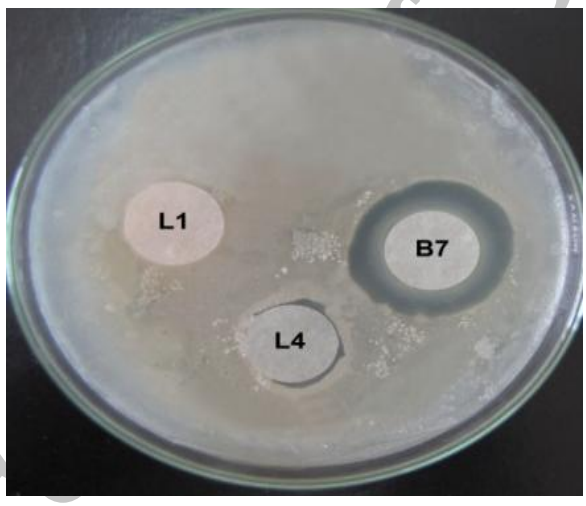
شکل ۱: تست بی‌هوازی مطلق در جدایه‌های *باسیلوس* (الف) و تست هیدرولیز آرژنین در جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* (ب) جداسازی شده از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده در بندر دیلم (بهار ۱۳۹۲).

در مورد تست هیدرولیز آرژنین، لوله سمت راست همان محی ط 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 B_2, B_3, B_5, B_7, B_8 و B_9 و ۲ جدایه *لاکتوباسیلوس* شامل جدایه‌های L_3 و L_4 توانستند در روش انتشار د یسک 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 جدایه های B_7 و L_3 توانایی مهار هر دو نوع باکتری بیماری زا یعنی *ویبریو*

www.SID.ir

هارویی و *الیزابتکینگیا مننگوسپتیکا* 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). همان طور که نتایج این مرحله نیز نشان می دهد، باکتری B_7 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 مننگوسپتیکا* 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 B_7 و L_4 مشاهده گردید که اختلاف معنی داری با هم داشتند ($P<0/05$) (شکل ۲ و جدول ۳). در مورد فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری بیماری زای *الیزابتکینگیا مننگوسپتیکا* نیز بیشترین و کمترین قطر بازدارندگی به ترتیب در جدایه های B_9 و B_2 وجود داشت که آن ها نیز اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P<0/05$) (جدول ۳). در مرحله رشد تصاعدی، فقط جدایه‌های B_3 و B_9 دارای فعالیت بازدارندگی بودند و از لحاظ قطر بازدارندگی، جدایه B_3 به میزان $0/3\pm0/1^a$ سانتی‌متر و جدایه B_9 به میزان $0/4\pm0/1^a$ سانتی‌متر در مرحله رشد تصاعدی توانستند به ترتیب از رشد باکتری *ویبریو هارویی* و *الیزابتکینگیا مننگوسپتیکا* جلوگیری نمایند که اختلاف معنی داری نیز میان جدایه های مذکور از لحاظ میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد وجود نداشت (جدول ۴).



شکل۲: 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_1	L_2	L_3	L_4
V. harveyi	–	–	$2/1\pm0/2^a$	$1/9\pm0/3^b$
meningoseptica.E	–	–	$1/7\pm0/4^{ab}$	–

ب)

	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7	B_8	B_9	B_{10}
V. harveyi	–	–	$2/5\pm0/2^a$	–	–	–	$2/6\pm0/4^a$	$2/3\pm0/2^a$	–	–
meningoseptica.E	–	$1/0\pm0/3^b$	–	–	$2/0\pm0/2^a$	–	$2/2\pm0/3^a$	–	$2/4\pm0/5^a$	–

www.SID.ir

*اختلاف بین آن دسته از داده‌هایی که دارای حرف انگلیسی مشترک نیستند، معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵). اعداد موجود در جدول نشان‌دهنده میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد برای هر کدام از جدایه هایی که دارای فعالیت آنتاگونیسم بوده‌اند به همراه خطای استاندارد می باشد. 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	
–	–	–	–	*V. harveyi*
–	–	–	–	*meningoseptica.E*

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]	–	–	*V. harveyi*
–	۰/۴±۰/۱[a]	–	–	–	–	–	–	–	–	*meningoseptica.E*

*اختلاف بین آن دسته از داده هایی که دارای حرف انگلیسی مشترک نیستند، معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵). اعداد موجود در جدول نشان دهنده میانگین قطر منطقه بازدارنده رشد برای هر کدام از جدایه هایی که دارای فعالیت آنتاگونیسم بوده اند به همراه خطای استاندارد می باشد. به منظور کاهش خطا، این آزمون در مورد هر جدایه ۱۰ بار تکرار گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

