University of Hormozgan

Journal of Aquatic Ecology

ISSN Print: 2322-2751 ISSN Online: 2980-9355

Homepage: https://jae.hormozgan.ac.ir

In vitro evaluation of probiotic properties of bacteria isolated from the digestive tract of Clark's clownfish (*Amphiprion clarkia* Bennett, 1830)

Fatemeh Shayesteh✉ [1]and Sara Ranjbar Islamlou [2]

1 .Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan , Bandar Abbas, Iran.

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: 28 May 2024
Accepted 30 October 2024
Published online: 13 December 2024

✉ Corresponding Author:
Shayesteh_fatemeh@yahoo.com

Keywords:
Probiotic,
Ornamental fish,
Digestive tract,
In vitro,
Vibrio sp.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that promote the health of their host by producing bioactive metabolites in the digestive tract, where they combat harmful microorganisms. This study aimed to isolate, screen, and identify native probiotics from Clark's clownfish (*Amphiprion clarkii*). After assessing the morphological characteristics of the isolates, their antimicrobial activity against pathogenic bacteria was evaluated using the well-diffusion method. The biosafety of the isolates was also investigated, focusing on hemolytic activity, antibiotic sensitivity, and the production of lipase and gelatinase enzymes. The selected isolates were then assessed for key probiotic traits, including resistance to acidic conditions, bile salts, and their ability to colonize the host's intestine. A total of 29 bacterial isolates were obtained from the digestive tract of *A. clarkii*, with seven showing antimicrobial activity against all the tested pathogenic bacteria. These seven isolates were further evaluated for biosafety, and isolates CS29 and CS18 demonstrated favorable biosafety profiles. Both isolates exhibited strong resistance to acidic pH, simulated gastric juice, and bile salts, as well as high hydrophobicity, aggregation potential, and co-aggregation. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed that isolates CS29 and CS18 had the highest similarity to *Vibrio kanaloae* (98.19%) and *Vibrio* sp. (97.16%), respectively. The results indicate that *Vibrio kanaloae* CS18 and *Vibrio* sp. CS29 possess broad antimicrobial activity and the ability to colonize the intestinal tract, suggesting their potential as probiotics for further in vitro study.

CC BY NC

Publisher: University of Hormozgan.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Anemone fishes, particularly Clark's clownfish, are among the most popular species in the international marine aquarium fish trade, and their production has steadily increased worldwide over time (Militz et al., 2017). However, aquaculture is currently facing significant production losses in both hatcheries and grow-out systems due to disease outbreaks. Traditionally, antibiotics have been used to treat infectious diseases; however, the improper use of antibiotics can lead to several issues, including the development of pathogen resistance and the disruption of beneficial microorganisms in the intestines of aquatic animals (Mesalhy Aly et al., 2008). As a result, there is a growing need to develop alternative strategies to control infectious diseases and improve aquaculture productivity. In this context, probiotics have emerged as a promising alternative, demonstrating effectiveness against a wide range of infectious agents, including bacteria, fungi, parasitic, and viral pathogens. Moreover, probiotics are well known to enhance fish welfare by reducing stress, promoting growth, and improving overall survivorship (Klaenhammer, 2000; Hossain et al., 2022). To date, no studies have focused on the isolation and identification of indigenous probiotics from Clark's clownfish in Iran. Therefore, this study aims to identify probiotic potential isolates from the digestive tract of this species. The findings of this research could be applied to clownfish hatcheries and rearing centers following in vivo testing.

