14(1) 285-292, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Screening of bacterial flora isolated from the gastrointestinal tract of silver carp broodstocks (*Hypophthalmichthys molitrix*) as probiotics

Mehran Avakh Keysami *, Afshar Zoughi Shalmani, Askar Zahmatkesh Kumleh, Ali Karimi

Aquatics and Fisheries Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

Key Words

Screening Probiotics
Digestive tracts
Bacterial flora
Hypophthalmichthys molitrix

Abstract

Introduction: This study was conducted to screen 7 species of the broodstocks silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) digestive tracts bacterial flora including *Bacillus subtilis*, *Enterobacteriaceae*,*Corynebacterium jijicum*,*Staphylococcus, Pseudomonas*, *Micrococcus luteus*, *Aeromonas*, and *Unidentified*.

Materials & Methods: Antibacterial activities of these candidates bacterial flora were conducted under disc diffusion, well diffusion, and cross streak methods.

Results: The tree probiotics candidates (*Bacillus*, *Corynebacterium*, and *Micrococcus*) were shown antibacterial activity against pathogenic bacteria. Candidate *Bacillus* showed a significant inhibition zone (20 ml) against the pathogen in the disk diffusion method. On the other hand, the addition of 10 ml of *Bacillus* supernatant to *Aeromonas* pathogenic species leads to killing them completely at 12 hours. The pH 8 and temperature 30 º was found optimum to grow candidates bacteria and produce antibacterial bio-components. There are significant differences between 8 treatments under different dosages of candidates bacteria and control (without bacteria of beaker included silver carp larva) in fish survival ($P<0.05$).

Conclusion: From this, we can conclude that the candidate *Bacillus subtilis* maybe can be probiotics for silver carp culture.

* Corresponding Author's email: dr.keysami@gmail.com
Received: 22 May 2021; Reviewed: 26 June 2021; Revised: 30 August 2021; Accepted: 2 October 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.297992.2605

مقاله پژوهشی

غربال‌گری فلور باکتریایی جداسازی شده از دستگاه گوارش مولدین ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) به‌عنوان پروبیوتیک

مهران آوخ کیسمی*، افشار ذوقی شلمانی، عسگر زحمتکش کومله، علی کریمی

بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

کلمات کلیدی

غربالگری
پروبیوتیک
دستگاه گوارش
فلور باکتریایی
کپور نقره‌ای

چکیده

مقدمه: این تحقیق با هدف غربال‌گری ۷ گونه از نمونه‌های باکتریایی دستگاه گوارش مولدین ماهی کپور نقره‌ای شامل: *Bacillus subtilis*، *Entrobacteriaceae*، *Aeromonas*، *Corynebacterium jijicum*، *Staphylococcus*، *Pseudomonas*، *Unidentified* و *Micrococcus lutieus* به‌منظور تولید پروبیوتیک انجام گردید.

مواد و روش‌ها: آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، با سه روش انتشار درچاهک، انتشار در دیسک و روش متقاطع انجام گرفت. فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌هایی که با هر سه روش بیش‌ترین فعالیت آنتاگونیستیک را نشان دادند تحت تاثیر pH، نمک، دما و زمان مختلف بررسی گردید. اثربخشی سوسپانسیون سه گونه کاندید پروبیوتیک و باکتری پاتوژن آئروموناس روی درصد مرگ و میر لارو ماهی کپورنقره‌ای در شرایط آزمایشگاهی با غلظت‌های مختلف باکتری‌های کاندید ($۱۰^{۵}$ ، $۱۰^{۷}$ ، سلول در میلی‌لیتر) و یک شاهد بدون باکتری در آب ارلن یک لیتری شامل لارو ماهی کپورنقره‌ای بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد سه گونه *Bacillus subtilis*، *Corynebacterium jijicum* و *Micrococcus lutieus* فعالیت آنتاگونیستی در مقابل پاتوژن‌ها دارند. باسیلوس اثر ممانعت‌کنندگی معنی‌داری را برای پاتوژن در روش انتشار در دیسک با قطر ناحیه ممانعت‌کنندگی ۲۰ میلی‌متر نشان داد. افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از گونه باسیلوس به پاتوژن آئروموناس جمعیت آن را در ۱۲ ساعت به حداقل رسانید. رشد مطلوب و تولید ترکیبات ضدباکتریایی نمونه مورد نظر در pH=۸ و دمای ۳۷ و۳۰ درجه سانتی‌گراد دیده شد. درصد بقای بین تیمارها و شاهد، تیمار ۹٦ ساعته بچه‌ماهیان با گروه‌های باکتریایی کاندید معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصله از این تحقیق، گونه *Bacillus subtilis* غربال شده می‌تواند به‌عنوان یک پروبیوتیک درنظر گرفته شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: dr.keysami@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۵ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۸ شهریور ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۰ مهر ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.297992.2605

مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب ضررهای زیادی در آبزی‌پروری می‌شود. ازجمله این ضررها می‌توان به بالا رفتن هزینه تولید، انباشتگی در محیط و درنتیجه آلوده کردن محیط، انباشتگی در بدن آبزی و در نهایت ایجاد سویه‌های مقاوم در بدن میزبان اشاره کرد (۱). آلاینده‌های شیمیایی، دارویی، مواد آلی و حتی ژن‌های مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک‌ها که در اثر خروجی‌های آب مزارع پرورشی به محیط طبیعی آزاد می‌شوند، نگرانی‌های عمده‌ای را به‌وجود آورده‌اند که نه‌تنها به تجمع این مواد در پیکره آبزیان منجر گردیده، بلکه در مسیر انتقال خود به غذای انسانی نیز رسیده‌اند (۲). کاربرد بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک در آبزی پروری می‌تواند باعث مقاوم‌سازی باکتری‌های آسیب‌زا شده و از این رو می‌تواند برای سلامت انسان مخاطره‌آمیز باشد (۳). علاوه بر موارد مذکور، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی سبب استرس زیاد در آبزیان می‌گردد. این موارد باعث شد تا دانشمندان در پی یافتن جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران است که برای بیماری‌های آبزیان، به‌صورت طبیعی و بیولوژیک استفاده می‌شود (۱). در سال‌های اخیر به نقش و اهمیت پروبیوتیک‌های برگرفته از میکروفلور یک گونه و تأثیر آن بر شاخص‌های رشد و ایمنی همان گونه مورد توجه قرار گرفته است (۴). Yasemi و همکاران به بررسی باکتری‌های پروبیوتیکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند (۵). Hanol و همکاران ۲۵ نوع باکتری تولیدکننده اسیدلاکتیک جهت تولید بیوتیک را از ماهیان آب‌شیرین دریاچه Egirdir ترکیه جداسازی نمودند (۶). Yegane و همکاران استفاده از پروبیوتیک بومی ماهیان خاویاری و تأثیر آن بر افزایش رشد و سیستم ایمنی بدن فیل‌ماهی (*Huso huso*) را بررسی کردند (۷). پروبیوتیک‌ها قادرند تا از طریق بهبود وضعیت محیط زندگی، اتصال به دستگاه گوارش و کلنی سازی در آن، رقابت در مصرف مواد مغذی، تولید ترکیبات مفید (آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و غیره)، تولید ترکیبات آنتاگونیستی و تحریک سیستم ایمنی به حفظ سلامتی موجود و ایجاد فلور روده‌ای متعادل کمک نمایند (۲). مصرف آن‌ها در جیره‌های غذایی آبزیان پرورشی موجب بهینه‌سازی تعادل جمعیت میکروبی دستگاه گوارش شده و تاثیرات بسیار مطلوبی را بر رشد و بقاء آن‌ها ایجاد می‌نماید (۸). اصلاح زیستی محیط‌های آبی به‌منظور بهینه‌سازی منابع آبی ازجمله اهدافی است که حضور برخی باکتری‌های زیست‌یار، موجب از بین رفتن آلودگی‌ها و بهبود فاکتورهای کیفی آب می‌گردد. در برخی کشورها، توسعه پایدار آبزی‌پروری با به‌کارگیری این باکتری‌ها روبه گسترش بوده که ازجمله باکتری‌هایی نظیر *Bacillus* sp، *Nitrobacter* sp و *Nitrosomonas* sp قابل ذکر می‌باشند (۹). بیش‌ترین تلاش‌ها در آبزی‌پروری پایدار در ارتباط با استراتژی‌های تغذیه‌ای و بهینه‌سازی ترکیبات غذایی برای گونه‌های مهم ماهیان تجاری قابل پرورش می‌باشد. این مطالعات در جهت افزایش کار آیی ترکیبات مغذی نظیر پروتئین و چربی‌ها و افزایش قابلیت هضم آن‌ها است (۱۰). در این خصوص میکروارگانیزم‌هایی نظیر مخمر ساکارومایسیس *Saccharomyces cervisiae* و باکتری‌های گرم‌مثبت *Lacobacillus sp*، *Bacillus sp* و باکتری‌های گرم منفی *Aeromonas sp* و *Vibrio sp* به‌عنوان مکمل‌های میکروبی در جیره‌های ماهیان، نتایج مطلوبی را در افزایش کار آیی تغذیه و عملکرد تولید آن‌ها داشته است (۲). تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر آبزیان پرورشی با دیدگاه‌های متفاوتی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آن‌ها، پیشگیری و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و هم‌چنین ارتقای عملکرد رشد آبزیان پرورشی، در تحقیقات بی‌شماری توسط محققان شیلاتی تائید شده است. استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید در صنایع آبزی‌پروری به‌منظور مدیریت بیماری‌ها امروزه به‌کل روش‌های درمانی و حتی پیشگیری بسیار جدی گرفته شده است که در برخی کشورهای دوستدار محیط زیست ارجحیت بیش‌تری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها یافته است (۲). فلور باکتریایی مفیدی وجود دارند که ضریب هضم و جذب غذا و کیفیت آب مزرعه پرورشی را بهبود بخشیده و در رقابت با فلور باکتریایی بیماری‌زا (پاتوژن) را حذف می‌نماید. تقریباً ۶۰ تا ۷۰ درصد هزینه تولید ماهی مربوط به غذا است که با مدیریت فلور باکتریایی آبزی می‌توان با افزایش ضریب هضم و جذب غذا، ضریب تبدیل غذا را بهبود داده و هزینه غذای مصرفی را به صفر تقلیل داد (۱۱). پروبیوتیک‌ها باعث افزایش اشتها، مصرف غذا، رشد ماهی و کیفیت گوشت آن می‌گردند (۱۲). ازاین‌رو پیوسته محققان و پرورش دهندگان در پی یافتن راهکارهای نوین و بهتر برای بالابردن اثربخشی پروبیوتیک در آبزی‌پروری هستند. در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در تکثیر و پرورش آبزیان بسیار مورد توجه قرار گرفته و تاکنون در آزمایش‌ها و تحقیقات گوناگون، اثربخشی پروبیوتیک‌ها بررسی شده و نتایج خوبی به‌همراه داشته است (۱۳). از طرف دیگر یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده آبزی‌پروری، صدمات و آثار سوئی است که از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی‌کننده است که برای مبارزه با بیماری‌ها استفاده می‌شود، اما برعکس، افزودنی‌های غذایی مانند محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک‌ها نویدبخش آبزی‌پروری پایدارتر و سالم‌تر را می‌دهد (۱۴). با توجه به این‌که در خصوص استخراج و شناسایی باکتری‌های بومی دستگاه گوارش ماهی کپور نقره‌ای استخرهای پرورشی استان گیلان تحقیق چندانی انجام نشده

