15(4) 99-110, Winter 2024

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Isolation and biochemical identification and evaluation of antimicrobial activity of bacteria isolated from the intestine of marine fishes in southern Iran

Noroalah Sheikh Azadi [1], Takavar Mohammadian[*1,2], Mehrzad Mesbah [1,2], Daroush Gharibi [2,3], Seyd Reza Seyed Mortezaei [4]

[1] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[2] *Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[4] *Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran*

Key Words

Antimicrobial activity
Probiotic
Marine Fish enzymes
Bile salts

Abstract

Introduction: In recent years, the use of dietary supplementation with probiotic bacteria has been interested in the aquatic farming. The objective of this study was to isolate of lactic acid bacteria with probiotic potential from the intestine of the marine fish under in invitro condition and based on probiotics characteristics.

Materials & Methods: For this purpose, marine fish samples weighing 300- 700 gr from active farms were taken from the marine environment of Bushehr, Hormozgan and Khuzestan provinces. Bacterial isolates were collected from 50 marine fish intestine. In total, 10 strains were isolated in MRS agar media. The isolates were evaluated and ranked based on the probiotic indication tests (bacterial antagonistic property, adhesion abilities to mucus, growth in intestine mucus, Hydrophobicity, salinity, pH, temperature and bile salt resistance, Extracellular enzyme production and the lack of pathogencity to aquatic).

Results: The probiotic potency of these 10 isolates was compared and finally 3 isolates including P1, B6 and L2 were selected as the highest potent probiotic property. The final identification of the selected strains was done by sequencing of 16 S rRNA gene after assurance the absence of resistance genes for streptomycin, tetracycline and fluorophenicol antibiotics. After the sequencing the 3 isolates were identified as strains of *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentoseous* respectively. The sequences of these isolates had a 99 to 100 percent identity with the nucleotide sequences published in the Gene Bank database. These strains had the ability to resist in the temperature of 10 to 37° C, salinity 0 to 30 g ppt and pH 3 to 9 values. Also, these bacteria had suitable Adhesion to mucus, growth in intestine mucus, Hydrophobicity, antimicrobial activity against *Yersinia ruckeri, Aeromonas hydrophila, streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* and were resistant to bile salts. These strains had any enzymes such as lipase, amylase and protease activity.

Conclusion: Based on the results of this study, after in vivo studies, these isolates can be used for the purposes of probiotic in aquaculture, especially marine fish culture industry in the study area.

* Corresponding Author's email: t.mohammadian@scu.ac.ir
Received: 4 November 2022; Reviewed: 6 December 2022; Revised: 7 February 2022; Accepted: 12 March 2022
(DOI): 10.2s2034/AEJ.2023.382341.2926

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های جدا شده از روده ماهیان دریایی جنوب ایران

نورالله شیخ‌آزادی[۱]، تکاور محمدیان[*۱،۲]، مهرزاد مصباح[۱،۲]، داریوش غریبی[۳،۲]، سیدرضا سیدمرتضایی[٤]*

[۱] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[٤] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

فعالیت ضدمیکروبی
پروبیوتیک
ماهیان دریایی
نمک‌های صفراوی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، استفاده از مکمل‌های غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک در صنعت پرورش ماهیان دریایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از بررسی حاضر جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک و بررسی قابلیت پروبیوتیکی باکتری‌ها در شرایط برون‌تنی از روده ماهیان دریایی بود.

مواد و روش‌ها: به این منظور نمونه‌های ماهیان دریایی با وزن ۳۰۰ تا ۷۰۰ گرم از محیط دریایی سه استان بوشهر، هرمزگان و خوزستان تهیه گردید. جدایه‌های باکتریایی از ۵۰ نمونه روده ماهیان مختلف جداسازی شدند. از مجموعه نمونه‌برداری‌های انجام شده ٤٤ جدایه در محیط‌های کشت اختصاصی ام آر اس آگار جداسازی شدند. این باکتری‌ها براساس شاخص‌های اولیه پروبیوتیکی شامل: خاصیت ضدمیکروبی، مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی و عدم بیماری‌زایی برای ماهیان دریایی امتیازدهی و ارزیابی شدند.

نتایج: در نهایت ۱۰ جدایه با توان پروبیوتیکی جدا شد که ۳ جدایه (P۱، B٦ و L۲) دارای پتانسیل بالاتری جهت معرفی به‌عنوان پروبیوتیک بودند. شناسایی نهایی جدایه‌های انتخابی براساس توالی‌یابی حاصل از ژن ١٦S rRNA صورت گرفت. هر ۳ جدایه بعد از توالی‌یابی سویه‌هایی از به‌ترتیب لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس پنتوسئوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم مشخص گردیدند. این توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن دارای قرابت ۹۹ تا ۱۰۰ درصد بودند. باکتری‌های مورد نظر قادر به تحمل محدوده اسیدی (۳ تا ۹)، صفرا (۱/۲۵ تا ۳/۷۵ درصد) به نسبت وسیعی بودند. هم‌چنین از لحاظ خاصیت ضدمیکروبی نسبت به عوامل بیماری‌زای یرسینیا روکری، آئروموناس هیدروفیلا، استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گارویه مناسب بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: لذا براساس نتایج این تحقیق، از این جدایه‌ها پس از بررسی‌های درون‌تنی، می‌توان جهت اهداف پروبیوتیک در صنعت پرورش آبزیان به‌خصوص ماهیان دریایی پرورشی در منطقه مورد مطالعه استفاده نمود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: t.mohammadian@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳ آبان ۱٤۰۱؛ تاریخ داوری: ۱۵ آذر ۱٤۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۱۸ بهمن ۱٤۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ اسفند ۱٤۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.382341.2926

مقدمه

پرورش آبزیان به‌عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود. کمبود منابع آبی سبب شده است که در اکثر کشورها پرورش آبزیان در دریا، بسیار مورد توجه قرار بگیرد. آبزی‌پروری بیش‌ترین رشد را در میان صنایع تولید غذای حیوانی دارا می‌باشد، به‌طوری‌که با این روند روبه رشد می‌تواند از صید و صیادی که یکی از منابع تامین غذای دریایی (ماهی) است، پیشی بگیرد. توجه به پرورش ماهیان دریایی راهکاری موثر جهت تنوع بخشیدن به تعداد گونه‌های آبزیان پرورشی و گسترش صنعت آبزی پروری کشور محسوب می شود. توسعه پایدار آبزی پروری باید با چالش‌های زیادی مانند پیشگیری از بیماری‌ها، بهبود رشد، مقاومت در برابر عوامل بیماری زا و تعدیل ایمنی مواجه شود. بیماری ها تهدیدهای کلیدی برای آبزی‌پروری هستند که می‌توانند باعث مرگ و میر بالا در ماهیان پرورشی شود. به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی و هم‌چنین به‌عنوان یک اقدام پیش‌گیرانه یا درمان بیماری‌های ماهی بحث‌برانگیز بوده است گزارشات متعددی از بروز مقاومت ضدمیکروبی و خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان وجود دارد. از سوی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مهار و از بین بردن میکروبیوتای طبیعی و مفید و هم‌چنین اثرات طولانی مدت و غیرقابل پیش‌بینی بر سلامت عموم می‌شوند. از این‌رو نیاز به روش‌های جایگزین بیش از پیش ضرورت می یابد. یکی از مهم‌ترین روش‌های ارتقای سلامت، افزایش رشد و کنترل بیماری و عوامل بیماری‌زا در صنعت آبزی‌پروری استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی است (۴۱، ۶۱). مکانیسم‌های متعددی در توضیح اثرات مفید پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است که ازجمله آن ها اثرات آنتاگونیستی نسبت به پاتوژن‌ها، رقابت برای جایگاه‌های اتصالی، رقابت برای مواد غذایی، کمک به هضم مواد غذایی، تولید باکتریوسین و سیدروفور، بهبود کیفیت آب و تحریک پاسخ های ایمنی میزبان می‌باشد (۵۳). باکتری های پروبیوتیک موجود در دستگاه گوارش ماهی، سبب افزایش ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان می شوند که در نهایت منجر به افزایش قابلیت هضم چربی‌ها و پروتئین‌های موجود در جیره غذایی شده و کارایی تغذیه و متعاقب آن رشد را در ماهی میزبان به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (۶۵). مفهوم باکتری های اسیدلاکتیک به حدود ۹۰ سال پیش بر می گردد. محصول نهایی در تخمیر گلوکز، اسیدلاکتیک است و باکتری هایی که این عمل را انجام می دهند باکتری های اسیدلاکتیک هستند (۴۰). این باکتری ها به صورت عمومی در دستگاه گوارش انسان و حیوانات خشکی وجود دارند و به‌ندرت دیده شده فرصت‌طلب باشند (۲). باکتری‌های اسیدلاکتیک، مهم ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده که شامل باکتری‌های متنوعی مثل لاکتوباسیل است. لاکتوباسیل‌ها، باسیل‌های گرم مثبت، بدون حرکت، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی‌اند، که قندهای مختلف را به لاکتات و استات تبدیل می‌کنند (۳، ۴). اکثر لاکتوباسیل‌ها بی‌خطر بوده و ممکن است، آنتاگونیست باکتری‌های پاتوژن باشند (۴، ۱۲). لاکتوباسیل‌های با مقاومت بالا به اسید و صفرا و دارا بودن خواص ضدمیکروبی قوی، می‌توانند کاندید مناسبی برای تهیه مکمل‌های پروبیوتیکی باشند. ماهیان استخوانی پیشرفته بزرگ‌ترین گروه از مهره‌داران را تشکیل می‌دهند و برخی از گونه‌های تلئوستی از جمله ماهی باس دریایی آسیایی ((Asian seabass (*Lates calcarifer*) از اهمیت فراوانی از جنبه شیلات و آبزی‌پروری برخوردارند. پرورش ماهی بارامونده در چند دهه اخیر به‌عنوان یکی از گونه‌های ماهیان دریایی با موفقیت زیادی همراه بوده است و مطالعات زیادی در مورد زیست‌شناسی، تکثیر، پرورش و بهداشت این ماهی انجام شده است (۲۵). در حال حاضر میزان تولیدات آبزی‌پروری این گونه در سطح جهانی بیش از ۷۰ هزارتن است (۱۶). در ایران تحقیقات صورت‌گرفته بیش‌تر در مورد اثر پروبیوتیک‌های تجاری مختلف بر پارامترهای مختلف رشد، بقاء و تولیدمثل می باشد هم چنین مطالعاتی در زمینه جداسازی باکتری‌های با توان پروبیوتیک از بعضی ماهیان صورت گرفته است. Fard Qoljaei و همکاران (۱۶) و Makvandi و همکاران (۳۰) اثر باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش باربوس ماهیان، روده قزل‌آلای رنگین‌کمان و میگووانامی بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی ماهیان مورد بررسی را ارزیابی کردند. جداسازی باکتری‌ها با توان پروبیوتیکی از ماهی باس دریایی به‌روش کواروم کونچینگ را انجام دادند و باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس توروجنسیس جدا گردید (۴۵). این تحقیق به‌منظور جداسازی و شناسایی چنین جدایه‌های از این باکتری از روده ماهیان دریایی جنوب کشور که از ماهیان بسیار با ارزش ایران و برخی کشورهای هم‌جوار ایران است، صورت گرفت. از نتایج مطالعه حاضر می‌توان در تهیه مکمل‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در پرورش ماهیان دریایی به‌خصوص باس دریایی و شاید سایر آبزیان بهره برد و زمینه تولید بیش‌تر این آبزیان ذائقه‌پسند را فراهم نمود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌های با خواص پروبیوتیکی:

جهت جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از روده ماهیان باس دریایی از سه منطقه آب‌های ساحلی ایران (استان هرمزگان، استان بوشهر،

استان خوزستان برای ماهی باس دریایی) تعداد ۵۰ قطعه ماهی با وزن‌های مختلف (با میانگین وزن ۲۰۰±۵۰۰ گرم) و ظاهری سالم به‌طور تصادفی صید و با رعایت شرایط استاندارد در اسرع وقت به نزدیک‌ترین آزمایشگاه میکروبیولوژی در منطقه منتقل شدند. تعداد ۲۰ قطعه ماهی از ماهیان پرورشی، واقع در ایستگاه تحقیقاتی بندر امام نیز جهت جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از روده ماهیان باس دریایی مورد بررسی قرار گرفتند. ماهی‌ها آسان کشی شده، وزن و طول آن‌ها، به‌طور دقیق اندازه‌گیری و ثبت شد. روده ماهی در شرایط استریل، در کنار شعله، خارج و در جهت طولی برش داده شد. محتویات روده را خارج کرده و داخل روده با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. مقدار ۱ گرم از بافت هموژن شده روده (در هاون چینی) به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا سوسپانسیون ۱:۱۰ آن به‌دست آید. به‌همین ترتیب رقت‌های بر مبنای ۱۰ از نمونه اولیه تهیه شد. بعد از مشخص شدن بهترین رقت، نمونه به محیط کشت‌های ام آر اس آگار (جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک) و کانامایسین اسکولین آزایدآگار (جهت جداسازی باکتری‌های جنس انتروکوکوس) افزوده‌و در سطح محیط تلقیح گشت. گرم‌خانه گذاری تمام پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراددر جار بی‌هوازی جهت باکتری‌های اسیدلاکتیک و گرم‌خانه گذاری در اتمسفر معمولی جهت سایر باکتری‌ها انجام شد و سپس از کلنی‌های مشکوک ساب کالچر تهیه شده و مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) انجام گرفت. باکتری‌های شناسایی‌شده در شیر پس‌چرخ ۱۰ درصد و در بروودت ۷۰- درجه‌سانتی‌گراد تازمان آزمایش‌های مربوط نگه‌داری شدند.

آزمایشات سنجش مربوط به فعالیت پروبیوتیکی جدایه‌های باکتریایی

تحمل جدایه‌های باکتریایی نسبت به نمک‌های صفراوی: جهت سنجش تحمل جدایه‌های به‌دست‌آمده نسبت‌به صفرا از روش Nikoskelainen و همکاران استفاده شد (۳۹). بدین‌منظور نمک‌های سدیم‌دئوکسی کولات و دئوکسی کولات به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط شدند و محلول ۱/۲۵، ۲/۵ و ۳/۷۵ درصد نمک‌های صفراوی در PBS تهیه شده و در اتوکلاو استریل گردید. در ادامه از هر یک از جدایه‌های به‌دست آمده سوسپانسیونی معادل غلظت ۴ استاندارد مک فارلند (۱/۲×۱۰^{۹} CFU/ml) تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول نمک‌های صفراوی در یک میکروتیوب استریل افزوده شد و با ورتکس به خوبی مخلوط گردید. سپس میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری گردیدند. پس از گذشت زمان مورد نظر رقت‌های متوالی از سوسپانسیون تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از رقت ۵-۱۰ (انتخاب رقت پس از بررسی‌های اولیه و اطمینان از قابل شمارش بودن پرگنه‌ها بودن‌صورت گرفت) آن در ۳ تکرار بر محیط کشت‌های ام آر اس آگار یا TSA (بسته به نوع جدایه) کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند (پلیت‌های حاوی محیط کشت ام آر اس آگار در جار بی‌هوازی قرار داده شدند). پس از طی دوره گرم‌خانه گذاری، تعداد پرگنه‌های باکتریایی رشدیافته در پلیت‌ها شمارش و با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد نمک صفراوی) مقایسه گردید.

تحمل جدایه‌های باکتریایی نسبت به pH: جهت بررسی تحمل نسبت به شرایط مختلف pH، ابتدا از هر یک از جدایه‌ها سوسپانسیونی معادل غلظت ۴ استاندارد مک فارلند (CFU/ml ۱/۲×۱۰^{۹}) تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به ۹۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات با pH های مختلف (۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶، ۷/۵ و ۹) اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۲۰). پس‌ازگذشت زمان‌مورد نظررقت‌های متوالی از سوسپانسیون تهیه‌شدو ۱۰ میکرولیتراز رقت ۱۰-۵ (انتخاب رقت پس از بررسی‌های اولیه و اطمینان از قابل شمارش بودن پرگنه‌ها بودن‌صورت گرفت) آن در سه تکرار بر محیط کشت‌های ام آر اس آگار یا عمومی کشت داده شد و سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند. پلیت‌های حاوی محیط کشت ام آر اس آگار در جار بی‌هوازی قرار داده شدند. پس از طی دوره انکوباسیون، تعداد پرگنه‌های باکتریایی رشد یافته در پلیت‌ها شمارش گردید

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باکتریایی: ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باکتریایی علیه باکتری‌های بیماری‌زا به‌روش زیر انجام گرفت: روش کشت خطی: جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های جدا شده، با کمی تغییرات استفاده شد (۲۴). به‌طور خلاصه، ابتدا کشت ۱۸ ساعته جدایه‌های باکتریایی مشکوک به‌فعالیت پروبیوتیکی در محیط‌های آبگوشت ام‌آر‌اس (برای باکتری‌های اسیدلاکتیک) و یا TSB (جدایه‌های به‌دست آمده از محیط‌های ام و ای پی آگار و کانامایسین اسکولین آزایدآگار) تهیه شد. سپس با کمک لوپ، یک لوپ کامل از سوسپانسیون باکتریایی به‌صورت یک خط عمود در مرکز پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۱/۵ درصد نمک کلرید سدیم (جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی علیه ویبریو هاروی) و محیط بدون نمک مولر هینتون آگار (جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی بقیه باکتری‌های بیماری‌زا: یرسینیا روکری،

آئرومونا‌س هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه) کشت داده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی (جهت باکتری‌های اسیدلاکتیک) و هوازی جهت سایر جدایه‌های باکتریایی گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌های بیماری‌زا در محیط TSB (حاوی نمک ۱/۵ درصد جهت ویبریو هاروی و محیط بدون نمک جهت سایر باکتری‌ها) عمود بر کشت قبلی باکتری‌های مورد آزمایش کشت داده شده در محیط‌های مولر هینتون با و بدون نمک تا ۱ میلی‌متری آن (در سه تکرار) کشت داده شد. پلیت‌ها مجددا به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و منطقه مهار رشد (فاصله بین باکتری مشکوک به فعالیت پروبیوتیکی مورد آزمایش و باکتری‌های بیماری‌زا) با خط‌کش اندازه‌گیری و نتایج مربوط به سه تکرار هر یک از جدایه‌ها ثبت گردید.