Materials and Methods

In this study, bacteria symbiotic with the digestive tract of *A. clarkii* were isolated using Marine Agar and MRS Agar culture media. After evaluating their antimicrobial properties, the isolates were subjected to biosafety tests. The probiotic properties of the biosafe isolates were then assessed. After isolation and purification, the antimicrobial activity of the isolates was tested against seven aquatic pathogenic bacteria using the well-diffusion method (Nandi et al., 2017). Isolates that exhibited antimicrobial activity against all pathogens were further evaluated for biological safety, including tests for hemolytic activity, lipase and gelatinase enzyme production, and antibiotic sensitivity. The gamma-hemolytic isolates, which showed no lipase or gelatinase activity and exhibited low antibiotic resistance, were selected for probiotic evaluation. Probiotic characteristics of the selected isolates were assessed through tests for pH tolerance, bile salt tolerance, resistance to simulated gastric juice, cell surface hydrophobicity, auto-aggregation, co-aggregation, and the production of extracellular enzymes such as proteolytic, amylolytic, and cellulolytic enzymes. Finally, the selected isolates were identified through 16S rRNA gene sequencing.

Results

A total of 29 isolates were obtained from the gastrointestinal tract of healthy *A. clarkii*. Seven isolates exhibited antagonistic activity against all tested bacterial pathogens (Table 1 and 2). Further biosafety tests were conducted on these isolates. Among the isolates tested on blood agar plates, only CS18, CS25, and CS29 did not show hemolytic activity around their colonies. Gelatin liquefaction and lipase production were not detected in four isolates (CS7, CS8, CS18, and CS29). In the antibiotic sensitivity assay, isolates CS18 and CS29 were resistant to methicillin and ampicillin but were highly sensitive to all other antibiotics tested. Based on these findings, isolates CS18 and CS29 were confirmed to be biosafe (Table 3), and their probiotic properties were further assessed. Both isolates survived at all tested pH levels (1–3), with isolate CS29 showing a higher survival percentage compared to CS18. Isolate CS29 also demonstrated better tolerance to 0.3% and 1% sodium cholate after 180 minutes of incubation

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

compared to CS18. Additionally, CS29 exhibited superior gastric juice tolerance relative to CS18. Both isolates showed high hydrophobicity towards xylene. Furthermore, both isolates displayed strong aggregation potential in the auto-aggregation test, with CS18 showing a higher aggregation potential at 2 hours of incubation compared to CS29. The highest co-aggregation percentage was observed in both isolates with *P. aeruginosa*. Both isolates were positive for protease, amylase, and cellulase production, as evidenced by clear zones around the colonies in skim milk agar, starch agar, and carboxymethyl cellulose, respectively (Table 4). 16S rRNA gene sequencing revealed that the CS18 isolate had the highest similarity (98.19%) to *Vibrio kanaloae* strain HHN-45 (KT023527.1), and the CS29 isolate was most similar (97.16%) to *Vibrio* sp. strain VN (MH671113.1). The 16S rRNA gene sequences of isolates CS18 and CS29 have been registered in NCBI under accession numbers OP268161.1 and OP268160.1, respectively (Figure 1).

Conclusion

The two *Vibrio* strains, *V. kanaloae* CS18 and *Vibrio* sp. CS29, exhibited promising probiotic properties, including a broad spectrum of antimicrobial activity, biosafety, the ability to survive transit through the gastrointestinal tract, and the capacity to produce essential digestive enzymes. Based on these in vitro assessments, both strains show potential as probiotic candidates. However, in vivo testing is required to confirm their suitability as native probiotics for use in the hatcheries and rearing centers of this ornamental fish.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

بوم‌شناسی آبزیان
شاپا چاپی: ۲۷۵۱-۲۳۲۲ شاپا الکترونیکی: ۹۳۵۵-۲۹۸۰
https://jae.hormozgan.ac.ir
دانشگاه هرمزگان

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش دلقک ماهی کلارکی (*Amphiprion clarkii* Bennett,1830) در شرایط برون تنی

فاطمه شایسته [۱]✉ و سارا رنجبر اسلاملو[۲]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۹/۲۳

✉ نویسنده مسئول:
Shayesteh_fatemeh@yahoo.com

کلیدواژه‌ها:
پروبیوتیک،
ماهیان زینتی،
دستگاه گوارش،
برون تنی،
Vibrio sp.