است و از طرف دیگر چون برخی از پرورش‌دهندگان ماهی از پروبیوتیک غیربومی در مدیریت تولید استفاده می‌کنند، انجام این تحقیق می‌تواند مطالعات پایه‌ای و زمینه‌ای مناسب برای تولید پروبیوتیک بومی را ایجاد نماید تا در آینده برای کنترل بیماری‌ها و افزایش رشد و بازماندگی ماهی در مرحله پرورش در استخرهای پرورشی بتوان از آن استفاده نمود. هدف از این تحقیق غربال‌گری تعدادی از فلور باکتریایی دستگاه گوارش مولدین کپور نقره‌ای به‌عنوان کاندید پروبیوتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از اردیبهشت تا آذر ۱۳۹۶ در مرکز آموزش علوم شیلاتی میرزاکوچک خان گیلان انجام شد. مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل محیط‌های کشت باکتریایی مورد نیاز مانند TCBS، TSA، TSB، TSI، NA، MC، NB، آب پپتونه و دیگر محیط‌های مورد نیاز جهت انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و نرم‌افزاری باکتری‌شناسی مورد نیاز جهت مطالعات میکروبیولوژیکی از آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز آموزش جهاد کشاورزی میرزاکوچک خان، آزمایشگاه آب و خاک شالیزار نوین و آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه پوترای مالزی تأمین گردید. هفت گونه از نمونه‌های باکتریایی گرم‌مثبت که از دستگاه گوارش مولدین ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) که توسط Karimi جداسازی شده بود (*Bacillus subtilis*، *Entrobacteriaceae*، *Aeromonas*، *Corynebacterium jijicum*، *Staphylococcus*، *Pseudomonas*، *Unidentified* و *Micrococcus lutieus*)(۱۵) به‌عنوان باکتری‌های کاندید پروبیوتیک در این تحقیق در نظر گرفته شد.

کشت میکروبی: برای تهیه کشت میکروبی نمونه‌ها کشت مایع باکتری‌های کاندید پروبیوتیک با سرم‌فیزیولوژی رقیق‌سازی شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سه نسخه یک‌جور روی پلیت‌های محیط کشت کشت گردید. چند نوع محیط باکتری‌شناسی برای ایزوله اولیه (جداسازی) و شمارش کلی باکتری‌ها (تعیین TPC) انتخاب شد. NA، TSA برای باکتری‌های هتروتروفیک هوازی، TSA برای باکتری‌های هتروتروفیک غیرانتخابی، MC برای *Enterobacteriaceae*، TCBS برای جنس ویبریو و آئرومونس و محیط جداکننده سودوموناس (PA) برای جداسازی سودوموناس، آب پپتونه، NB و TSB برای کشت اولیه باکتری‌ها و انبوه‌سازی آماده، سپس همه پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ -۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، به‌جز پلیت مک‌کانکی که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۶). رشد باکتری با کدر شدن محیط مایع و ظهور پرگنه بر روی محیط کشت جامد مشخص گردید. نمونه‌های رشد یافته پس از کشت مجدد خالص‌سازی شده و براساس جدول آزمایشات شیمیایی اقدام به‌بررسی و مطالعه خواص آن‌ها نموده و تا حدگونه بازشناسایی گردیدند (۱۷).

بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی گروه‌های اصلی جداسازی شده: قبل از هر آزمایشی کشت‌ها در TSB فعال شدند و سپس در TSA به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. چند گونه باکتریایی *Aeromonas hydrophila*، *Vibrio parahaemolyticus*، *Salmonella* sp، *Pseudomonas aeroginosa*، *Escherichia coli*، *Vibrio cholerae* از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و در این تحقیق به‌عنوان پاتوژن مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی (in-vitro)، با سه روش آنتی باکتریال که شامل انتشار در چاهک (Well diffusion)، انتشار در دیسک (Disc diffusion) و روش متقاطع (Cross streak method) بود انجام گرفت (۱۸). بعد از این مرحله نمونه‌هایی که با هر سه روش بیش‌ترین فعالیت آنتاگونیستی را نشان دادند به‌منظور شناسایی قطعی تا حد گونه به دانشگاه پوترای مالزی ارسال شده و به‌وسیله نرم‌افزار بیولوگ (Biolog, Inc., California, USA) شناسایی گردیدند.

اثر شرایط رشد روی فعالیت پروبیوتیکی نمونه کاندید: اثر pH، نمک، دما و زمان روی فعالیت ضدباکتریایی نمونه کاندید پروبیوتیک مطالعه شد. با افزودن اسیدکلریدریک، محیط TSB استریل با pHهای ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تهیه گردید و با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته از کاندیدای پروبیوتیک به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در سه تکرار در انکوباتور پرورش یافت. محیط‌های TSB مشابه با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد کلرید سدیم آماده شد، سپس کاندیداهای پروبیوتیک به آن‌ها تلقیح و در انکوباتور پرورش یافتند. هم‌چنین ۱۲ لوله آزمایش محتوی محیط مایع TSB با کاندیدهای پروبیوتیک در دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور پرورش و سانتریفیوژ گردید (Behdad, Type: BH- 1200). بخش مایع از محصول سانتریفیوژ شده سلول باکتری‌ها برای مطالعه فعالیت ضدباکتریایی جمع‌آوری شد. از کشت‌های پرورش داده شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (دمای اپتیمم رشد در این تحقیق) در فاصله‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری به‌منظور بررسی ارتباط میان مرحله رشد باکتری کاندید و تولید ترکیبات ضدباکتریایی نمونه‌برداری گردید (۱۸).