همان گونه که قبلاً نیز اشاره گردید بر طبق نظر بسیاری از محققین مبنی بر پتانسیل بالای باکتری های *باسیلوس* و *لاکتوباسیلوس* جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک در آبزی پروری، این باکتری ها به عنوان باکتری های هدف برای جداسازی در نظر گرفته شدند . در ماهیان دریایی فلور باکتریایی دستگاه گوارش بین گونه های مختلف متفاوت است (Ringo and Birkbeck, 1999) و فاکتورهای متفاوتی ازجمله 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 باکتری های *Micrococcus*،*Pseudomonas*،*Bacillus*،*Acinetobacter*، *Vibrio*،*Achromobacter* و خانواده *Enterobacteriaceae* هستند (Ringo and Strom, 1994). البته باکتری‌های گرم مثبت همانند باکتری‌های اسیدلاکتیک نیز به طور معمول از روده ماهی جداسازی شده اند (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 شده است (Stroband and Kroon, 1981; Olafsen, 2001) که بیشتر این باکتری های اسیدلاکتیک از جنس *لاکتوباسیلوس* می باشند. به علاوه گزارشاتی موجود است که

Archive of SID
www.SID.ir

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 باکتری های جنس *لاکتوباسیلوس* (L_1, L_2, L_3, L_4) و ۱۰ جدایه از باکتری های جنس *باسیلوس* (B_1, B_2,..... B_{10}) با استفاده از خصوصیات ظاهری کلونی ها در کشت‌های اختصاصی و همچنین بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و انجام تست‌های بیوشیمیایی (شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست بی هوازی مطلق و استفاده از جار بی هوازی 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 روده ی ماهیان هامور جوان تند رشد و کند رشد را مورد بررسی قرا ر 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, Nocardioides sp.* بودند. در راستای متمایز کردن جدایه های 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 می شود که در ترکیب روده ای ماهی هامور باکتری *لوکونوستوک* وجود ندارد. بنابراین می توان با توجه به تست های بیوشیمیایی صورت گرفته و نیز با استناد به نتیجه حاصل از بررسی‌های محقق مذکور در رابطه با فلور باکتریایی روده ماهی هامور، یقین حاصل کرد که باکتری جداسازی شده، *لاکتوباسیلوس* بوده است و به واسطه تست های بیوشیمیایی صورت گرفته در این تحقیق، جنس *لاکتوباسیلوس* از دیگر با کتری‌های میله ای گرم مثبت که قادر به تشکیل اسپور نیستند نظیر گونه های *کورینه‌باکتریوم* و *مایکوباکتریوم* و نیز جنس *لوکونوستوک* متمایز گردید.

با توجه به این که در آبزی پروری انتخاب پروبیوتیک ها معمولاً بر پایه توانایی آنتاگونیسمی آن ها در شرایط آزمایشگاهی د ر 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 پاتوژن ها در معرض تولیدات خارج سلولی کاندیداهای پروبیوتیک قرار می گیرند) یک گام مهم در غربالگری پروبیوتیک‌های بالقوه مطرح شده است (Gildberg *et al.*, 1995 and 1997) و انتخاب پروبیوتیک‌های داوطلب بر اساس تست های آنتاگونیسم در شرایط آزمایشگاهی معمولاً به یافتن پروبیوتیک‌های مؤثر منجر می‌شود (Verschuere *et al.*, 2000). از این رو در گامی جهت غربالگری باکتری های پروبیوتیکی بالقوه، توان تولید متابولیت های ضد باکتریایی جدایه های 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 *ایرایتکینگیا منینگوسپتیکا* [ATCC:33953T] استفاده شد. فرض بر این است که باکتری های مفیدی که بتوانند در شرایط آزمایشگاهی از رشد باکتری های بیماری‌زا جلوگیری نمایند، احتمالاً خواهند توانست در شرایط موجود در بدن آبزی نیز رقابت بهتری با عوامل بیماری زا داشته باشند. لازم به ذکر است که بدانیم به طور معمول عوامل بیماری زا رشد سریعی دارند (Andrews and Harris, 1986). به همین دلیل اگر شاخصه های خاصی از رشد یک پروبیوتیک بهتر از باکتری های بیماری‌زا باشد، این امکان وجود دارد که بتواند در دستگاه گوارش کلونی سازی کرده و از رشد باکتری‌های بیماری زا یا فرصت‌طلب جلوگیری کند. در واقع باکتری‌ها برای تشکیل کلونی در روده، ابتدا باید بتوانند به موکوس دستگاه گوارش آبزی متصل شوند (Ringo *et al.*, 2007). مشاهدات