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با تولید متابولیت‌های زیست فعال در دستگاه گوارش موجود زنده، باعث مقابله با میکروارگانیسم‌های بیگانه و افزایش سلامت میزبان خود می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف جداسازی، غربالگری و شناسایی پروبیوتیک بومی از دلقک ماهی کلارکی(Amphiprion clarkii) انجام شد. پس از بررسی ویژگی‌های مرفولوژیکی جدایه‌ها، فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها بر روی باکتری‌های بیماریزا با روش چاهک گذاری ارزیابی شد. ایمنی زیستی جدایه‌ها با استفاده از فعالیت همولیتیک، حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها و تولید آنزیم‌های لیپاز و ژلاتینازمورد بررسی قرار گرفت .جدایه‌های منتخب بر اساس شاخص‌های اولیه پروبیوتیکی شامل مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی و توانایی کلونیزه شدن در روده میزبان ارزیابی گردیدند و در نهایت با استفاده از روش مولکولی 16S rRNA شناسایی شدند. در مجموع ۲۹ جدایه از دستگاه گوارش *A .clarkii* جداسازی شد. که از میان آن‌ها هفت جدایه که دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه تمام عوامل بیماریزای مورد مطالعه بودند، مورد ارزیابی ایمنی زیستی قرار گرفتند. جدایه‌های CS29 و CS18 با موفقیت جنبه‌های ایمنی زیستی آن‌ها اثبات شد. جدایه‌های مذکور از نظر مقاومت به pH اسیدی، شیره معده شبیه سازی شده و نمک‌های صفراوی، آبگریزی بالا نسبت به حلال‌ها، پتانسیل تجمعی و کمک تجمعی فعالیت خوبی نشان دادند. با تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rRNA، جدایه‌های CS29 و CS18 ، به ترتیب بالاترین تشابه را با *Vibrio kanaloae* (۱۹/ ۹۸درصد) و *Vibrio* sp. (۹۷/۱۶ درصد) نشان دادند. نتایج نشان داد که جدایه‌های CS18 *Vibrio kanaloae* و CS29 *Vibrio* sp. دارای فعالیت ضد میکروبی وسیعی بوده و توانایی کلونیزاسیون در شرایط روده را دارند. این جدایه‌ها قابلیت مطالعه به عنوان پروبیوتیک در شرایط برون تنی را دارند.