بررسی اثربخشی سوسپانسیون سه گونه کاندید پروبیوتیک و باکتری پاتوژن آئرومونس روی درصد مرگ‌ومیر لارو ماهی کپور نقره‌ای در شرایط آزمایشگاهی: در این مرحله قوی‌ترین نمونه‌های مثبت باکتری‌های کاندید (۳ گونه) که دارای بیش‌ترین خاصیت آنتی‌باکتریال براساس روش انتشار در دیسک بر علیه باکتری آئرومونس هیدروفیلا بودند به‌همراه باکتری پاتوژن آئرومونس به‌عنوان

شاهد منفی برای استفاده در این تحقیق به روش Sugita و همکاران (۱۱) در نظر گرفته شد. این باکتری‌ها در محیط مایع NB پرورش و روی محیط جامد NA نگه‌داری شدند. کشت‌های باکتری‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در ارلن ۲ لیتری در شیکر انکوباتور پرورش داده شد، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ و در سرم فیزیولوژی (NSS; Nacl 8.5 g L)، ۳ بار شستشو و در درجه حرارت یخچال تا زمان مصرف نگه‌داری گردیدند. کشت ۲۴ ساعته باکتری با غلظت $۱۰^{۱۳}$ سلول در میلی‌لیتر، آماده گردید. ۸ نوع تیمار تهیه‌شده با غلظت‌های مختلف باکتری‌های کاندید(۱۰۵، ۱۰۷ سلول درمیلی‌لیتر) و یک شاهد بدون‌باکتری در آب ارلن یک لیتری شامل لارو ماهی کپور نقره‌ای آماده شد (جدول ۱). این تیمارها به‌ترتیب با عناوین PF1، PF2، PF3، PF4، PF5، PF6، PF7و PF8و شاهد (CF) نام‌گذاری شدند (۱۹). در مجموع ۲۰۰ لارو ماهی کپور نقره‌ای از کارگاه تکثیر تعاونی ۱۲ رشت جمع‌آوری،وزن و در ۱۸ ارلن‌شیشه‌ای یک لیتری به‌میزان ۱۰ لارو ماهی در هر ارلن ذخیره‌سازی گردیدند. لاروها با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم (Type A2005 Sartarius GMBH GOTTING, Germany) وزن شدند. وزن متوسط لاروهادرشروع آزمایش(±SD) ۰/۰۰۳±۰/۰۲ گرم بود.لاروهابه‌منظور سازگاری با شرایط آزمایش به‌مدت ۶ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگه‌داری شدند. غلظت‌های مختلف باکتری کاندید براساس کارهای قبلی پژوهشگران به آب ارلن لاروها اضافه گردید (۱۸، ۲۰).

جدول ۱: طرح و آزمایش با ۸ تیمار تهیه‌شده با غلظت‌های مختلف باکتری‌های کاندید و یک شاهد بدون باکتری در آب ارلن یک لیتری شامل لارو ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

تیمار	تکرار
تیمار شاهد و بدون سوسپانسیون باکتری: CF	۲
باسیلوس با غلظت ۵×۱۰^{۷} : PF_1	۲
باسیلوس با غلظت ۵×۱۰^{۵} : PF_2	۲
آئروموناس با غلظت ۵×۱۰^{۷} : PF_3	۲
آئروموناس با غلظت ۵×۱۰^{۵} : PF_4	۲
کورینه باکتریوم با غلظت ۵×۱۰^{۷} : PF_5	۲
کورینه باکتریوم با غلظت ۵×۱۰^{۵}: PF_6	۲
میکروکوکوس با غلظت ۵×۱۰^{۵}: PF_7	۲
میکروکوکوس با غلظت ۵×۱۰^{۷}: PF_8	۲
مجموع	۱۸

این آزمایش در یک‌طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار و شاهد اجرا گردید. هر تیمار ۲ تکرار و ۱۰ لارو ماهی‌در هر ارلن داشت.در خلال آزمایش ارلن‌ها با پمپ هوای آکواریومی هوادهی گردیدند. روشنایی به‌صورت۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با نور لامپ مهتابی برای ارلن‌ها درنظر گرفته شد. درصد بقای لاروها با جمع‌آوری تلفات ساعتی ارلن‌ها برآورد گردید. درطی مدت۹۶ ساعت هیچ‌نوع غذادهی، تعویض آب صورت نگرفت. نمونه‌های تلف‌شده در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت‌بعد از شروع آزمایش جمع‌آوری و شمارش گردیدند.

تجزیه وتحلیل داده‌ها: داده متغیرهای درصد بقای لاروها در تیمارها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری α=۰/۰۵ و ارتباط بین متغیرهای فعالیت ضد باکتریایی و مدت زمان آنکوباسیون و تعداد سلول‌های باکتری با رگرسیون خطی در نرم‌افزار Spss 20 ارزیابی گردید (۲۱). سطح معنی‌دار بودن در سطح($p<$۰/۰۵)قابل قبول درنظر گرفته‌شد.تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد (SPSS, Inc., USA).

نتایج

نتایج مربوط به آزمایشات غربال‌گری پروبیوتیکی: نتایج روش‌های غربال‌گری Well diffusion, Disc diffusion, Cross streak methodنشان داد که سه کاندیدای پروبیوتیک (باسیلوس، میکروکوکوس و کورینه باکتریوم) همگی فعالیت آنتاگونیسمی مقابل پاتوژن دارند (جدول ۲). باسیلوس اثر ممانعت‌کنندگی معنی‌داری را برای پاتوژن *Aermonas hydrophilla* در هر دو روش Well diffusion, Disc diffusion نشان داد. در روش Well diffusion قطر ناحیه ممانعت کنندگی ۱۷ میلی‌متر بود درحالی‌که در روش Disc diffusion، قطر ناحیه ممانعت‌کنندگی ۲۰ میلی‌متر به‌دست آمد. گونه‌های *Bacillus subtilis*، *Corynebacterium jijicum* و *Micrococcus lutieus* با استفاده‌از روش‌های بیوشیمیایی و نرم‌افزار بیولوگ شناسایی گردیدند. تاثیر بخش مایع، از سانتریفیوژ باکتری‌های گونه *Bacillus* sp.، *Corynebacterium* و *Micrococcus* روی سلول‌های *A. hydrophila* در سرم نرمال سیلین استریل در جدول ۳ آورده شده است. افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از بخش مایع گونه باسیلوس به پاتوژن‌ها منجر به سرکوبی کامل آن‌ها در ۱۲ ساعت گردید. افزودن مقدار کم‌تر به *A. hydrophila* هیچ اثر ممانعت‌کننده‌ای نداشت. اثر pH روی رشد باسیلوس در مقادیر ۶، ۷، ۸ و ۹ مشاهده‌شد. اپتیموم رشددر pH=۸ ثبت شد. این مقدار ماکزیمم اثر ممانعت‌کنندگی از رشد را در مقابل *A. hydrophila* داشت. کم‌ترین میزان رشد باکتریایی در pHهای ۶ و ۹ مشاهده‌گردید.رشدباکتریایی در pHهای ۴ و ۵ مشاهده نگردید. ناحیه منع رشد در pHهای ۶ و ۹ به‌ترتیب ۸ و ۹/۵ میلی‌متر بود (جدول ۴).اثر دماروی تولید ترکیبات ضدباکتریایی به‌وسیله باسیلوس نشان داد که رشد کمی در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد وجود داشته