Archive of SID
www.SID.ir

این محققین حاکی از آن است که اتصال یک گروه باکتریایی منجر به تغییراتی در سطح موکوس پوششی روده می شود 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 غربی انجام دادند در برگیرنده تولید یک ناحیه وسیع عدم رشد در مقابل باکتری های بیماری‌زا آبزیان 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 گو نه *باسیلوس* را به عنوان پروبیوتیک روی میگوی ببری سیاه نشان دادند . Domrongpokkaphan و Wanchaitanawong (۲۰۰۶) نیز جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی گونه های *باسیلوس* بر علیه گونه‌های پاتوژن *Vibrio* (*V. harveyi* VHY02، *V. harveyi*VHG03، *V. alginolyticus*VA01، *V. parahaemolyticus*VP02) در میگوی ببری سیاه، بیست و پنج نمونه از گونه های *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 گونه های *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 ازهپاتوپانکراس میگوی ببری سیاه، یک منطقه وسیع از مهار را در برابر گونه های *ویبریو* تولید کردند. *باسیلوس* B_{17} و *باسیلوس* B_{21} به تعداد ۵×۱۰^{۷} واحد کلونی در هر میلی لیتر، کافی بودند برای این که به طور کامل *V. harveyi*VHG03 را در عرض ۱۲ ساعت سرکوب کنند و *باسیلوس* B_{25} تنها قادر به کاهش دادن *V. harveyi*VHG03 کمتر از گروه کنترل بود. این محققین نشان دادند که به طور کلی جدایه های *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 جدایه های *لاکتوباسیلوس* را در برابر پاتوژن های میگوی ببری سیاه در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. این آزمایش نشان داد که *لاکتوباسیلوس* L_2 به تعداد ۱×۱۰^{۶} واحد کلونی در هر میلی لیتر، 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 می توانند به عنوان پروبیوتیک‌های بالقوه در سیستم آبزی پروری میگوها جهت کنترل عفونت‌های باکتریایی به کار برده شوند.

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

نتایج مطالعه حاضر نیز نشا ن 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 جدایه های B_7 و L_3 توانایی مهار هر دو نوع باکتری بیماری زا را از خود نشان دادند . به علاوه این جدایه های باکتریایی کاندید برای پروبیوتیک شدن، توانستند به میزان تقریباً ۱ تا ۲/۶ سانتی‌متر از رشد باکتری های 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 (۰/۴±۲/۶) و L_4 (۰/۳±۱/۹) مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P<۰/۰۵$). در مورد فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری بیماری زای *الیزابتکینگیا منینگوسپتیکا* نیز بیشترین و کمترین قطر بازدارندگی به ترتیب در جدایه های B_9 (۰/۵±۲/۴) و B_2 (۰/۳±۱/۰) وجود داشت که آن‌ها نیز اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P<۰/۰۵$).

Archive of SID
www.SID.ir

بنابراین آن چه از نتایج استنباط می شود این است که *باسیلوس‌ها* از لحاظ فعالیت‌های بازدارندگی و به عبارتی ممانعت از رشد باکتری های بیماری‌زا در مقایسه با *لاکتوباسیلوس‌ها* همواره فعال‌تر بودند و قطر هاله عدم رشد بیشتری در برابر باکتری های بیماری‌زا تولید نمودند. از بین جدایه‌های دارای فعالیت ضد باکتریایی، جدایه B_7 از *باسیلوس‌ها* و جدایه L_3 از *لاکتوباسیلوس‌ها* که بیشترین فعالیت بازدارندگی را داشتند و در این زمینه فعال تر از دیگر جدایه ها عمل کردند و نیز از رشد هر دو نوع باکتری بیماری زا ممانعت نمودند، جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک برای آبزیان دارای ارجحیت می باشند و ترکیبات تولید شده توسط این باکتری ها، احتمالاً پتانسیل مهار پاتوژن های باکتریایی را در سیستم آبزی پروری دارا می باشند. این موضوع به وسیله نتایج تحقیقاتی که *باسیلوس سوبتیلیس* را به عنوان تولید کننده ترکیبات ضد باکتریایی و ضد جلبکی گوناگون و وسیعی نشان داده اند نیز تأیید می‌گردد (Zokaeifar *et al*., 2012). بنابراین استفاده از این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک های بالقوه در سیستم آبزی پروری جهت مقابله با باکتری های بیماری‌زا می‌تواند از شیوع بیماری های مرتبط با آن و نهایتاً از میزان مرگ و میر آبزیان بکاهد . همان گونه که در بخش نتایج ن یز مشخص شد در مورد کلیه باکتری های 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 می دهند. این مسئله می‌تواند به دلیل حداکثر بودن تعداد باکتری ها 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.

Domrongpokkaphan, 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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.

Lauzon, H. L., Gudmundsdottir, S., Pedersen, M. H., Budde, B. B. and Gudmundsdottir, B. K., 2008. Isolation of putative probionts 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., Myklebustd, R., Mayhewe, 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 quarantaine. 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir