تعیین فلورباکتریایی مولدین قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و شناسایی باکتریهایی با احتمال خواص پروبیوتیکی

- **مهران یاسمی**[*]: موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران صندوق پستی: ۱۷۸۳-۱۳۱٤٥
- **امیرحسین اسماعیلی**: مجتمع آموزش جهاد کشاورزی اصفهان
- **زیبا فیضی**: مجتمع آموزش جهاد کشاورزی اصفهان
- **سهیل قائم مقامی**: مجتمع آموزش جهاد کشاورزی اصفهان
- **سهیل علی‌نژاد**: مجتمع آموزش جهاد کشاورزی اصفهان

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

چکیده

هدف از این تحقیق، شناسایی باکتری‌های غالب روده با احتمال وجود خواص پروبیوتیکی به منظور ایجاد جایگزینی برای پادزیست‌ها و مواد محرک رشد و ایمنی در پرورش مولدین ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت با خاصیت تولید اسید لاکتیک با احتمال پروبیوتیک بودن می‌توانند بعنوان مهمترین دستاورد این بررسی در پرورش و افزایش ایمنی مولدین ماهی قزل آلای رنگین کمان و بهبود بازده تکثیر و بازماندگی لاروها مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به اثرات مثبت تاثیر پروبیوتیک‌ها و بویژه باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در افزایش میزان و بازده اقتصادی در آبزی‌پروری این تحقیق در مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفت. برای این منظور، تعداد ۳۰ مولد (۱۵نر و ۱۵ ماده) در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد صید گردید و با هوادهی مناسب زنده به آزمایشگاه مرکز آموزش جهاد کشاورزی اصفهان منتقل شدند. ابتدا ماهیان زیست‌سنجی گردیدند و وزن متوسط مولدین نر۲ ساله، ۱۸٦۰ گرم، طول کل ٤٦ سانتیمتر و وزن متوسط مولدین ماده ۳ ساله، ۱۹٤۰ گرم و طول کل ٤۹ سانتیمتر بود. سپس سطح خارجی مولدین در زیر دستگاه هود لامینار با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از کالبد شکافی با وسایل استریل، دستگاه گوارش ماهی بویژه روده خارج گردید. ازمحتویات روده کشت میکروبی مقدماتی و تفریقی شامل: کشت با محیط‌های Nutrient broth، Blood agar، Mac Conkey agar، TSA، TSI، MRS، SIM و MR-VP انجام شد. همچنین با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های گرم مثبت از گرم منفی جدا گردیدند. سپس براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها، تست‌ها و معرف‌ها شامل: متیل رد، وژز پروسکوئر، باریت، کواکس، تست اکسیداز، کاتالاز، تست تخمیر و غیره برای تشخیص قطعی و شناسایی آنها استفاده شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد فلور باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی در روده مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمال مشتمل بر: *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Carnobacterium* sp., *Leuconostoc* sp. می‌باشد.

کلمات کلیدی: فلور باکتریایی ، مولد، پروبیوتیک، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: yasemi_m@yahoo.com

مقدمه

پروبیوتیک‌ها باکتری‌های مفید و بی‌خطری می‌باشند که تاثیر مثبتی بر بقا، رشد و افزایش ایمنی جانور میزبان دارند و بصورت مستقیم یا غیرمستقیم منجر به افزایش مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماریزا می‌گردند (۱). در این راستا گونه‌های متفاوت باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. اگر چه بررسی‌های متعددی در دنیا روی پروبیوتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش آبزیان در مراحل متفاوت پرورشی گونه‌های مختلف صورت گرفته است، اما مطالعات انجام شده در ارتباط با مولدین در دنیا نسبت به بقیه مراحل کمتر می‌باشد و در هیچ کدام از تحقیقات صورت گرفته در کشور نیز روی مولدین گونه‌های متفاوت آبزیان مشتمل بر ماهیان گرمابی، سردآبی و انواع میگو اقدام به جداسازی پروبیوتیک اختصاصی هر گونه از دستگاه گوارش انجام نشده است و تنها از پروبیوتیک‌های آماده که با نام‌های متفاوت تجاری در بازار موجود است، استفاده می‌شود. به همین دلیل با توجه به اثرات مثبت تاثیر پروبیوتیک‌ها و بویژه باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک در افزایش میزان تولید و بازده اقتصادی در آبزی‌پروری و از سوی دیگر جایگاه مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان این تحقیق صورت گرفته است.

Fuller (۱۹۹۲) طی مطالعاتی برای اولین بار بررسی کاربرد پروبیوتیک‌ها را آغاز نمود. او این مواد را میکروب‌های بلعیده شده برای افزایش میزان سلامتی موجودات نام برد که با بهبود تعادل میکروبی دستگاه گوارش بعنوان مکمل غذایی میکروبی تاثیر سودمندی بر میزبان می‌گذارد.

همچنین اولین بار به مواد مترشحه بوسیله میکرواورگانیسم‌هایی که موجب تحریک رشد در میکرواورگانیسم‌های دیگر شده و کاملاً در مقابل آنتی بیوتیک‌ها یا مواد پادزیست قرار می‌گیرند پروبیوتیک نامیدند (۲۳). مطالعات انجام شده در کشور بیشتر بر تکثیر و کاربرد باکتری‌ها بعنوان پروبیوتیک و اثر آنها بر رشد و بازماندگی آبزیان بررسی شده است (۱، ۲ و ۳).

در بیشتر تحقیقاتی که در سایر کشورها صورت گرفته است پروبیوتیک‌ها بویژه گونه‌های مختلف باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش آبزیان جدا گردیده‌اند. در بررسی انجام شده روی آزاد ماهیان دو گونه ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) و ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، باکتری *Carnobacterium* sp. از دستگاه گوارش این ماهی جدا و کشت داده شد. سپس به جیره غذایی این دو گونه در مقادیر متفاوت افزوده شد. نتایج این بررسی حاکی از افزایش رشد و بقای لاروهای این دو گونه و افزایش مقاومت آنها در حضور باکتری‌های زیر:
Aeromonas salmonicida, A. hydrophil, Vibrio anguillarum, Streptococcus milleri, Flavobacterium psyclirophilum, Photobacterium damselae گردیده است (۲۰).

بعلاوه نتایج این بررسی حاکی از عدم تغییر فلور باکتری‌های غالب در دستگاه گوارش این دو گونه در مراحل مختلف زیست است. اثرات سود بخشی ناشی از کاربرد پروبیوتیک باکتریایی *Lactobacillus rhamnosu* در مقادیر متفاوت بصورت خوراکی برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در تقویت سیستم ایمنی و رشد این گونه مشاهده شد (۱۵). تحقیقات روی میگوی مونودون *Penaeus monodon* نشان می‌دهد استفاده همزمان از دو پروبیوتیک باکتریایی شامل *Vibrio* و *Bacillus* در جیره غذایی به همراه وارد کردن ازن به آب منجر به افزایش رشد و بقا در این گونه می‌گردد (۱۴).

بررسی‌های انجام گرفته بر روی میگوی *Penaeus vannamei* نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک‌های باکتریایی شامل *Vibrio* و *Bacillus* در تغذیه نه تنها منجر به افزایش رشد در آنها می‌گردد بلکه در تقویت سیستم ایمنی نیز نقش عمده‌ای را دارا می‌باشد که این امر در مورد *Bacillus* بیشتر صادق است (۱۰). همچنین مطالعات انجام شده روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در محدوده وزنی ۲۵ گرم با استفاده از باکتری *Carnobacterium* sp. در فرم لیوفیلیزه در غذا نشان داد که درصد رشد و بقاء ماهیان تغذیه شده با این باکتری پروبیوتیکی بسیار بالاتر از سایر ماهیانی است که با این باکتری تغذیه نشده‌اند (۱۳). براین اساس در این تحقیق اقدام به جداسازی و شناسایی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک اختصاصی از دستگاه گوارش مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان گردید.

مواد و روشها

برای انجام این تحقیق در تیرماه تعداد ۱۰ مولد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (۱۵مولد ماده و ۱۵ مولد نر) که از نظر ظاهری از سلامت لازم برخوردار بودند، از مرکز تکثیر کیان قزل در استان چهار محال بختیاری در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد صید گردید و توسط هوادهی مناسب زنده به آزمایشگاه تخصصی

شیلات مرکز آموزش جهاد کشاورزی اصفهان انتقال داده شدند. ابتدا مولدین زیست‌سنجی و شماره‌گذاری شدند. متوسط وزن مولدین نر ۲ ساله ۱۸۶۰ گرم و متوسط وزن مولدین ماده ۳ ساله ۱۹۴۰ گرم بود. ماهی‌ها به روش بهداشتی سریعاً کشته شده (با زدن ضربه به سر) و تمام سطح خارجی بدن و وسایل کالبد شکافی در زیر هود لامینار با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. به روش مرسوم، عمل کالبد شکافی (در سطح شکمی ماهی برشی از قسمتی بالاتر از مخرج تا پشت سرپوش آبششی در ناحیه سر) انجام گردید. دستگاه گوارش و بویژه روده از محوطه شکمی خارج شد و به سه قسمت متمایز شامل ابتدای روده، قسمت میانی و انتهای روده تقسیم گردید. قسمتهای متمایز شده روده در محیط کشت نگهدارنده مایع نوترینت براث (صرفاً جهت رقیق نمودن بافت) قرار داده شد (۱۳). به منظور کشت و جداسازی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی محیط‌های کشت غنی کننده شامل: TSI، Mac Conkey agar، Nutrient agar و Blood agar طبق دستورالعمل شرکت سازنده آماده گردید. سپس نمونه‌برداری توسط سوآپ استریل از روده انجام شد و روی محیط‌های مذکور بصورت خطی کشت اولیه انجام گرفت و برای رشد پرگنه‌های باکتری، در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از انجام کشت اولیه، تمامی پلت‌ها از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و به منظور انجام شمارش و تهیه کشت خالص، کلونی‌ها براساس رنگ، شکل و اندازه مورد بررسی واقع شدند (۴). سپس بدلیل اینکه محیط‌های کشت عمومی رشد طیف وسیعی از باکتریها را حمایت می‌کند، جهت جداسازی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از دو محیط کشت MRS آگار (مرک، آلمان) و TSA غنی شده با ۵ درصد گلوکز (مرک، آلمان) استفاده گردید (۱۱).

در مرحله بعد براساس نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌ها به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی تقسیم‌بندی شدند. تمام باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک گرم مثبت می‌باشند (۱۸).

برای تشخیص قطعی باکتریها نیز از تست‌های کاتالاز، اکسیداز، آزمون احیاء نیترات، محیط کشت اکسیداسیون-تخمیر (O-F)، تست حرکت، استفاده شد.

سپس بر اساس کلید شناسایی Bergey که مهمترین روش شناسایی باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک و از مهمترین منابع میکروبیولوژی است، استفاده گردید (۱۲). برای آنالیز آماری نتایج حاصله از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و از آزمون دانکن برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های آزمایشی در سطح ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از باکتری‌های جداسازی شده از روده‌ی مولدین نر و ماده‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان برحسب تعداد و نوع شامل باکتری‌های *Lactobacillus* sp.، *Carnobacterium* sp.، *Aomonas* sp.، *Streptococcus* sp. و *Leuconostoc* sp. می‌باشند. فراوانی هر یک در جدول ۱ آورده شده است.

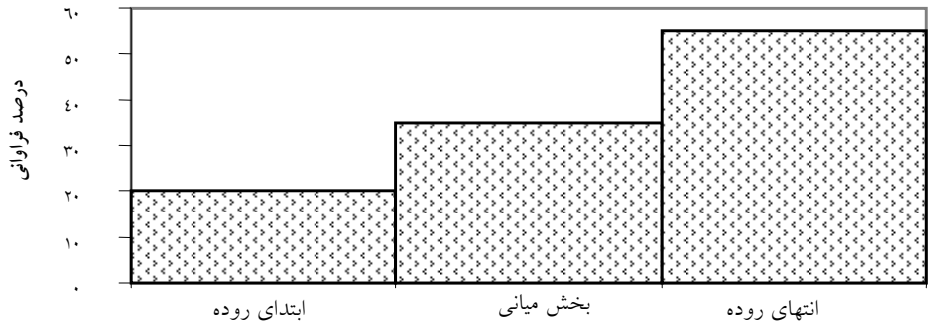
با توجه به درصد فراوانی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک که شامل باکتری‌های *Lactobacillus* sp.، *Carnobacterium* sp.، *Streptococcus* sp. و *Leuconostoc* sp. است، بیشترین فراوانی درجنس نر و جنس ماده مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مربوط به باکتری *Lactobacillus* sp. می‌باشد که با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد داشت ($P\leq0.05$) که در نمودار ۲ آورده شده است.

همچنین براساس نتایج بدست آمده بیشترین باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) متعلق به بخش انتهایی روده در مولد ماده و مولد نر برآورد شد و اختلاف معنی‌داری در این خصوص بین دو جنس مشاهده نگردید. بعبارت دیگر بخش انتهایی روده یکی از مهمترین مکانهای جداسازی باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک است. براساس نمودار ۱ کمترین میزان باکتری جداسازی شده در هر دو جنس در ابتدای روده تخمین زده شد.

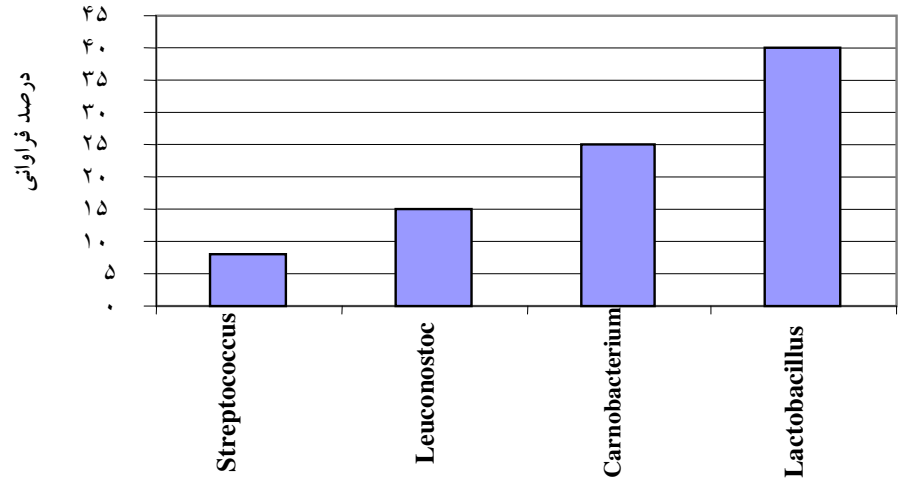
جدول ۱: میانگین درصد فراوانی باکتریهای جداسازی شده از روده مولدین نر و ماده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

نام گونه	*Lactobacillus*	*Carnobacterium*	*Leuconostoc*	*Streptococcus*	*Aeromonas*
درصد فراوانی در جنس ماده	۴۰^{a}	۱۵^{bc}	۱۵^{bc}	۱۰^{c}	۲۰^{b}
درصد فراوانی در جنس نر	۴۵^{a}	۲۰^{b}	۱۵^{bc}	۵^{c}	۱۵^{bc}

حروف لاتین نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P\leq0.05$).



نمودار ۱: میانگین تعداد کل باکتری‌های جداسازی شده از روده مولدین نر و ماده ماهی قزل‌آلای رنگین



نمودار ۲ درصد فراوانی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از روده مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

بحث

در سایر تحقیقات انجام گرفته وجود باکتریهای تولید کننده‌ی اسید لاکتیک در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش در گونه‌های مختلف ماهیان به اثبات رسیده است (۱۸).

باکتری *Leuconostoc* sp. در تحقیقات قبلی از دستگاه گوارش ماهیان مختلف از جمله چار قطبی جداسازی و گزارش گردیده است (۱۷). این باکتری در بررسی حاضر نیز از روده مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در هر دو جنس نر و ماده جداسازی شد.

در بیشتر تحقیقات صورت گرفته روی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک نشان داده شده است که باکتری *Lactobacillus* sp. از جمله باکتری‌هایی است که بصورت عمده در جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان (بویژه روده)

وجود دارند و این مسئله در گونه‌هایی از کاد ماهیان (*Gadus vivens* L.)، (۲۱)، چار قطبی (۱۶)، آزاد ماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar* L.) (۱۹)، قزل‌آلای قهوه‌ای (۸)، ماهی کپور معمولی و کپور نقره‌ای (۱۱) و مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در این بررسی به اثبات رسید.

Ringo و همکاران (۱۹۹۸) موفق به جداسازی باکتری‌های *Streptococcus* sp. یا باکتری‌های شبیه این جنس از موکوس موجود در معده یا روده کوچک ماهی چارقطبی گردیدند. همچنین در بررسی‌های متفاوتی نیز اقدام به جداسازی باکتری *Streptococcus* sp. از دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی توسط Sugita و همکاران (۱۹۹۴)، ماهی قرمز حوض (*Carassiua auratus*) توسط Sugita و همکاران (۱۹۹۸) و همچنین ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) توسط RingØ و Gastesoupe (۱۹۹۸) و مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در این بررسی گردیده است.

در این تحقیق از روده مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در هر دو جنس نر و ماده باکتری *Carnobacterium* sp. که متعلق به باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) می‌باشد، جداسازی گردید. همچنین باکتری *Carnobacterium* sp. از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جداسازی شد (۲۲).

تاثیر مثبت پروبیوتیک‌ها با تاکید بر باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک بر روند رشد و درصد بازماندگی ماهیان بوسیله محققین صورت پذیرفته است، که می‌توان به تاثیر کاربرد باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک بر روند رشد و درصد بازماندگی لارو ماهیان توربوت (*Scophthalmus maximus*) توسط Gastesoupe (۱۹۹۴)، Gildberg و همکاران (۱۹۹۷) روی ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) و RingØ و همکاران (۲۰۰۰) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) و بسیاری از تحقیقات دیگر اشاره نمود. در کلیه این تحقیقات افزایش شاخص‌های رشد و درصد بازماندگی لاروها مشاهده گردیده است. همچنین تحقیقات انجام شده حاکی از این مطلب است که در صورت استفاده از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) یا باکتری‌های اختصاصی به منظور افزایش مقاومت لاروها در برابر عوامل بیماری‌زا بعنوان پروبیوتیک در تغذیه لاروها، می‌توان شاهد تاثیرات مثبتی در روند رشد و بازماندگی لاروها بود (۱۸). از اینرو در تحقیقات متعددی اقدام به بررسی فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهیان، لاروها، تخم و غیره گردیده است (۱۹). در بین باکتری‌های مختلف، باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای بعنوان پروبیوتیک برخوردار می‌باشند (۷). لذا بنظر می‌رسد باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) جداسازی شده در این تحقیق نیز به احتمال زیاد بتوانند بعنوان پروبیوتیک اختصاصی در پرورش ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان بخصوص لارو آنها مورد استفاده قرار گیرد و حضور آنها در دستگاه گوارش ماهیان به حفظ سلامت و ایمنی ماهی کمک نماید.

منابع

۱- **تقوی، س.، ۱۳۸۴.** بررسی مقایسه‌ای فاکتورهای رشد و بازماندگی بر اثر افزودن پروبیوتیک تیاکس در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مرحله رشد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۸۳ صفحه.

۲- **فاضلی، ز.س.، ۱۳۸۴.** غنی‌سازی گونه آرتمیا ارومینا با پروبیوتیک مخمری (تپاکس) و بررسی پایداری آرتمیای غنی‌سازی شده در دوره‌های مختلف غنی‌سازی و انکوباسیون سرد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات. ۱۸۳ صفحه.

۳- **محمدی آذری، ح.، ۱۳۸۴.** تاثیر پروبیوتیک پروتکسن بر رشد و زنده‌مانی مرحله لاوری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۰ صفحه .

4-Cappuccio, J.G. and Sherman, N., 1998. Microbiology: A laboratory manual. Welsay Longman, INC. New York, USA. 477P.

5-Fuller, R., 1992. History and development of Probiotics. *In*: (R.E. Fuller ed), Probiotics: The Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, USA. pp.1-8.

6-Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrrio*. Aquat. living Resour.7:277-282.

7-Gildberg, A.; Mikkelsen, H.; Sandaker, E. and Ringo, 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.

8-Gonzalez, C.L.; Enicinas, J.P.; Garcia Lopez, M.L. and Otero, A., 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fish. Food Microbial.17:383-397.

9-Gomez-Gill, B.; Rouqe, A.; Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, 191:259-270.

10-Gulliana, M.; Thompsonb, F. and Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 233:1-14.

11-Hagi, T.; Tanaka, D.; Iwamura, Y. and Hoshino, T., 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture, 234:335-346.

12-Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T., 1999. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, Maryland, USA.787P.

13-Kim, D.H. and Austin, B., 2006. Innate immune responses in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probioticts. Fish & Shellfish immunol., 21:513-534.

14-Meunpol, O.; Lopinyosiri, K. and Menasveta, P., 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp. Aquaculture, 220:437-448.

15-Nikos Kelainen, S.; Ouwehand, A.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003. Immune enhancement in Rainbow trout by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish immunol., 15:443-452.

16-RingØ, E., 1993. Dose chromic oxide affect fecal lipid and intestinal bacterial flore in *Arcti charr*, *Salvelinus alpinus*. Aquacult. Fish. Manage., 24:767-776.

17-RingØ, E. and Storm, E., 1994. Microflora of *Arctic charr*, *Salvelin*us *alpinus* L.: Gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. Aquacult. Fish. Manage., 25:623-629.

18-RingØ, E. and Gastesoupe, F.-J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: A review. Aquaculture, 160:177-203.

19-RingØ, E.; Bendiksen, H.R.; Wesmajervi, M.S.; Olsen, R.E.; Jansen, P.A. and Mikkelsen, H., 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Appl. Microbial., 89:317–322.

20-Robertson, P.A.W.; Dowd, C.O.; Burrells, C.; Williams, P. and Austin, B., 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum). Aquaculture, 185:235–243.

21-Schroder, K.; Clausen, E.; Sandberg, A.M. and Raa, J., 1980. Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce, antibiotic substances. *In*: (J.J. Connell ed.). Advances in fish science and technology. Fishing news Books, Farnham, Surry, England, pp.480-483.

22-Starliper, C.E.; Shotts, E.B. and Brown, J., 1992. Isolation of *Arnobaterium piscicola* and an unidentified Gram-positive bacillus from sexually mature and post-spawning Rainbow trout (*Oncorhynchus myk*iss). Aquat. Org., 13:181-187.

23-Stillwell, R.H. and Lilly, D., 1965. Probiotice in growth promoting factors produced by microorganism in science. 147:797-748.

24-Sugita, H.; Nakamura, T.; Tanka, K. and Deguchi, Y., 1994. Identification of *Aeromnas* species isolated from fresh water fish with the microplate hydridization method. Apple. Environ. Microbiol., 66:3036-3038.

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