و در دمای۲۰ درجه رشد مینیموم است. ماکزیموم رشد باکتریایی در دمای۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۵). نتایج حاصل از اثر غلظت NaCL محیط کشت بر روی تولید ترکیبات ضدباکتریایی نشان داد که TSB با NaCL یک درصد، برای رشد با ۱۹ میلی‌متر ناحیه منع رشد، اپتیموم است. ناحیه منع رشد برای TSB با دو درصد و صفر درصد NaCL ، ۱۶/۵ میلی‌متر بود. رشد حداقل برای TSB حاوی سه درصد و چهار درصد NaCL است. هیچ فعالیت ضدباکتریایی در این غلظت مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول ۲: اثرات ضدباکتریایی کاندیدای پروبیوتیک برعلیه باکتری‌های پاتوژن رشد یافته روی محیط کشت TSA

Vibrio cholerae			*Salmonella sp*			*Pseudomonas aeroginosa*			*Escherichia coli*			*Vibrio parahaemolyticus*			*Aeromonas hydrophila*			*Candidates*
1	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*Aeromonas*
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	*Entrobacteriaceae*
+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*Micrococcus*
+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	*Corynebacterium*
-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	*Staphylococcus*
+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	*Pseudomonas*
-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	*Bacillus sp*
+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	*Unidentified*

جدول ۳: تاثیر بخش مایع، از سانتریفیوژ گونه باسیلوس، کورینه باکتریوم و میکروکوکوس روی سلول‌های آئروموناس

شماره نمونه	حجم پلاسمای سانتریفیوژ شده نمونه‌های کاندید (ml)	*A.hydrophila counts/ml at* ۲۴h	۱۲h	۰h
Bacillus sp (1)	۰	۴/۱۲×۱۰^{۶}	۵/۶۶×۱۰^{۶}	۳/۶۲× ۱۰^{۷}
Bacillus sp (2)	۱	۴/۳۱× ۱۰^{۷}	۳/۶۰× ۱۰^{۷}	۱/۵۳× ۱۰^{۷}
Bacillus sp (3)	۵	۱/۲۲×۱۰^{۵}	۳/۶۲×۱۰^{۵}	۲/۳۶× ۱۰^{۷}
Bacillus sp (4)	۱۰	۳/۲×۱۰^{۱}	۲/۳۱×۱۰^{۳}	۲/۸۶× ۱۰^{۷}
Corynebacterium sp (1)	۰	۳/۹۸×۱۰^{۶}	۶/۵۶×۱۰^{۵}	۳/۵۲× ۱۰^{۷}
Corynebacterium sp (2)	۱	۱/۶۱×۱۰^{۶}	۳/۶۲×۱۰^{۶}	۱/۳۹× ۱۰^{۷}
Corynebacterium sp (3)	۵	۳/۶۲×۱۰^{۵}	۱/۱۳×۱۰^{۶}	۲/۱۶× ۱۰^{۷}
Corynebacterium sp (4)	۱۰	۲/۹۸×۱۰^{۳}	۲/۸۲×۱۰^{۵}	۱/۵۲× ۱۰^{۷}
Micrococcus sp (1)	۰	۱/۹۸×۱۰^{۵}	۷/۵۶×۱۰^{۵}	۲/۵۲× ۱۰^{۷}
Micrococcus sp (2)	۱	۲/۵۱×۱۰^{۶}	۳/۳۵×۱۰^{۶}	۱/۵۳× ۱۰^{۷}
Micrococcus sp (3)	۵	۲/۵۲×۱۰^{۴}	۲/۱۳×۱۰^{۶}	۲/۲۵× ۱۰^{۷}
Micrococcus sp (4)	۱۰	۳/۹۲×۱۰^{۴}	۳/۶۲×۱۰^{۵}	۲/۲۹× ۱۰^{۷}

جدول ۴: اثر pH روی رشد باسیلوس و تولید ترکیبات ضدباکتریایی

pH	رشد	ناحیه ممانعت از رشد (میلی‌متر) ۱۲ ساعت	۲۴ساعت	۴۸ساعت
۴	–	۰	۰	۰
۵	–	۰	۰	۰
۶	+	۰	۰	۸
۷	+ +	۰	۱۱	۱۲
۸	+ ++	۰	۱۴	۱۶
۹	+	۰	۰	۹/۵

+ + + :رشد زیاد + + : رشد متوسط + :رشد کم

جدول ۵: اثر دما و شوری روی رشد باسیلوس و تولید ترکیبات ضدباکتریایی

دمای انکوباسیون	رشد	ناحیه ممانعت از رشد (میلی‌متر) ۴۸ h	۲۴ h	۱۲ h
۱۰	+	۰	۰	۰
۲۰	+	۶,۵	۷	۵,۵
۳۰	+ + +	۱۴	۱۷	۱۵.۵
۳۷	+ + +	۱۴	۱۷	۱۶
درصد غلظت نمک				
۰	+ ++	۱۶,۵	۱۵,۵	۱۰
۱	+ + +	۱۹	۱۶	۱۰
۲	++	۱۶,۵	۱۴	۹
۳	+	۰	۰	۰
۴	–	۰	۰	۰

+ + + :رشد زیاد + + : رشد متوسط + :رشد کم

براساس جدول ۶، تداوم انکوباسیون و ماکزیموم فعالیت ضد باکتریایی فقط در ۳۰ ساعت مشاهده شد و بیش‌تر از این مدت، تغییری در ناحیه ممانعت از رشد مشاهده نگردید. با بررسی اثربخشی سوسپانسیون سه گونه کاندیدای پروبیوتیک و باکتری پاتوژن آئروموناس روی درصد مرگ‌ومیر لارو ماهی کپور نقره‌ای در شرایط آزمایشگاهی در خلال ۹۶ ساعت نتایج نشان داد که *B. subtilis* تأثیر معنی‌داری روی درصد بقای مرحله لاروی دارد ($P<0/05$). اگرچه بین درصد بقای گروه‌های تیمار و شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید اما بین درصد بقای تیمارهای غلظت‌های مختلف باسیلوس اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($p>0/05$). رابطه تعداد سلول باکتری و فعالیت پروبیوتیکی نشان داد که با افزایش سلول‌های باکتری، اثربخشی پروبیوتیکی آن بیش‌تر می‌گردد. سایر گونه‌های کاندید گرچه در مراحل قبلی غربال‌گری کاندید پروبیوتیک بودند، لیکن ایجاد تلفات در لاروها نشان داد که عملکرد مشابه پاتوژن آئروموناس داشته و قابل بهره‌برداری جهت پروبیوتیک نیستند (جدول ۷).

جدول ۶: اثر تداوم انکوباسیون روی تولید ترکیبات ضد باکتریایی

شمارش باکتری (Cfu/ml)	ناحیه ممانعت از رشد (میلی‌متر)	مدت‌زمان آنکوباسیون (ساعت)
۱/۱۶× ۱۰^{۵}	۰	۰
۲/۱۶× ۱۰^{۶}	۰	۶
۳/۲۱× ۱۰^{۸}	۱۳	۱۲
۲/۱۸× ۱۰^{۹}	۱۵	۲۴
۷/۳۵× ۱۰^{۹}	۱۶	۳۰
۲/۱۶× ۱۰^{۹}	۱۶	۳۶
۱/۹۶× ۱۰^{۹}	۱۶	۴۸
۲/۱۱× ۱۰^{۸}	۱۶	۷۲

جدول ۷: اثربخشی سوسپانسیون سه گونه کاندیدی پروبیوتیک و باکتری پاتوژن آئروموناس روی درصد مرگ و میر لارو ماهی کپور نقره‌ای (تعداد لارو تلف‌شده/تعداد کل لارو در ارلن) در شرایط آزمایشگاهی در خلال ۹۶ ساعت

تیمارها	تعداد تلفات لاروها				
	۱۲h	۲۴ h	۴۸h	۷۲h	۹۶h
B. subtilis (5×10^7 cells mL^{-1})	۰/۱۰^{a}	۲/۱۰^{a}	۲/۱۰^{a}	۲/۱۰^{a}	۴/۱۰^{b}
B. subtilis (5×10^5 cells mL^{-1})	۰/۱۰^{a}	۱/۱۰^{a}	۲/۱۰^{a}	۳/۱۰^{a}	۴/۱۰^{b}
control (10^0 cells mL^{-1})	۰/۱۰^{a}	۲/۱۰^{a}	۳/۱۰^{a}	۶/۱۰^{b}	۱۰/۱۰^{c}
A. hydrophila (5×10^5 cells mL^{-1})	۶/۱۰^{b}	۱۰/۱۰^{c}	----	----	----
A. hydrophila (5×10^7 cells mL^{-1})	۱۰/۱۰^{c}	----	----	----	----
Corynebacterium (5×10^5 cells mL^{-1})	۶/۱۰^{b}	۱۰/۱۰^{c}	----	----	----
Corynebacterium (5×10^7 cells mL^{-1})	۱۰/۱۰^{c}	----	----	----	----
Micrococcus (5×10^5 cells mL^{-1})	۶/۱۰^{b}	۱۰/۱۰^{c}	----	----	----
Micrococcus (5×10^7 cells mL^{-1})	۱۰/۱۰^{c}	----	----	----	----

حروف ناهمسان در یک ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری ($\alpha<0/05$) است.

بحث

نتایج مربوط به آزمایشات فعالیت‌های ضدباکتریایی (Well diffusion, Disc diffusion, Cross streak method) در این تحقیق نشان داد که نمونه‌های باسیلوس، میکروکوکوس و کورینه‌باکتریوم در این مطالعه دارای فعالیت ضدباکتریایی و ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری‌های پاتوژن را دارند. براساس نظر Ye و همکاران، ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی به نوع غذا، مورفولوژی لوله گوارش، ظرفیت هضم و رفتارهای فیزیولوژیکی ماهی بستگی دارد (۲۲). Ibrahem بیان کرد که گونه‌های *Bacillus* spp.، *Lactobacillus* spp.، *Streptococcus* spp.، *Pseudomonas* spp. و *Aeromonas* spp. باکتری‌های پروبیوتیکی بالقوه در لوله گوارش ماهی هستند (۲۳، ۲۴). هم‌چنین در بیست سال گذشته مطالعات زیادی نشان داده که گونه‌های *Bacillus* ویژگی‌های پروبیوتیکی قابل‌ملاحظه‌ای از قبیل تقویت سیستم ایمنی میزبان، بهبود کیفیت آب، تأثیر آنتاگونیستی در مقابل عوامل آسیب‌زا و مواردخورده شده طبیعی به‌وسیله حیوانات را دارند (۲۵). Yasemi و همکاران با بررسی باکتری‌های پروبیوتیکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گونه‌های *Bacillus* را با فراوانی بیش‌تر نسبت به دیگر گونه‌ها مشاهده نمودند. فعالیت آنتاگونیستی گونه *B. subtilis* جداسازی شده در این تحقیق در برابر پاتوژن‌های سالمونلا، آئروموناس، ویبریو و اشرشیاکلای در تحقیقات سایرین نیز گزارش شده است (۲۶). Bossier و همکاران در سال

۱۹۸۸ یک گونه باسیلوس را جداسازی کردند که به ۶۳٪ از باکتری های جداسازی شده روده ماهی فعالیت آنتاگونیستیک داشت (۲۷). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، دربرگیرنده تولید فعالیت ضد باکتریایی مقابل باکتری پاتوژن آزمایش شده بود و این مورد که جمعیت آئروموناس در ۱۲ ساعت در اثر افزودن بخش مایع از سانتریفیوژ این گونه باسیلوس، به‌حداقل رسید را شاید بتوان به تولید ترکیبات ضدباکتریایی خارج سلولی این گونه باسیلوس نسبت داد. فعالیت‌های آنتاگونیستی نتیجه تولیدات خارج از سلولی ایجاد شده از قبیل آنزیم، موکوس‌های ترکیبی و هورمون‌ها توسط باکتری است که رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها را محدود می‌کند. آن‌ها از طریق رقابت غذائی و فضا آن‌ها را محدود می‌کنند (۲۸). این یافته به‌وسیله گزارش‌هایی که *B. subtilis* را به‌عنوان تولیدکننده طیف وسیعی از ترکیبات ضدباکتریایی و ضدجلبکی معرفی کرده‌اند تائید شده است (۲۹، ۳۰، ۳۱). این گونه آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی از قبیل difficidin و oxydifficidin را که مقابل طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی فعالیت دارد (۳۲). بهتر از آنتی‌بیوتیک‌های معمول از قبیل bacitracin, bacillin و bacillomycin B تولید می‌کند. ظهور فعالیت ضدباکتریایی درون محیط موقعی است که سلول‌ها به فاز ایستایی رشد می‌رسند، به‌عبارت‌دیگر ماکزیمم فعالیت در فاز ایستایی را ناشی از فاکتورهای ضدباکتریایی یا متابولیت ثانویه این باکتری‌ها می‌دانند (۳۳). آن‌ها گزارش کردند که گلدفیش طیف گسترده‌ای از فلور میکروبی را دارد اما عمدتاً ترکیبی از باسیل‌های گرم مثبت است. آن‌ها با بررسی پنج گونه از باکتری‌های جداسازی شده که فعالیت آنتاگونیست بالا داشتند گونه *Bacillus thuringiensis* را به‌عنوان پروبیوتیک مطلوب در مبارزه با طیف گسترده‌ای از عوامل آسیب‌زای ماهی و مقاوم به عوامل زیست‌محیطی نامناسب از قبیل pH پایین و دمای بالا گزارش نمودند. در این تحقیق ماکزیمم تولید فاکتورهای ضدباکتریایی در pH= ۸، دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شوری ۱درصد مشاهده شد. این ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی می‌تواند اپتیموم pH، دما، شوری برای رشد این ماهی در شرایط پرورشی درنظر گرفته شود. بنابراین امکان استفاده از این گونه در شرایط پرورشی وجود دارد، زیرا باکتری‌های با فعالیت آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی دارای پتانسیل کاربردی به‌عنوان پروبیوتیک محسوب می‌گردند (۳۴). به‌علاوه آئروموناس که یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب در محیط‌های آبزی پروری می‌باشد در این تحقیق با گونه کاندید به‌دست آمده و کاندید پروبیوتیک کنترل شده، حذف گردیده است (۳۵). تأثیر *B. subtilis* در افزایش درصد بقاء لارو در این تحقیق می‌تواند از راه تغذیه مستقیم گونه مورد نظر توسط لارو ماهی کپور نقره‌ای و حتی از راه اثر تغذیه‌ای غیرمستقیم باشد (۳۶)، بدین ترتیب که این باکتری‌ها ترکیبات سمی و غیر تغذیه‌ای محیط را هضم می‌کنند، از طرفی *B. subtilis* انواع مختلفی از پروتئاز و سایر انواع آنزیم‌ها را تولید می‌کند که می‌تواند انواع مواد آلی و مواد غذایی را تجزیه نموده و به مواد مغذی قابل‌جذب تبدیل کند (۳۳)، از سوی دیگر این باکتری با تولید مواد آنتی‌باکتریال و رقابت در جذب املاح غذایی و حتی با ازدیاد و تجمع باکتری‌های پاتوژن در دستگاه گوارش ماهی جلوگیری می‌کند، به علاوه تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل دیفی‌سی‌دین (Dificidin) و اکسی دیفی‌سی‌دین (Oxi dificidin) می‌کند که می‌تواند طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را از بین ببرد (۳۷). اختلاف معنی‌دار درصد بقا در تیمارهای با غلظت ۵×۱۰^{۷} و ۵×۱۰^{۷} *B. subtilis* با تیمار شاهد در این تحقیق می‌تواند بیانگر خاصیت پروبیوتیکی گونه باسیلوس سابتیلیس جداسازی شده در این تحقیق باشد. بنابراین باسیلوس خالص‌سازی شده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیک برای استفاده تکثیر و پرورش ماهی کپور نقره‌ای مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد واحد آموزش علوم وصنایع شیلاتی میرزاکوچک خان می‌باشد که بدین‌وسیله از همکاری ومساعدت کارکنان و سایر دست‌اندرکاران آن واحد تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. **Moslehi, F.; Sattari, M.; Khuskholgh, M.; Shenavar Masoule, A. and Abbas Alizadeh, A., 2013.** The effect of *Pediococcus pentosaceus* as a probiotic on growth and immune factors of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Journal of Fisheries Science and Technology. 3(4): 81-92. (In Persian)
2. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in Aquaculture. J Fish Dis. 25: 633-642.
3. **Sharifuzzaman, S.M. and Austin, B., 2017.** Probiotics for disease control in aquaculture. In: Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish (eds. Austin, B. and Newaj Fyzul, A.,). 189-222. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
4. **Burr, G., Gatlin, D. and Ricke, S., 2005.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics & probiotics in finfish aquaculture. Journal of World Aquaculture Society. 36: 425-436.
5. **Yasemi, M., Esmaeili, A.H., Feizei, Z., Ghaemmaghami, S. and Alinejad, S., 2012.** Identifying Bacterial flora of rainbow trout brood stocks (*Oncorhynchus mykiss*) and its assumed importance from probiotical view. Journal of Animal Environment. 4(2): 45-50. (In Persian)
6. **Hanol, B.Z., Ucar, F.B. and Giray, B., 2020.** Identification and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from freshwater fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 19(4): 1795-1807. DOI: 10.22092/ijfs.2018.118938.