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی واجد بیش‌ترین توان پروبیوتیکی: جهت تعیین هویت مولکولی باکتری‌های واجد بهترین و بیش‌ترین توان پروبیوتیکی پس از استخراج DNA آن‌ها به‌روش جوشاندن، از پرایمرهای عمومی ژن مربوط به ژن 16S rRNA باکتریایی استفاده گردید. تکثیر 16S rRNA ریبوزومی با استفاده از زوج پرایمرهای عمومی باکتریایی با توالی نوکلئوتیدی زیر صورت گرفت:

۶۸۵ R: 5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′

۲۷ F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′

در یک مخلوط واکنشی در حجم ۲۵ میکرولیتر که حاوی مسترمیکس به‌میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، آغازگرهای پیشرو و معکوس (غلظت ۱۰ میکرومولار) هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر، DNA الگو ۴ میکرولیتر و آب مقطر ۶/۵ میکرولیتر بود، انجام شد. برنامه دمایی PCR نیز بدین‌ترتیب انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات تکثیر شده در ژل آگاروز حاوی ۱/۵ درصد رنگ ایمن، الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفتند. متعاقباً ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی مربوطه توسط نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷.۰.۴.۱ مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت سکانس نوکلئوتیدی توالی‌های به دست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژنی NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) موردمقایسه قرار گرفت.

بررسی تاثیر جانبی پروبیوتیک‌های جدا شده در ماهی باس دریایی آسیایی: اثرات مضر احتمالی باکتری‌های جدا شده با حداکثر توان پروبیوتیکی از دستگاه گوارش ماهیان دریایی اندازه‌گیری شد (۵۴). بدین‌منظور کشت جدایه‌های مورد نظر در محیط آبگوشت ام آر اس صورت گرفت و پس از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محیط کشت از آن خارج گردید و سپس به آن PBS افزوده شد و سانتریفیوژ شد. این مرحله ۲ بار انجام گرفت و هر بار PBS پس از سانتریفیوژ دور ریخته شد. پس از آن سپس ماهیان سی‌باس به‌روش تزریقی در معرض باکتری‌های پروبیوتیکی با غلظت 10^9 (CFU/ml) قرار گرفتند. ماهیان گروه کنترل در معرض باکتری پروبیوتیکی قرار نگرفتند. نگه‌داری ماهیان در تانک‌های ۳۰۰ لیتری که در هر مخزن ۲۰ قطعه ماهی قرار داده شد، انجام شد. بازماندگی ماهیان هر ۲۴ ساعت و به‌مدت ۷ روز مورد بررسی قرار گرفت.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون shapiro wilk انجام گردید و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) استفاده شد، هم‌چنین مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس پس آزمون دانکن (Duncan's Multiple range Test) انجام شد و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتریایی از روده ماهیان دریایی: پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از گرمخانه گذاری پلیت‌های کانامایسن اسکولین آزاید آگار و ام آر اس آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از پرگنه‌های رشد یافته کشت مجدد تهیه شد و پس از انجام آزمایش‌های کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌ها جهت آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (جداول ۱ و ۲). پرگنه باکتری‌های اسیدلاکتیک رشد یافته در محیط کشت ام آر اس آگار سفید مایل به کرم با اندازه‌های ریز، متوسط تا نسبتاً درشت بودند (شکل ۱)، که پس از رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ به شکل باکتری‌های میله‌ای با اندازه متوسط یا کروی و گرم مثبت دیده شدند (شکل ۲). این باکتری‌ها کاتالاز منفی، اکسیداز منفی و بدون حرکت بودند.

جدول ۱: تعداد و نسبت باکتری‌های جدا شده از روده ماهی باس دریایی

کل جدایه‌ها	باکتری‌های اسیدلاکتیک	
تعداد کل (جدایه)*	تعداد (جدایه)	درصد
۴۴	۱۰	۲۲/۷۲

*جدایه‌های باکتریایی از ۵۰ قطعه ماهی باس دریایی

جدول ۲: تعداد جدایه‌های به‌دست آمده و برخی خصوصیات آن‌ها

باکتری	شکل	کاتالاز	اکسیداز	تعداد و شماره جدایه‌های به دست آمده از نمونه‌های مختلف روده ماهی
اسید لاکتیک	باسیل/ کوکسی	-	-	(۱P-۲P-۶P-۸P-B۶-M۹-M۱۰-L۱-L۲-۱۴۰)۱۰

شکل ۱: پرگنه‌های رشد یافته در محیط کشت ام آر اس آگار (نگارنده، ۱۴۰۰)

شکل ۲: باکتری‌های اسیدلاکتیک باسیلی (تصویر سمت چپ مربوط به جدایه L۲) و کوکسی شکل (تصویر سمت راست M۱۰) جدا شده از روده ماهیان دریایی (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر) (نگارنده، ۱۴۰۱).

نتایج سنجش مربوط به فعالیت پروبیوتیکی جدایه‌های باکتریایی

تحمل جدایه‌های باکتریایی نسبت به نمک‌های صفراوی: میزان بازماندگی و رشد جدایه‌های باکتریایی پس از یک ساعت و نیم در حضور نمک‌های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه میان جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در تحمل نسبت به صفرا در غلظت ۱/۲۵ درصد نمک‌های صفراوی دیده شد. اما در دیگر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در جدایه‌های شماره ۱P، ۸P و L۲رشد جدایه‌ها در غلظت ۱/۲۵ نمک‌های صفراوی تحت تاثیر آن قرار گرفته بود. با افزایش غلظت نمک‌های صفراوی با کاهش معنی‌دار رشد باکتری‌ها به استثنای جدایه شماره P۲ مواجهه شدیم (جدول ۳) ($p<0/05$).

جدول ۳: تحمل جدایه‌های باکتریایی دارای بهترین عملکرد پروبیوتیکی بر اساس Log_{10} در غلظت‌های متفاوت نمک‌های صفراوی در مدت زمان یک و نیم ساعت (Means ±SE) (N=۳)

شماره جدایه باکتری	صفرا ۱/۲۵	صفرا ۲/۵	صفرا ۳/۷۵
p۱	۶۷/۳±۲/۵^{a,A}	۹/۳۳±۱/۵۲^{b,B}	۲±۱^{a,B}
P۲	۱۷/۶۶±۱۳/۶۵^{b,A}	۱۶/۶۶±۱/۵۲^{a,A}	۲±۱^{a,B}
p۳	۷/۳۳±۱/۵۲^{c,A}	۰	۰
P۴	۴۴/۳۳±۳/۰۵^{a,A}	۴±۱^{b,B}	۲±۱^{a,B}
B۶	۳۳±۲^{ab,A}	۳/۶۶±۱/۵۲^{b,B}	۱/۶۶±۰/۱۵^{a,B}
M۹	۴±۱^{c,A}	۱±۰^{b,A}	۱±۰^{a,A}
M۱۰	۱/۳۳±۰/۵۷^{c,A}	۲±۱^{b,A}	۱±۰^{a,A}
L۱	۲۵ /۳۳±۱/۵۲^{ab,A}	۲/۳۳±۰/۵۲^{b,B}	۱±۰^{a,B}
L۲	۵۴/۶۶±۲/۵۱^{a,A}	۷±۲^{b,B}	۲±۱^{a,B}
۱۴۰	۳۲/۳۳±۲/۵۱^{ab,A}	۵±۰^{b,B}	۲±۱^{a,B}

*اعداد با حروف لاتین بزرگ یکسان در هر سطر اختلاف معنی‌دار با هم ندارند ($p>0/05$). اعداد با حروف لاتین کوچک یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌دار با هم ندارند ($p>0/05$).

تحمل جدایه‌های باکتریایی نسبت به pH: طی مدت زمان یک ساعت و نیم انکوباسیون جدایه‌های باکتریایی در pH=۱/۵ در هیچ‌کدام از پلیت‌ها پرگنه‌ای مشاهده نشد. در pH=۳ جدایه‌ها که جهت باکتری‌های پروبیوتیک منتخب و دیگر جدایه‌های اسیدلاکتیک انجام شد تعدادی پرگنه در پلیت‌ها مشاهد گردید. ولی در کل نتایج نشان داد که جدایه‌های باکتریایی که تحت تاثیر pH=۳ قرار گرفته بودند بازماندگی‌شان کاهش یافته‌بود. از pH=۴/۵ به بعد رشد جدایه‌ها افزایشی یافت. به طور خلاصه می‌توان گفت در pH=۴/۵ و pH=۶ جدایه‌های اسیدلاکتیک رشد بیش تری داشتند هر چند در برخی موارد نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در pH=۷/۵ رشد اکثر جدایه‌ها شبیه به هم بود و در pH=۹ رشد جدایه‌های اسیدلاکتیک به‌جز جدایه ۱P کاهش یافت. در کل اختلاف معنی‌داری بین رشد باکتری‌ها در pHهای مختلف وجود داشت ($p<0/05$). میان رشد باکتری‌ها در pHهای یکسان نیز تفاوت‌های معنی‌داری دیده شد ($p<0/05$). به‌طوری‌که در بیش‌تر جدایه‌ها کم‌ترین رشد در pH ۱/۵ و ۹ مشاهده گردید (بعد از کاهش رشد در pH=۳ ۵). نتایج مربوط به این آزمایش در جدایه‌های ۱P، M۹، M۱۰، L۲ و ۱۴۰ در جدول ۴ آورده شده است.

جدول۴: تحمل جدایه‌های باکتریایی دارای بهترین عملکرد پروبیوتیکی بر اساس Log_{10} در غلظت‌های متفاوت pH در مدت زمان یک ساعت و نیم (Means ±SE) (N=۳)

شماره باکتری	PH = ۱/۵	PH=۳	PH=۴/۵	PH=۶	PH=۷/۵	PH=۹
P۱	۰	۴±۱^{a,B}	۷/۶۶±۰/۵۷^{a,B}	۸/۶۶±۱/۱۵^{b,B}	۶±۱^{b,B}	۲۳/۳۳±۱/۵۲^{a,A}
P۲	۰	۳/۳۳±۰/۵۷^{a,A}	۲±۰^{c,A}	۶/۶۶±۱/۵۲^{b,A}	۵±۲^{b,A}	/۳۳۳±۱/۵۲^{b,A}
P۶	۰	۳/۳۳±۰/۵۷^{a,A}	۱±۰^{c,A}	۲/۶۶±۰/۵۷^{c,A}	۴/۶۶۶±۰/۵۷^{b,A}	۲/۶۶±۰/۵۷^{b,A}
P۸	۰	۱±۰^{b,A}	۱/۶۶±۰/۵۷^{c,A}	۳±۱^{c,A}	۳/۳۳±۰/۵۷^{b,A}	۵±۱^{b,A}
B۶	۰	۴/۶۶±۱/۵۲^{a,B}	۲/۳۳±۱/۰۲^{c,B}	۷±۲^{b,A}	۲±۱^{b,B}	۳/۳۳±۰/۵۷^{b,B}
M۹	۰	۷±۲^{a,B}	۷/۶۶±۰/۵۷^{a,B}	۱۶/۳۳±۱/۱۵^{a,A}	۵ /۳۳±۱/۵۲^{b,B}	۳±۱^{b,B}
M۱۰	۰	۷±۱^{a,AB}	۱۰±۱^{a,A}	۱۲/۶۶±۱/۵۲^{a,A}	۱۹±۲^{a,A}	۴±۱^{b,B}
L۱	۰	۱±۰^{b,A}	۵ /۶۶±۱/۵۲^{ab,A}	۲±۱^{c,A}	۱/۳۳±۰/۵۷^{b,A}	۳±۱^{b,A}
L۲	۰	۴±۱^{a,B}	۱۰±۱^{a,A}	۲/۳۳±۰/۵۷^{c,B}	۴±۱^{b,B}	۲±۰^{b,B}
۱۴۰	۰	۰	۱۱±۱^{a,A}	۶/۳۳±۱/۱۵^{b,B}	۳±۱^{b,B}	۳±۱^{b,B}

*اعداد با حروف لاتین بزرگ یکسان در هر سطر اختلاف معنی‌دار با هم ندارند (p>۰/۰۵). اعداد با حروف لاتین کوچک یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌دار با هم ندارند(p>۰/۰۵).
نحوه امتیازدهی: تحمل pH تا ۶ امتیاز ۱، تا ۴/۵ امتیاز۲، تا ۳ امتیاز ۳ و تا ۱/۵ امتیاز ۴.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باکتریایی

نتایج آزمایش فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باکتریایی

به‌روش خطی: نتایج آزمایش ضدمیکروبی به‌روش خطی نشان داد که اکثر باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا بودند (شکل ۳). جدایه‌های باکتریایی ۱p، ۲P، ۶P، ۱۴۰ و L۱ به‌ترتیب دارای بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی را در برابر اکثر باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان دادند.

شکل ۳:باکتری اسیدلاکتیک (جدایه L۲) دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا (پرسینیا روکری) (نگارنده، ۱۴۰۱)

از جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک نیز تنها ۲ جدایه M ۱۰ و ۱Pعلیه ویبریو هاروی خاصیت‌ضدمیکروبی‌قوی ازخودنشان دادند که‌خاصیت‌ضدمیکروبی این‌جدایه‌ها با باکتری L۲، تفاوت‌معنی‌داری را نشان داد. جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک ۱P با اندازه منطقه مهار رشد ۵۰/۴۳±۰/۲۵ میلی‌متر، دارای بیش‌ترین اثر ضد میکروبی بر باکتری بیماری‌زای یرسینیا روکری بود. خاصیت ضدمیکروبی این باکتری‌ها از باکتری M۱۰ و M۹ به طور معنی‌داری بیش تر بود (p<۰/۰۵).جدایه ۸p نیز علیه باکتری بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا دارای بیش‌ترین تاثیر ضدمیکروبی بود ولی اختلاف معنی‌داری را با ۲P، ۶P، B۶، L۱ و L۲ از خود نشان نداد (p>۰/۰۵). هم‌چنین بر اساس نتایج به دست آمده بیش ترین خاصیت ضدمیکربی علیه لاکتو کوکوس گارویه مربوط به جدایه ۱P مقدار عددی ۶۰/۴۶±۰/۴ میلی‌متر بود و این جدایه با M۱۰ که کم‌ترین فعالیت ضدمیکروبی بر علیه این باکتری را داشت، اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵). جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک ۱P و L۱ با اندازه منطقه مهار رشد ۵۴/۴۶±۰/۴۶میلی‌متر،دارای بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی بر باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیه بود. خاصیت ضدمیکروبی این باکتری‌ها از باکتری ۲P به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود(p<۰/۰۵). همه جدایه‌های باکتریایی علیه باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس آگالاکتیه بوده و بیش‌ترین تاثیر ضدمیکروبی بود و اختلاف معنی‌داری را از خود نشان نداند (p>۰/۰۵).

جدول ۵: نتایج حاصل از انجام آزمایش بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا (Mean±S.D) (اعداد به سانتی‌متر می‌باشند) (N=۳).

شماره جدایه	ویبریو هاروی	آئروموناس هیدروفیلا	یرسینیا روکری	استرپتوکوکوس آگالاکتیه	لاکتوکوکوس گارویه	استرپتوکوکوس اینیه
۱P	۳/۶۳±۰/۲۵^{A}	۰/۵±۰/۲^{C}	۵/۴۳±۰/۲۵^{A}	۶/۴۳±۰/۳^{A}	۶/۴۶±۰/۴^{A}	۵ /۴۶±۰/۲^{A}
۲P	۲/۵±۰/۲۶^{AB}	۳/۴۶±۰/۳^{AB}	۳/۵۳±۰/۱۵^{AB}	۶/۴±۰/۲^{A}	۳/۳۶±۰/۳^{B}	۲/۵±۰/۳۶^{B}
۶P	۲/۴۶±۰/۲^{AB}	۳/۰۶±۰/۳^{AB}	۴/۷±۰/۲^{A}	۶/۳±۰/۲۶^{A}	۱/۶±۰/۲۶^{BC}	۵ /۰۶±۰/۳^{A}
۸P	۲/۰۶±۰/۲^{B}	۴/۴۳±۰/۳^{A}	۴/۷۳±۰/۲^{A}	۶/۴۳±۰/۲۵^{A}	۳/۲۶±۰/۲^{B}	۵ /۳±۰/۱^{A}
B۶	۱/۶۳±۰/۲۵^{B}	۳/۲۶±۰/۲^{AB}	۴/۳۶±۰/۲۵^{A}	۶/۵۳±۰/۲۵^{A}	۲/۴±۰/۲^{B}	۴/۶±۰/۲۶^{AB}
M۹	۱/۰۶±۰/۳^{BC}	۰/۸±۰/۲^{C}	۲/۵۳±۰/۱۵^{B}	۶/۵۶±۰/۲^{A}	۱/۵۳±۰/۱۵^{BC}	۳/۵±۰/۲^{AB}
M۱۰	۴/۰۳±۰/۲۵^{A}	۲/۳±۰/۲^{B}	۲/۹±۰/۱^{B}	۶/۲۳±۰/۴۵^{A}	۰/۵۳±۰/۱۵^{C}	۴±۰/۲^{AB}
L۱	۲/۰۳±۰/۲۵^{B}	۳/۲۶±۰/۲^{AB}	۴/۴۶±۰/۴^{A}	۶/۴۶±۰/۲۵^{A}	۲/۷۶±۰/۲۵^{B}	۵ /۴۶±۰/۴^{A}
L۲	۰/۷±۰/۲^{C}	۳/۴۶±۰/۱۵^{AB}	۴/۱۳±۰/۱۵^{A}	۵ /۰۳±۰/۲۵^{A}	۲/۶۳±۰/۱۵^{B}	۵ /۳۳±۰/۱۵^{A}
۱۴۰	۲/۰۶±۰/۲^{B}	۲/۲۳±۰/۲۵^{B}	۴/۵±۰/۳^{A}	۶/۴۳±۰/۳۵^{A}	۱/۴±۰/۳^{BC}	۵ /۴±۰/۲۶^{A}

* اعداد در یک ستون با نماهای مشابه اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (p>۰/۰۵). نتایج مربوط به جدایه‌هایی که حداقل در مقابل یک باکتری بیماری‌زا دارای خاصیت ضد میکروبی بوده‌اند در جدول آورده شده است. نحوه امتیازدهی: به ازای خاصیت ضدمیکروبی هر جدایه باکتریایی نسبت به باکتری بیماری‌زا یک امتیاز + به آن تعلق گرفت.

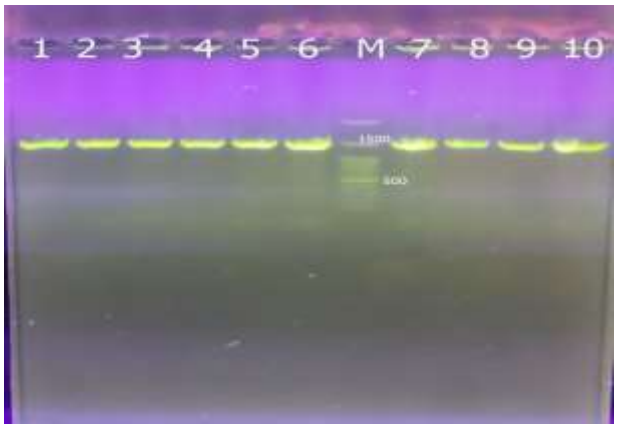
عدم بیماری‌زایی جدایه‌های پروبیوتیکی انتخاب‌شده برای ماهی باس دریایی: نتایج حاصل از مطالعات In vivo نشان داد که لاکتوباسیلوس‌های واجد بیش‌ترین توان پروبیوتیکی ۱P، ۲P، ۶P، ۸P، B۶، M۹، M۱۰، L۱، L۲ و ۱۴۰ هیچ‌گونه تلفات و ضایعه بافتی مشخص، در ماهی باس دریایی ایجاد نمی‌کنند.

تعیین هویت جدایه‌های واجد توان پروبیوتیکی: براساس امتیاز بندی اعمال شده‌در بررسی حاضر بیش‌ترین امتیاز به جدایه‌های ۱P،۲P،۶P،۸P،B۶، M۹، M۱۰، L۱،L۲ و۱۴۰ (جدایه‌های اسید لاکتیک جدا شده از روده ماهیان دریایی) تعلق گرفت (جدول ۶).

جدول ۶: امتیاز بندی نهایی جدایه‌های باکتریایی

شماره جدایه	امتیاز
۱P	۳۹
۲P	۳۰
۶P	۲۱
۸P	۲۸
B۶	۳۵
M۹	۳۰
M۱۰	۲۹
L۱	۲۲
L۲	۳۵
۱۴۰	۳۱

تعیین هویت مولکولی جدایه‌های باکتریایی که دارای بیش‌ترین توان پروبیوتیکی بودند با استفاده از توالی‌ژن ۱۶S rRNA انجام شد. تعیین هویت مولکولی جدایه‌های باکتریایی که دارای بیش‌ترین توان پروبیوتیکی بودند با استفاده از توالی ژن ۱۶SrRNA انجام شد (شکل ۴). مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که نمونه‌های ارسال شده که دارای بهترین قدرت ضدمیکروبی بودند، با توالی‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus pentoseus* موجود در بانک ژن شباهت بیش‌تری دارند.



شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR تکثیر ژن ۱۶S rRNA (نگارنده، ۱۴۰۱)

بحث

لوله‌گوارش در حیوانات شامل اکوسیستم بسیار پیچیده و پویای میکروبی است که از لحاظ غذایی، فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بسیار

مهم می‌باشد. دامنه وسیعی از میکروب‌های به وجود آمده اطراف محیط‌های آبی، خاک، رسوب و غذا در دستگاه گوارش ماهیان به صورت کلنی پیدا می‌شوند. اولین بررسی بر روی میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش در هر میزبانی به‌وسیله Leewenhock انجام گرفت. میکروفلور روده‌ای ماهی نقش مهمی در متعادل سازی و تحریک وضعیت رشد دستگاه گوارش میزبان، کمک به عملکرد گوارشی، حفظ تحمل مخاطی، تحریک پاسخ ایمنی میزبان و ارائه یک سطحی از محافظت در برابر عفونت‌های گوارشی ایفا می‌کند. باکتری اسید لاکتیک (*LAB*) که به‌طورکلی به‌عنوان باکتری مطلوب با توجه به توانایی‌های آن‌ها در مبارزه با باکتری‌های پاتوژن در نظر گرفته می‌شوند، اغلب به‌عنوان اجزای میکروبی روده ماهی شناخته شده‌اند. باکتری‌های اسیدلاکتیک در هر دو نوع ماهی آب شیرین و شور قرار دارند. اگر چه آن‌ها معمولاً به عنوان کلونی غالب دستگاه گوارش محسوب نمی‌شوند اما تحت شرایط خاص مثل استخرهای پرورشی، آن‌ها می‌توانند به‌میزان $۱/۱\times۱۰^{۶}$ سلول در هر گرم وزن بدن غالب گردند و کلونی‌های ثابت را در دستگاه گوارش ماهیان تشکیل می‌دهند. تعداد گزارشات و تحقیقات در زمینه اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک در جلوگیری از بیماری‌های ماهیان در حال رشد است (۳). تحقیقات نشان داده است که فلور میکروبی در روده ماهی موازی با تغییرات محیط تغییر می‌کند به‌عبارت دیگر امکان دستکاری جمعیت میکروبی روده با تغییرات در محتویات غذا امکان پذیر است. تحقیقات نشان داده‌اند که بهترین پروبیوتیک‌ها برای آبزیان، باکتری‌های جداسازی شده از محیط و بدن خود آبزی در منطقه مورد پرورش هستند، لذا در کشورهای مختلف سعی می‌شود پروبیوتیک بومی با استفاده از جانوران آبزی و محیط آبزی خود جداسازی و به‌عنوان پروبیوتیک تجاری تولید و استفاده گردد. در همین راستا در تحقیق حاضر نیز از روده ماهیان دریایی برای انتخاب باکتری‌های مناسب با توان پروبیوتیکی بالا استفاده گردید. شناسایی جدایه‌های لاکتوباسیل در سطح گونه بسیار مشکل است. دو جنس *Entrococcus* spp و *Leuconostoc* spp نیز از روده تاس ماهی ایرانی پرورشی جداسازی و شناسایی شدند (۱۴). *Lactococcus garvieae*، *Pediococcus acidilactici* و *Enterococcus faecium* بیش‌ترین گونه‌های جداشده از کپور بودند (۱۲). *L. plantarum* از شاه ماهی، کریل شمالی و گربه ماهی جدا سازی شده است و باکتری برجسته جداسازی شده از میگو بوده است (۳۷). لاکتو باسیل برجسته جداسازی شده از قره برون پرورشی در مطالعه‌ای نیز *plantarum* بوده است (۱۴). از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Enterococcus* spp. و *L. plantarum* جداسازی شدند (۴، ۵) و از روده ماهی کپور *L. fermentum* گرفته شد (۴، ۵). این باکتری از قره‌برون (۱۴) نیز جداسازی گردید. جنس *Enterococcus* در ماهیان قزل‌آلای قهوه‌ای، کفشک و کپور معمولی و فراوان در قره برون موجود بود (۱۴). از روده میگوهای وحشی و پرورشی میگوی سفیدغربی (۳۰). میگوی زرد (*Metapenaeus brevicornis*)، میگوی موزی (*Penaeus merguiensis*)، روده ماهی قره‌برون و روده میگوی ببری ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) (۳). روده ماهی شیربت، روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۷،۴) و روده ماهی باس دریایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس جداسازی گردیدند (۲۹، ۳۵، ۴۵). کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیراختصاصی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به‌وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در مطالعه حاضر از مجموع ۵۰ قطعه ماهی مورد بررسی، ۱۰ جدایه لاکتوباسیل از روده جدا شده که پس از بررسی‌های مقدماتی، غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵ و ۳/۷۵ درصد نمک‌های صفراوی (۳۸) برای ارزیابی قابلیت رشد جدایه‌ها درحضور نمک‌های صفراوی انتخاب گردید و پس از بررسی مشاهده شد، مقاومت جدایه‌ها در برابر این غلظت‌ها یکسان نیست و پس از مجاورت با نمک‌های صفراوی تعداد باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این نتیجه با نتیجه بررسی بر روی ۳۸ جدایه لاکتوباسیل تطابق دارد (۱۳). هم‌چنین مشخص شد بعضی از سویه‌های قرار گرفته در معرض نمک‌های صفراوی، رشد کم‌تری نسبت به گروه شاهد (PBS) نشان دادند (۳۵). در مطالعه‌ای نیز کاهش معنی‌دار رشد لاکتوباسیلوس کازئی با افزایش غلظت نمک‌های صفراوی از ۰/۵ تا ۹ درصد مشاهده شد (۳۸). احتمالاً نوسان در میزان مقاومت در بین گونه‌های مختلف، ناشی از توانایی باکتری‌ها در کاهش اثرات دترجنتی نمک‌های صفراوی است. هیدرولیز آنزیمی نمک‌های صفراوی سبب این مقاومت می‌گردد (۱۵). این آنزیم‌ها حلالیت صفرا را کاهش داده و اثر دترجنتی صفرا را ضعیف می‌کنند، که احتمالاً در بررسی حاضر نیز جدایه‌های به دست آمده توانایی لازم جهت کاهش اثر دترجنتی صفرا را داشته‌اند. بررسی‌های محققان نشان داد که *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *لاکتو باسیلوس رامنوسوس* از توانایی لازم جهت مقاومت در برابر صفرای ماهیان برخوردار است (۳۹، ۵۰). مطالعه‌ای نشان داد مقاومت لاکتو باسیلوس پلانتاروم نسبت به محلول صفراوی ۰/۳ درصد از جدایه‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی بیش‌تر بود (۲۱) که در مطالعه حاضر مقاومت لاکتوباسیلوس پلانتاروم (p۱)، لاکتوباسیلوس پنتوسئوس (L۲) نسبت به نمک‌های صفراوی تا غلظت ۲/۵ درصد نیز مشاهده شد. هم‌چنین نشان داده شد که از میان ۲۸ جدایه از سه گروه لاکتوباسیلوس (لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی) به دست آمده از پنیر تنها یک جدایه توانایی تحمل شرایط اسیدی و وجود نمک‌های صفراوی در محیط کشت را داشته و اثرات ضدباکتریایی از خود نشان داد (۲۱). با این

حال در مورد غلظت دقیق صفرا جهت ارزیابی تحمل باکتری‌های پروبیوتیکی توافق کلی وجود ندارد (۷، ۸، ۹، ۱۰). وجود صفرا در فرایندهای امولسیون‌سازی، هضم و انتقال چربی‌ها در این موجودات منحصربه‌فرد می‌باشد (۳۱). به‌همین خاطر جهت معرفی پروبیوتیک مناسب جهت پرورش ماهیان دریایی مقاومت نسبت به نمک‌های صفراوی که استقرار باکتری را در محیط روده‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد، در اولویت‌های اولیه قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر ۱۰ جدایه لاکتوباسیلی مورد ارزیابی تحمل شرایط اسیدی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر مشخص شد که از نظر تحمل شرایط اسیدی، تقریباً تمامی جدایه‌های باکتریایی تا pH=۴/۵، پس از یک‌ساعت و نیم، با یک روند کاهش تعداد مواجه بودند. این نتایج با نتایجی که در مورد لاکتوباسیلوس رامنوسوس جداشده از پنیر شباهت‌دارد (۵۰). برخی مطالعات نشان دادند که سویه‌هایی از لاکتوباسیل‌ها در pH=۱ نیز قادر به زنده ماندن مدت یک ساعت می‌باشند (۳۲). اما در بررسی حاضر تنها همه جدایه‌های LAB بغیر از لاکتوباسیلوس پنتوسئوس (۱۴۰) توان تحمل pH=۳ را داشتند و در pH=۴/۵ پرگنه‌های باکتریایی بیش‌تری در پلیت‌ها مشاهده شدند. هم‌سو با مطالعه حاضر، نتایج نشان‌داد که سویه‌های باسیلوس و لاکتوکوکوس توانایی بقا در pH=۴ را داشتند (۱۸). نتایج بررسی آن‌ها با بررسی‌های قبلی نیز تطابق داشت که برای کشتن باکتری از pH کم‌تر از ۲ استفاده می‌شد. نشان‌داده شده است که از بین رفتن باکتری *Serratia marcescens* در موکوس معدی- روده‌ای به‌علت pH است (۱۱، ۱۹). برای کشتن ۹۰ درصد باکتری‌ها در pH=۲ به ۳۰ دقیقه زمان و برای کشتن آن‌ها در pH=۳ به ۶۰ دقیقه زمان نیاز هست. آن‌ها هم‌چنین دریافتند که در pH=۴ باکتری‌ها از تاثیر کشنده pH در امان هستند. از طرفی دستگاه گوارش در اغلب ماهیان اسیدی می‌باشد و تحمل شرایط اسیدی یکی‌از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای ماهیان می‌باشد. از آن‌جایی‌که‌درمحیط پرورش آبزیان pH آب ثابت نمی‌باشد واز pH=۶ در سیستم‌های بیوفلاک (۵۵) تا حدود pH=۹ در استخرهای یوتروف متغییر می‌باشد (۳۶). لذا لازم است سویه‌هایی انتخاب شوند که در این محدوده از pH زنده بمانند. عموماً در ماهیان معده‌دار و گوشت‌خوار مانند ماهیان خاویاری و باس دریایی و حتی فاقد معده مثل کپورماهیان و سخت‌پوستانی مثل میگو که معده اسیدی ندارند هم در ارزیابی باکتری‌های با توان پروبیوتیکی به مقاومت در برابر pH به‌عنوان یک شاخص پروبیوتیکی مهم توجه می‌شود. چون اثبات شده است که اولاً شرایط محیطی بی‌ثبات در شرایط پرورش، احتمال تغییرات شدید pH را ایجاد کرده و کاهش pH محیط، در شرایط هموستاز بدن موجود آبزی اثر گذاشته و می‌تواند باعث تغییر pH دستگاه گوارش شود، از طرف دیگر نشان داده شده است که مقاومت به pH پایین شاخصی از مقاومت بالای باکتری نسبت به شرایط نامناسب محیطی در محیط و لوله گوارش است و می‌توان از آن به عنوان یک شاخص مهم مقاومت باکتری نسبت به شرایط محیطی (در محیط و در دستگاه گوارش موجود) نام برد. در مطالعه حاضر سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم در pH=۳ کم‌ترین بقا را داشتند ولی اختلاف معنی‌داری در بازماندگی آن‌ها در pH=۶ تا pH=۹ دیده نشد. در تحقیق مشابه لاکتوباسیلوس پلانتاروم کم‌ترین کاهش رشد را در pH=۶ نشان داد و در pH برابر با ۸ و ۹ کاهش رشدی نداشت (۵۶). هم‌چنین نشان‌دادند که رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم تا pH=۵ کاهش می‌یابد (۴۲) و در بررسی دیگر مشخص شد که در pH=۳ و کمتر از آن رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم کاهش می‌یابد و در pH=۳ بازماندگی پروبیوتیک‌ها را براساس دانسیته نوری به شدت محدود می‌نماید (۲۱). نشان دادند دو سویه پدیوکوکوس و لاکتو باسیلوس در pH برابر با ۲ پس از گذشت زمان ۲ و ۴ ساعت توان زیست ندارند ولی در pH برابر با ۳ توان زیست دارند (۳۴). خاصیت آنتاگونیستیک لاکتوباسیل‌ها بر علیه عوامل پاتوژن به وفور رخ داده است. افزایش تراکم آبزیان در سیستم‌های پرورشی سبب کاهش کیفیت آب، افزایش استرس و افزایش بیماری‌های باکتریایی و ویروسی و انگلی می‌گردد که در نهایت رشد آبزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از آن‌جایی‌که روش‌هایی هم‌چون واکسیناسیون در مزارع مقرون به‌صرفه نمی‌باشد، برای مدت‌های طولانی معمول‌ترین روش جهت مقابله با عفونت‌های باکتریایی در آبزی پروری استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بود که آبزیان را با مشکلاتی مواجه نمود که می‌توان به تجمع باقی مانده‌های دارویی در بافت آبزیان، سرکوب سیستم ایمنی، افزایش شمار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تخریب میکروفلور باکتریایی محیطی اشاره نمود (۶۳). با توجه به این‌که مواد شیمیایی تولید شده توسط باکتری‌ها می‌توانند اثرات ضدباکتریایی بر سایر میکروب‌ها داشته باشد این موضوع می‌تواند روابط بین جمعیتی را تغییر دهد (۴۴). در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد باکتری‌های اسیدلاکتیک فعالیت ضدمیکروبی خوبی را علیه باکتری‌های بیماری‌زا نشان‌دادند. در میان باکتری‌های پروبیوتیکی، باکتری‌های اسیدلاکتیک ترکیباتی از قبیل اسیدهای آلی، اسیدلاکتیک، باکتریوسین و پراکسید هیدروژن را تولید می‌کنند که سبب فعال شدن ایمنی غیراختصاصی در میزبان می‌شود که احتمالاً باکتری‌های مورد بررسی تحقیق حاضر نیز توانایی بالایی جهت تولید مواد بازدارنده رشد داشته‌اند. در همین راستا نشان داده شده است سویه‌های باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از روده میگو بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی از جمله ویبریو هاروی و آئروموناس هیدروفیلا تاثیرگذار است (۵۶). هم‌چنین نشان دادند باکتری اسیدلاکتیک

Leuconostoc mesenteroides جداشده از روده ماهی تیلاپیا توانایی مهار باکتری ویبریو هاروی و مایکوباکتریوم مارینوم را به عنوان باکتری‌های بیماری‌زا داشت (۶۴). نتایج مشابهی به‌دست آمده بود که باکتری اسیدلاکتیک *Leuconostoc mesenteroides* توانایی مهار آئروموناس هیدروفیلا را دارد (۱، ۲۸). در بررسی حاضر، ۲ جدایه توانایی مهار ویبریو هاروی را داشتند. در مطالعه‌ای فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه ویبریو هاروی را مشاهده کردند (۴۷). در همین راستا در مطالعه‌ای نیز توان ضدمیکروبی ۱۲ جدایه باکتریایی را علیه ویبریو هاروی مورد آزمایش قرار دادند، که به‌جز یک جدایه بقیه دارای قدرت ضدمیکروبی علیه این باکتری بودند و قطر هاله عدم رشد ویبریو هاروی ۱۳-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۶۲). در مطالعه حاضر قطر هاله عدم رشد ویبریو هاروی در ۲ جدایه‌ایی که هاله عدم رشد علیه ویبریو هاروی ایجاد کردند، از نتیجه به‌دست آمده توسط این محققان بیش‌تر بود. از طرفی در مطالعه حاضر با روش چاهک‌گذاری تنها تعدادی از باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی ایجاد هاله عدم‌رشد را در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان دادند. نتایج مشابهی نیز در مطالعه‌ای به‌دست آمد که باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از لوله‌گوارش ماهی تیلاپیای نیل به‌روش چاهک‌گذاری قادر به ایجاد هاله عدم‌رشد در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا نبودند که شاید به این دلیل باشد که باکتری‌های اسید لاکتیک زمانی‌که به تنهایی در محیط کشت هستند مواد مهارکننده رشد را تولید نمی‌کنند یا این‌که شرایط رشد آن‌ها مطلوب نبوده و یا این‌که رقابت یا عامل محرکی جهت تولید مواد مهارکننده رشد وجود نداشته است (۲۸، ۶۴). براساس نتایج این بررسی جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱P)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۸P) و لاکتوباسیلوس پنتوسئوس (L۲) به جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیاروکری و لاکتو کوکوس گارویه دارای توان ضدمیکروبی خوب می باشند. اثرات آنتاگونیستی حاصل از باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لاکتو باسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس کازئی را بر روی برخی باکتری‌های بیماری‌زا بررسی کردند. در همه موارد این باکتری‌ها توان جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا را داشتند و این تأثیرگذاری در مورد باکتری‌های بیماری‌زای مختلف، متفاوت بود که این یافته نیز با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. آن‌ها بیان داشتند که احتمالاً وجود ترکیبات ضدمیکروبی متنوعی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، اتانول، استالدهید، استوئین، اسیدهای چرب، ترکیبات با وزن مولکولی پایین و باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها توانسته است باعث ایجاد عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا شود. در پایان بایستی اشاره کرد که شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسیدلاکتیک ماهیان دریایی بیش‌تر بر اساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی، عدم تکرارپذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز است زیرا علاوه بر متفاوت بودن شرایط کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد. انتخاب محیط کشت و انجام تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی قادر به جداکردن لاکتوباسیل‌ها از باکتری‌هایی با مورفولوژی یکسان نمی‌باشد. بنابراین برای شناسایی دقیق‌تر بایستی از روش‌های مولکولی نیز استفاده گردد. هم‌چنین نتایج حاصل از تست‌های فنوتیپی پیوستگی و شباهت زیادی را مابین لاکتوباسیل‌ها نشان می‌دهد. لذا تعیین تاکسونومی این جنس تنها به‌وسیله روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مشکل است.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (شماره قرارداد پژوهانه: SCU.V1401.299) و سازمان صنایع کوچک و شهرک‌های صنعتی ایران انجام شده است. نویسندگان این تحقیق از دستورالعمل‌های دانشگاهی تبعیت کردند و آزمایش‌ها را بر اساس دستورالعمل اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

منابع

1. **Allameh, S.K. Daud, H., Yusoff, F.M., Saad, C.R. and Ideris, A., 2012.** Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). African journal of biotechnology. 11(16): 810-816.
2. **Antony, I.S., 2002.** Lactobacillemia: an emerging cause of infection in both the immunocompromised and immunocompetent hos. Journal of the National Medical Association. 92: 83-86.
3. **Askarian, F., Matinfar, A., Bahmani, M., Khorshidi, K., Shenavar, A. and Ringo, E., 2008.** Diversity of lactic acid bacteria in the gastro intestinal tracts of reared Beluga (*Huso Huso*) and Persian sturgeon (*Asipenser persicus*). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 3(5): 302-311.
4. **Azizpour, K., 2009.** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west Azarbaijan Iran. Journal of Biological Science. 4(3):324-326.
5. **Azizpour, K., Tkmechi, A. and Agh, N., 2009.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp of west Azerbaijan Iran. Journal of animal and veterinary advances. 8(6): 1162-1164.
6. **Balcázar, J., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. and Girones, O., 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. 278: 188-191.
7. **Balcazar, J.L., Rojas-Luna, T. and Cunningham, D.P., 2007.** Effect of the addition of four potential probiotic

bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese. Veterinary research forum. 3(3): 181- 185.

22. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture (Review). Journal of fish diseases. 25: 633-642.

23. **Jacobsen, C.N., Rosenfeldt, N.V., Hayfored, A.E., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. and Jakobsen, M., 1999.** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus sr*. by in vitro techniques and evaluation of colonization ability on five selected strains in human. Appl. Environ. Microbiol. 65(11): 4949-4956.

24. **Jayanth, K., Jeyasekaran, G. and Shakila, R.J., 2001.** Biocontrol of Fish Bacterial Pathogens by the antagonistic Bacteria isolated from the Coastal Waters of Gulf of Mannar, India. Bulletin of European Association of Fish Pathologist. 21: 12-18.

25. **Jerry, D.R., 2014.** Biology and Culture of *Asian Seabass Lates calcarifer*. CRC Press. Boca Raton. FL. USA.

26. **Karger, S. and Basel, A.G., 2008.** Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming, natural occurrence and probiotic treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14(1-3): 107-114.

27. **Klaenhammer, T.R., 2000.** Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition. 130: 415-416.

28. **Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L. and Olvera Novoa, M.A., 2010.** Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Fisheries and Aquaculture. 2(4): 93-101.

29. **Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga, H., Kono, T., Itami, T. and Sakai, M., 2013.** Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. Marine Biotechnology. 16(2): 181-92.

30. **Makvandi, Z., Mesbah, M., Gharibi, D., Alishahi, M. and Gurbanpour, M., 2020.** Evaluation of the antimicrobial activity of bacteria isolated from the intestine, water and sediments of the western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) breeding environment in Choebde area of Abadan. Journal of Animal Environment. 1(11): 293-302. (In Persian)

31. **Mali, B., 1996.** Nutritional requirements of commercially important shrimps in the tropics. Fish Nutrition and Feeds. 94: 10-28.

32. **Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E., 2006.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. International Dairy Journal. 16: 189-199.

33. **Menconi, A., Kallapura, G., Latorre, J.D., Morgan, M.J., Pumford, N.R., Hargis, B.M. and Tellez, G., 2014.** Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria in a Commercial Probiotic Culture. Bioscience of Microbiota. Food and Health. 33(1): 25-30.

34. **Mesalhy aly, S., Azza, M., Rahman, A., John, G. and Mohamed, M., 2008.** Characterization of some bacteria isolated from *oreochromis niloticus* and their potentional use as probiotics. Aquaculture. 277: 1-8.

35. **Mohammadian, T., Gurbanpour, M., Alishahi, M., Tabandeh, M. and Gharibi, D., 2013.** Isolation and biochemical identification of lactobacilli with probiotic potential from the intestines of Shirbet fish. Iranian Veterinary Medicine. 10(2): 88-97.

strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with Vibrio parahaemolyticus. Journal of Invertebrate Pathology. 96: 147-150.

8. **Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O. and Muzquiz, J.L., 2007.** Enhancementof the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunology and Medical Microbiology. 51: 185-193.

9. **Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O. and Muzquiz, J.L., 2007.** In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens, Veterinary Microbiology. 122: 373-380.

10. **Balcazar, J., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. and Girones, O., 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. 278: 188-191.

11. **Borriello, S.P., Reed, P.J., Dolby, J.M., Barclay, F.E. and Webster, A.D., 1985.** Micobial and metabolic profiles of the achlorhydric stomach: comparisons of pernicious and hypogammaglobulinaemia. Journal of Clinical Pathology. 38: 946-953.

12. **Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P. and Benno, Y., 1999.** Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General and Applied Microbiology. 45: 177-184.

13. **Chateau, N., Deschamp, A.M. and Hadj-Sassi, A., 1994.** Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology. 18: 42-44.

14. **Erkkila, S. and Petaja, E., 2000.** Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science. 55: 297-300.

15. **Esmaili, P., Mozafari, N. and Souvalmasouleh, S., 2008.** Isolation and identification of lactic acid bacteria in the intestine of Iranian tamarind. Journal of Biological Sciences. 3(3): 13-18. (In Persian)

16. **Fard Qoljaei, A., Khara, H. and Masuleh, A., 2015.** The effect of *Lactobacillus plantarum* bacteria (KC426951) isolated from the intestine of rainbow trout in Gilan province on growth factors, intestinal bacterial flora and the chemical composition of rainbow trout fry (*Onchorhynchus mykiss*). Fisheries Science and Technology. 5(2): 111-124. (In Persian)

17. **FAO. 2020.** The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. 204 p.

18. **Geraylou, Z., Vanhove, M.P.M., Souffreau, C., Rurangwa, E., Buyse, J. and Ollevier, F., 2012.** In vitro selection and characterization of putative probiotics isolated from the gut of *Acipenser baerii* (Brandt, 1869). Aquaculture Research. 1-12.

19. **Gianella, R.A., Broitman, S.A. and Zamchek, N., 1972.** Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. Gut. 13(4): 251-256.

20. **Grześkowiak, L., Collado, M.C., Vesterlund, S., Mazurkiewicz, J. and Salminen, S., 2011.** Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: Quantitative analysis. Aquaculture. 318: 33-36.

21. **Hassanzadazar, H., Ehsani, A., Mardani, K. and Hesari, J., 2012.** Investigation of antibacterial, acid and

36. **Momoyama, K., 2004.** Mortalities of farm-raised Kuruma prawn Penaeus japonicus caused by high pH ambient water due to blooms of a blue-green alga. Chroococcus turgidus. Fish Pathology. 39: 129-135.

37. **Nair, P. and Surendran, P., 2004-2005.** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of Culture Collections. 4: 48-52.

38. **Nazari, M., Alishahi, M., Mohammadian, T. and Motamedi, H., 2015.** Investigating the ability and probiotic efficiency of phytase positive bacteria in laboratory conditions in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environment. 3: 93-102. (In Persian)

39. **Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G. and Ouwehand, A.C., 2001.** Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Applied Environmental Microbiology. 67: 2430-2435.

40. **Oral-Jensen, S., 1919.** The lactic acid bacteria (Copenhagen, Host & Son).

41. **Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S. and Sadayappan, B., 2013.** Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today. 5(1): 55-59.

42. **Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P., 2003.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science. 65: 859-867.

43. **Patil, M., Pal, A., Pal, V. and Kumari yaddula, R., 2006-2007.** Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacreria from rat intestine. Journal of Culture Collection. 5: 58-63.

44. **Pybnus, V., Loutit, M.W., Lamont, L.L. and Tagg, J.R., 1994.** Growth inhibition of the salmon pathogen Vibrio ordalii by a siderophore produced by Vibrio anguillarum strain VL 4335. Journal of Fish Disease. 17: 311-324.

45. **Qanei, R., 2018.** Isolation, identification and evaluation of *Vibrio quorum* sensing system inhibitory bacteria with probiotic power and their effect on some innate immunity indicators in Asian sea bass. Doctoral thesis of Shahid Chamran University of Ahvaz in the field of health and aquatic diseases. 138 p.

46. **Ringø, E., Strøm, E. and Tabachek, J.A., 1995.** Intestinal microlora of salmonids: a review. Aquaculture Research. 26: 773-789.

47. **Sivakumar, N., Sundararaman, M. and Selvakumar, G., 2012.** Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). African Journal of Biotechnology. 11(91): 15811-15818.

48. **Stiles, M.E. and Holpzapfel, W., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. FoodMicrobiol. 36: 1-29.

49. **Subasighe, R., 2005.** Aquaculter topics and activities. State of world aquaculter. Rome: FAO fisheries and aquaculter department.

50. **Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. and Coppola, R., 2005.** Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol. 244: 129-137.

51. **Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. and Deguchi, Y., 1998.** Production of the antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture. 165: 269-280.

52. **Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N. and Matsuu, S., 2000.** Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. Japanese Society of Fisheries Science. 68(5): 1004-1011.

53. **Tinh, N.T., Dierckens, K., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2007.** A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Mar Biotechnol. 10(1): 1-12.

54. **Vijayan, K.K., Bright Singh, I.S., Jayaprakas, N.S., Alavandi, S.V., Somnath, P.S., Preetha, R., Rajan, J.J.S. and Santiago, T.C., 2006.** A brackish water isolates of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic Vibrios in penaeid and nonpenaeid rearing systems. Aquaculture. 251: 192-200.

55. **Vinatea, L., Galvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Shuler, A. and Leffer, J.W., 2010.** Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: interaction of water quality variables. Aquacultural Engineering. 42: 17-24.

56. **Vieira, F.N., Jatobá, A., Mouriño, J.L.P., Vieira, E.A., Soares, M., Silva, B.C., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. and Vinatea, L.A., 2013.** In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. Pesquisa agropecuária brasileira. 48(8): 998-1004.

57. **Van hai, N., Fotedar, R. and Buller, N., 2007.** Selection of probiotics by various inhibition test method for use in the culture of western king prawns. Aquaculture. 272: 231-239.

58. **Verreth, J., Schrama, J., Hartemink, R. and Bucio, A., 2006.** Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiology. 23(5): 476-482.

59. **Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 655-671.

60. **Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S., 2008.** Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila.* Biotechnology. 7(1): 124-128.

61. **Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T. and Li, W.F., 2008.** Effect of probiotics, Enteroccus faecium, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture. 277(3-4): 203-207.

62. **Widanarni, W., Nopitawati, T. and Jusadi, D., 2015.** Screening of probiotic bacteria candidates from gastrointestinal tract of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and their effects on the growth performances. Research Journal of Microbiology. 10(4): 145-157.

63. **Yousefian, M. and Sheikholeslami Amiri, M., 2009.** A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. African journal of biotechnology. 8(25): 7313-7318.

64. **Zapata, A.A. and Lara-Flores, M., 2013.** Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Nile Tilapia Intestine (*Oreochromis niloticus*). Journal of Biology and Life Science. 4(1): 164-171.

65. **Ziaei-Nejad, S., Rezaei, H.M., Takami, A.G., Lovett, L.D., Mirvaghefi, R.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*. Journal of Aquaculture. 252: 516-524.