7. **Yegane, H., Kazemi, R., Shenavar Masoule, A., Sayed Hassani, H., Yousefi Jourdehi, A., Hosseinpour Zelti, A. and Ghorbani Vagheai, R., 2021;** The effect of native probiotic on growth rate and some hematological and immune indices in *Huso huso* fingerling. Journal of Aquaculture Development. 15(1): 125-136. (In Persian)

8. **Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

9. **Shariff, M., Yusoff, F.M., Devaraja, T.N. and Srinivasa Rao, S.P., 2001.** The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, (Fabricius), ponds. Aquaculture Research, 32: 181-187.

10. **Azewedo, P.A., Leeson, S., Cho, C.Y. and Bureau, D.P., 2004.** Growth and feed utilization of size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in fresh water: diet and species effects, and responses over time. Aquaculture Nutrition. 10: 401-411.

11. **Sugita, H., Okamo, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N. and Matsuura, S., 2002.** Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. Fish Sci. 68: 1004-1011.

12. **Borch, K., Pederson, I.E. and Hogmo, R.O., 2015.** The use of probiotics in fish feed for intensive aquaculture to promote healthy guts. International Scholars Journal. 3: 264-273.

13. **Askarian, F., 2007.** Study on lactic acid bacteria as probiotics in gastrointestinal tracts of beluga (*Huso huso*). International workshop on fish larviculture. Urmia University.Iran.12-14 March 2007.135 p.

14. **Keysami, M.A., Mohammadpour, M. and Saad, C.R., 2012.** Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods of administration to the feed. Journal of Aquaculture International. 20: 499-511.

15. **Karimi, A., 2016.** Isolation and identification of the bacterial flora of the digestive system of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) broodstock and its screening as a probiotic. Master's Thesis, Higher Education Center of Fisheries Sciences and Industries, Mirza Kochak Khan, Gilan. 152 p.

16. **Anderson, I.G., Shmsudin, M.N. and Nash, G., 1989.** A preliminary study on the aerobic heterophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. Aquaculture. 81: 213-223.

17. **Berg, F., 1995.** Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossu* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. Journal of fish Diseases. 18 :31-40.

18. **Keysami, M.A., Saad, C.R., Daud, H.M., Sijam, K. and Alimon, A.R., 2005.** Comparison probiotic ability of three putative bacteria in juvenile *Macrobrachium rosenbergii* based on in vitro bacteria growth characteristics. Malaysian journal of Animal Science.

19. **Keysami, M.A., Mohammadpour, M. and Saad, C.R., 2012.** Response of Juvenile Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii (de Man)* to Different Levels of *Bacillus subtilis* Isolated from Chicken Intestine as Probiotics. Journal of Agriculture Science and Technology, ISI, online available.

20. **Meunpol, O., Lopinyosiri, K. and Menasveta, P., 2003.** The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp *(Penaeus monodon)*. Aquaculture. 220: 437-448.

21. **Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., 1995.** The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. Freeman, New York.

22. **Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowskiand, M. and Liu, W.T., 2014.** Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behaviour of invasive Asian carp and indigenous American fish. The ISME Journal. 8: 541-551.

23. **Ibrahem, M.D., 2015.** Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. Journal of Advanced Research. 6: 765-791.

24. **Hashemi Panah, A., Rafiei, Gh.R., Nikbakht, A. and Bozorgi, S., 2018.** The effect of Artemia enriched with two probiotics, *Bacillus subtilis* and *Pediococcus pentosaceus*, on the growth and survival indicators and post-carcasses composition of western white leg shrimp larvae (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Animal Environment. 11(1): 244-239. (In Persian)

25. **Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J. and Gardiner, N., 2007.** Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology. 103: 1471-1479.

26. **Sugita, H., Hirose, Y., Matsue, N. and Degudri, Y., 1998.** Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. Strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture. 165: 269-280.

27. **Bossier, P., Hofte, M. and Verstraete, W., 1988.** Ecological significance of siderophores in soil. Advances in Microbial ecology. 10: 358-414.

28. **Hagi, T. and Hoshino, T., 2009.** Screening and characterization of potential probioticlactic acid bacteria from cultured common carp intestine. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 73: 1479-1483.

29. **Korzybski, T.; Kowszyk-Gindifer, Z. and Kurylowicz, W., 1978.** Antibiotics isolated from the genus *Bacillus* (*Bacillaceae*): 1529-1661. In: Antibiotics- Origin, Nature and Properties, Vol. III. American Society of Microbiology, Washington, DC.

30. **Alexander, M., 1977.** Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York. 418 p.

31. **Katz, E. and Demain, A.C., 1977.** The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible function. Bacteriology Review. 41: 449-474.

32. **Zimmerman, S.B., Schwartz, C.D., Monaghan, R.L., Pleak, B.A., Weissberger B., Gilfillan, E.C., Mochales, S., Hernandes, S., Currie, S.A., Tejera, E. and Stapley, E.O., 1987.** Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibacterics produced by *Bacillus subtillis*. Journal of Antibacterics. 40(12): 1677-1681.

33. **Parry, J.M., Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R., 1983.** A Colour Atlas of *Bacillus* Species. Wolfe Medical Publications, Ltd., London. 186 p.

34. **Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M. and Hirayama, K., 1997.** The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia. 358: 285-290.

35. **Hoa, T.T.T., Oanh, O.T.H. and Phuong, N.T., 2000.** Study on Diseases in Giant fresh water Prawn (A review). Proceeding of the 2000 annual work shop of JIRCAS, Mecong delta Project.

36. **Keysami, M.A., Saad, C.R., Daud, HM., Sijam, K. and Alimon, A.R., 2007.** Effect of *Bacillus subtilis* on grouth development and survival of larva *Macrobracum rosenbergii (de Man)*. Aquacult Nutr. 13: 131-136.

37. **Gullian, M. and Rodriguez, J., 2002.** Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory qualities of probiotic bacteria. Global Aqua cult, Advocate. 5: 52-54.