ناشر: دانشگاه هرمزگان.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

مقدمه

صنعت ماهیان زینتی در سراسر جهان در حال رشد و توسعه می‌باشد. ارزش تخمینی این صنعت در سال ۲۰۲۲، ۵/۹۷ بیلیون دلار بوده و پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۳ به ۱۳/۲۶ میلیارد دلار برسد (OEC word, 2024). این صنعت شامل ماهیان ارزشمندی از جمله دلقک ماهیان می‌باشد. که با توجه به رنگ‌های بسیار جذاب آن از محبوبیت قابل توجهی برخوردار است (Olivotto *et al*., 2011; Wabnitz *et al*., 2003). این نوع ماهیان صخره‌ای، به دلیل تکثیر سریع و قابل توجه خود به سرعت با شرایط اسارت سازگار می‌شوند(kodama *et al*., 2011) در نتیجه تولید آن‌ها در سراسر جهان در طول زمان افزایش یافته است. (Olivotto *et al*., 2011; Militz *et al*., 2017). با این حال به دلیل کمبود منابع آبی در بعضی کشورها، پرورش این آبزیان به صورت متراکم انجام می‌شود که این روش پرورشی باعث مشکلات بسیار زیادی مانند شیوع بیماری‌های عفونی توسط باکتری‌ها و در نتیجه ضررهای اقتصادی به این صنعت می‌شود. یکی از روش‌های مرسوم جهت درمان این بیماری‌های عفونی استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد این در حالی است که استفاده نادرست از آنتی بیوتیک‌ها باعث ایجاد مشکلات متعددی از جمله مقاوم شدن پاتوژن‌ها به داروها و از بین رفتن میکروارگانیسم‌های مفید روده آبزیان می‌شود (Mesalhy Aly *et al*., 2008). بنابراین صنعت آبزی پروری در سال‌های اخیر استفاده از آن‌ها را کاهش داده است و رفته رفته توجه محققین به استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان ابزار مفیدی به منظور محافظت از آبزیان در مقابل بیماری‌ها و بهبود کیفیت آب افزایش یافته است (Mohammadi *et al*., 2021; Luo *et al*., 2022; Qiu *et al*., 2023).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در روده موجود زنده، با تولید متابولیت‌های ضد میکروبی، باعث مقابله با میکروارگانیسم‌های بیگانه شده و در نتیجه به سلامت میزبان خود کمک می‌کنند (Klaenhammer, 2000) . پروبیوتیک‌ها از طریق تعامل با سیستم ایمنی مخاطی در ماهیان، یک سد دفاعی بیوژیکی ایجاد کرده که باعث مقاومت آن‌ها در برابر هجوم عوامل بیماریزا می‌شود(Zhu *et al*., 2023 ; Hossain *et al*., 2021). مطالعات نشان داده است که افزودن پروبیوتیک‌ها به آب در آبزی پروری، می‌تواند مواد مضر مانند آمونیاک را در محیط آب کاهش داده، ذرات آلی بزرگ را تجزیه کرده و در نتیجه باعث افزایش کیفیت آب پرورشی گردد (Mohammadi *et* al., 2021). از دیگر مزایای استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری، افزایش ایمنی (Giri *et al*., 2016) کاهش ضریب تبدیل غذایی (Eissa *et al*., 2022) و تعدیل استرس اکسیداسیو (Tao *et al*., 2022) در آبزیان می‌باشد. همچنین استفاده از آن‌ها باعث افزایش رشد آبزی (Zhang *et al*., 2014) تکثیر سلول‌های ایمنی (Rengpipat *et al*., 2000)، بهبود ایمنی غیر اختصاصی و اختصاصی (Gill, 2003) و کلونیزه شدن باکتری‌های مفید در روده آبزی می‌شوند (Khouadsa *et al*., 2017). دلقک ماهی کلارکی (*Amphiprion clarkii* Bennett,1830) یا دلقک ماهی دم زرد، گونه ای بسیار زیبا و منحصر به فرد از جنس آمفیپریون می‌باشد که در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری اقیانوس هند، غرب اقیانوس آرام، شمال تایوان، استرالیا، جنوب ژاپن و خلیج فارس (به ویژه جزایر کیش، فارور و هندورابی) زیست می‌نماید. این گونه توانایی زیستن در اعماق ۱ تا ۶۰ متری آب‌های وابسته به مناطق مرجانی را دارد و با توجه به سازگاری در آکواریوم جزء ماهیان پرطرفدار زینتی می‌باشد. تا کنون در زمینه‌ی جداسازی و شناسایی پروبیوتیک بومی از گونه دلقک ماهی کلارکی به عنوان یک گونه با ارزش آکواریومی در ایران مطالعه ای وجود ندارد بر این اساس پژوهش حاضر به منظور شناسایی جدایه‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی از دستگاه گوارش این ماهی انجام شد. لذا نتایج این تحقیق می‌تواند حائز اهمیت بوده و مورد بهره برداری کارگاه‌های تکثیر و پرورش این آبزی قرار بگیرد.

مواد و روش ها

به منظور جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک، ۱۰ عدد ماهی *A. clarkii* با طول تقریبی ۲/۷±۱۲سانتی متر با استفاده از فلاسک یخ به آزمایشگاه واقع در دانشکده علوم و فنون دریایی منتقل شدند. سپس ماهی‌ها با آب دریای استریل شستشو داده شدند و قبل از خارج کردن دستگاه گوارش آن‌ها، سطح شکمی ماهیان با استفاده از الکل ۷۰٪ استریل گردید. سپس دستگاه گوارش در شرایط

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

کاملا استریل خارج گردید و پس از سه بار شستشو با بافر فسفات خنثی و استریل(PBS، pH=۷/۵) بافت روده کاملا هموژن گردید. در ادامه میزان یک گرم از بافت هموژن شده توزین شد و با استفاده از PBS رقت سریالی متوالی از آن‌ها تهیه گردید. در این پژوهش از دو محیط کشت MRS agar (مرک، آلمان) حاوی ۱/۵ درصد کلریدسدیم برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک و محیط Marine agar (مرک، آلمان) برای جداسازی باکتری‌های هتروتروف استفاده شد. میزان۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} بر روی دو محیط کشت به روش پورپلیت و با سه تکرارکشت داده شد. پلیت‌های Marine agar در انکوباتور و پلیت‌های MRS agar در جار بی‌هوازی به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس گرم خانه گذاری شدند. پس از گذشت زمان گرم خانه گذاری، کلنی‌های رشد یافته بر روی پلیت‌ها با مرفولوژی متفاوت، انتخاب و در محیط کشت‌های مشابه به صورت خطی کشت داده شدند. در صورت مشاهده کلنی‌هایی با مرفولوژی یکسان پس از رشد، به عنوان جدایه خالص در نظر گرفته شدند. به منظور نگهداری طولانی مدت جدایه‌های منتخب، جدایه‌ها در محیط کشت حاوی ۵۰ درصد گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگهداری شدند(Migaw *et al.*, 2014; Sahu *et al.*, 2007).

جدایه‌های خالص سازی شده مطابق با روش Sneath و همکاران (۱۹۸۶) از نظر برخی از ویژگی‌های مرفولوژیکی از جمله خصوصیات کلنی و سلول باکتری، رنگ آمیزی گرم و تولید اسپور مورد ارزیابی قرار گرفت.

پتانسیل ضد میکروبی باکتری‌های جداسازی شده از روده دلقک ماهی کلارکی در برابر باکتری های بیماریزای رایج ماهیان از جمله *Aeromonas hydropHila* PTCC 1890 ،*Vibrio harveyi* PTCC 1755, *Vibrio cholerae* PTCC 1611, *Pseadomonas aeruginosa* PTCC 1849 ,*Salmonella thyphirium*,PTCC ,*Shigella sonnei* PTCC 1947, 1609, *Yersinia ruckers* PTCC1888, مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدایه‌های باکتریایی جداسازی شده از روده ماهیان از نظر فعالیت ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های ماهیان که در بالا اشاره شد بر اساس روش Nandi و همکاران (۲۰۱۷) مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا باکتری های بیماریزای شاخص در محیط کشت مولر هینتون براث کشت داده شدند و پس از رسیدن به مرحله لگاریتمی رشد خود و تنظیم غلظت آن‌ها معادل نیم مک فارلند ($1/5\times10^{8}$CFU/ml)، به صورت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، چاهک‌هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط کشت‌ها ایجاد شد و ۲۵ میکرولیتر از فاز لگاریتمی جدایه‌های خالص سازی شده از روده ماهیان پس از سانتریفیوژ در ۴ درجه سیلسیوس، درون چاهک‌ها ریخته شد. سپس تمامی محیط کشت‌ها در ۳۷ درجه سیلسیوس انکوبه شد و پس از ۲۴ ساعت مهار رشد باکتری های بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت.

جدایه‌هایی که بر علیه تمام باکتری های بیماریزا فعالیت ضد میکروبی نشان دادند با ارزیابی فاکتورهایی مانند فعالیت همولیتیک، تولید آنزیم‌های ژلاتیناز و لیپاز و همچنین پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی از نظر ایمنی زیستی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی فعالیت همولیتیک جدایه‌ها با کشت دادن بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۵٪ (v/v) خون دیفیبرینه شده گوسفند انجام شد. سپس پلیت‌ها پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده هاله شفاف اطراف خط کشت باکتری، همولیزβ (بتا)، در صورت ایجاد هاله سبز رنگ در اطراف کلنی همولیزα (آلفا) و اگر هیچ گونه هاله‌ای در اطراف خط کشت باکتری، مشاهده نگردد، به عنوان همولیز γ (گاما) در نظر گرفته شد. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک انجام شد (CLSI 2017) . بدین منظور پس از کشت جدایه‌ها ۲۵ میکرولیتر از هر کشت ($2/8\times10^{7}$ CFU/ml) به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل گردید و به صورت چمنی کشت داده شدند و دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک‌ها بر روی سطح پلیت قرار داده شد. الگوی حساسیت یا مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها بر اساس ناحیه مهار رشد ارزیابی شد. این تست با استفاده از آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۱۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰میکروگرم)و وانکومایسین (۵ میکروگرم) انجام شد. تشخیص فعالیت ژلاتیناز و لیپاز جدایه‌ها با کشت دادن ۳ میکرولیتر از جدایه‌ها ($1/8\times10^{7}$ CFU/ml) در محیط کشت مارین آگار حاوی ۳ درصد ژلاتین (برای فعالیت ژلاتیناز) یا ۱ درصد توئین ۸۰ (برای تولید لیپاز) بررسی شد. پس از کشت جدایه‌ها در محیط کشت‌های مزبور، پلیت‌ها در ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۲ روز،

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

۲۵ درجه سیلسیوس به مدت ۳ روز و ۴ درجه سیلسیوس به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند و در صورت مشاهده هاله شفاف اطراف خطوط کشت، فعالیت ژلاتیناز و لیپاز برای جدایه‌ها ثبت گردید (Leon *et al.*, 2000; Perin *et al.*, 2014) .

تحمل pH جدایه‌ها در شرایط اسیدی مطابق با روش (Jang *et al.*, 2018) با تغییرات جزئی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، ۱درصد از کشت های باکتریایی در فاز لگاریتمی مطابق با OD_{595}=۰/۵ به محیط کشت‌های جدیدی که در pHهای ۱، ۲ و ۳ تنظیم شده بود، منتقل گردید و به مدت ۱۸۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۰ درجه سیلسیوس گرم‌خانه گذاری شد.و در نهایت OD آن‌ها در ۵۹۵ نانومتر سنجیده شد. به منظور بررسی توانایی بقاء جدایه‌ها در روده کوچک، تحمل نمک صفراوی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی سنجیده شد. میزان ۱٪ از جدایه‌ها در فاز لگاریتمی(OD_{595}=۰/۵)، به محیط کشت حاوی ۱ و ۳ درصد سدیم کلات اضافه و در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس انکوبه شد. بقاء جدایه‌ها با بررسی OD در ۵۹۵ نانومتر پس از ۱۸۰ دقیقه اندازه گیری شد. محیط کشت‌های بدون کلات سدیم به عنوان شاهد استفاده شد. تحمل شرایط شیره معده شبیه سازی شده جهت تعیین توانایی زنده ماندن جدایه‌ها در شرایط اسیدی و شیره معده ماهی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱درصد از جدایه‌ها در فاز لگاریتمی با تراکم OD_{595}=۰/۵ به محیط کشت‌های حاوی ۳ درصد پپتین و ۰/۵ درصد کلرید سدیم با pH = ۲ تلقیح گردید و جذب جدایه پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه در OD_{595} گزارش شد. محیط کشت بدون هیچ یک از مکمل‌ها در pH=۷ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت میزان بقاء جدایه‌ها با استفاده از رابطه ۱سنجیده شد.

رابطه ۱

$$\text{درصد نرخ بقا} = \frac{A0}{A1} \times 100$$

که A1 میزان جذب کنترل و A0 میزان جذب نمونه‌ها در شرایط متفاوت می‌باشد.

ارزیابی چسبندگی جدایه‌ها به حلال‌های مختلف با استفاده از روش Rosenberg و همکاران (1980) با کمی تغییرات انجام شد. به صورت خلاصه فاز لگاریتمی کشت جدایه‌ها حاوی ۱/۵×۱۰۷ CFU/ml در۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از دو بار شستشو با بافر PBS، مجددا بافر PBS به سلول‌های باکتری ته نشین شده افزوده شد. سپس ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها به سه لوله جداگانه منتقل شد و ۱ میلی لیتر زایلن (غیر قطبی، خنثی) ، کلروفرم (تک قطبی، اسیدی) و اتیل استات (تک قطبی، اسیدی) به هر کدام از سه لوله اضافه شد. مخلوط‌های تهیه شده به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد و در نهایت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس انکوبه شد تا اینکه دو لایه کاملا مجزا ایجاد گردید. سپس لایه حاوی مایع شفاف با دقت به لوله‌های جدید منتقل شد و جذب آن‌ها در ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. درصد چسبندگی جدایه‌ها با استفاده از رابطه ۲محاسبه شد(Valeriano *et al.*, 2014 ; Darilmaz *et al.*, 2012).

رابطه ۲

$$\text{درصد آبگریزی} = \left(\frac{A0 - A1}{A0}\right) \times 100$$

که در این فرمول A0 جذب سوسپانسیون قبل از انکوباسیون و A1 جذب سوسپانسیون بعد از سپری کردن دوره انکوباسیون می‌باشد.

آزمون تجمعی جدایه‌ها با استفاده از روش توصیف شده توسط Darlimaz و همکاران (۲۰۱۲) ارزیابی شد. کشت‌های باکتریایی ۱۸ ساعته با استفاده از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه ته نشین شدند و پس از دو بار شستشو با بافر PBS، مجددا در همان بافر حل شدند تا جذب برابر ۰/۵ در ۵۹۵ نانومتر حاصل گردد. سوسپانسیون به دست آمده مجدد سانتریفیوژ گردید و با حجم مساوی بافر PBS مخلوط گردید. بعد از ۱ الی ۲ ساعت انکوبه شدن، اگریگیشن با اندازه گیری جذب لایه بالایی در ۵۹۵ نانومتر ثبت شد و درصد اگریگیشن از طریق رابطه ۳محاسبه شد:

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

رابطه ۳

$$\text{درصد تجمعی} = \left(1 - \frac{A1}{A0}\right) \times 100$$

که در این فرمول A1 میزان جذب لایه آبی بالایی وA0 جذب کنترل نمونه بدون باکتری می‌باشد.
به طور مشابه میزان کمک تجمعی جدایه‌ها با استفاده از روش Zarate و همکاران (۲۰۰۲) با ایجاد اندکی تغییرات، مورد بررسی قرار گرفت. به صورت خلاصه سوسپانسیون کشت جدایه‌ها مطابق روشی که در مطالعه آزمون تجمعی ذکر شد، تهیه گردید. سپس حجم مساوی از سوسپانسیون جدایه‌ها و باکتری‌های پاتوژن*S. thyphirium* PTCC 1609 , *P. aeruginosa* PTCC 1849 ، *A. hydrophila* PTCC 1890, با هم مخلوط شده و پس از ورتکس، به صورت جداگانه و مخلوط در ۳۷ درجه سیلسیوس انکوبه شدند. سپس جذب آن‌ها در $OD_{۵۹۵}$ پس از ۱و۲ ساعت ثبت گردید و درصد کمک تجمعی با استفاده از رابطه ۴ثبت گردید:
رابطه ۴

$$\text{درصد کمک تجمعی} = \left[(A1 + A2) - \frac{2(Amix)}{A1 + A2} \times 100\right]$$

که A1 میزان جذب پس از ۱ ساعت انکوباسیون ،A۲ میزان جذب پس از ۲ ساعت، Amix جذب کشت ها به همراه پروبیوتیک و پاتوژن می‌باشد.
توانایی جدایه‌های باکتریایی جهت بررسی هیدرولیز پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و سلولز مطابق با روش Thankappan و همکاران (۲۰۱۵) با تغییرات جزئی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان ۲ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته جدایه‌ها بر روی محیط کشت‌های حاوی ۲ درصد اسکیم میلک جهت بررسی فعالیت پروتئولیتیک ، ۲ درصد نشاسته جهت بررسی فعالیت آمیلولیتیک و ۱ درصد کربوکسی متیل سلولز جهت بررسی فعالیت سلولولیتیک، ریخته شد. پس از گرمخانه گذاری در ۳۰ درجه سیلسیوس به مدت ۴۸ ساعت، تمام پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده هاله شفاف در اطراف جدایه‌ها، فعالیت پروتئولیتیک جدایه‌ها ثبت گردید. فعالیت آمیلولیتیک جدایه‌ها پس از ریختن محلول پتاسیم یدید ۱ درصد بر روی جدایه‌ها و مشاهده هاله اطراف آن‌ها، فعالیت آمیلولیتیک جدایه مورد تایید قرار گرفت.
به منظور شناسایی مولکولی باکتری‌های انتخاب شده، استخراج DNA به روش Boiling صورت گرفت (Chen *et al*.,2009). بدین منظور باکتری‌های منتخب در محیط کشت مرین براث کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، باکتری‌های رشد یافته به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سیلسیوس قرار داده شد. سپس ظروف حاوی باکتری‌ها بلافاصله در ظروف حاوی یخ قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، مایع رویی حاوی DNA باکتری‌ها با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (۵ دقیقه rpm۱۳۰۰۰) جداسازی گشته و به ظروف جدید منتقل شدند.کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفتومتری (Nanodrop,Thermoscientifc) تایید گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای-9F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (`3 و ( 1541 R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3` تکثیر DNA ژنوم باکتری توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) انجام شد (Boulares *et al.*, 2013). جهت انجام واکنش PCR، حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس،۱ میکرولیتر DNA باکتری‌های مورد مطالعه، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل استفاده گردید. واکنش PCR برای باکتری‌های منتخب جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۳۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۵ درجه سیلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و extension در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر مدل BIORADT 100TM بود. در نهایت محصولات PCR به منظور صحت انجام واکنش با استفاده از روش الکتروفورز بررسی شدند و پس از اطمینان از انجام واکنش PCR، محصولات حاصل به شرکت ژن فناوران جهت تعیین توالی به روش سنگر ارسال

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

گردید. سپس کروماتوگرام توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Chromas، مورد بررسی قرار گرفته و به وسیله Basic Local Alignment search Tool (BLAST) توالی‌های بدست آمده با Type strain های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مقایسه شدند. در نهایت توالی‌ها با استفاده از نرم افزار MEGAX با استفاده از روش Clustalw هم تراز گردید و آنالیزهای فیلوژنتیکی باکتری‌ها با روش Neighbor-joining و Bootstrap برابر با ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت (Dastgheib *et al.* ,2012; Kimura, 1980; Kumar *et al.*, 2018).

نتایج

در این مطالعه ۲۹ جدایه باکتری از دستگاه گوارش دلقک ماهیان جداسازی و خالص سازی گردید که ۱۳ جدایه به وسیله محیط کشت MRS agar و ۱۶ جدایه به وسیله محیط کشت Marine agar جداسازی شد. خصوصیات بیوشیمیایی و مرفولوژیکی و دامنه بازدارندگی عوامل بیماریزا توسط جدایه‌ها در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است. از میان ۲۹ جدایه، ۶ جدایه (CS23,CS22,CS19,CS17,CS15,CS9) دارای هیچ گونه فعالیت مهاری را بر علیه هیچ یک از پاتوژن‌های مورد استفاده در این مطالعه نشان ندادند در صورتی که ۷ جدایه (CS29, CS28, CS25,CS18, CS10,CS8,CS7) فعالیت ضد میکروبی در برابر همه پاتوژن‌های آزمایش شده نشان دادند. همچنین ۱۶ جدایه باقی مانده دارای فعالیت آنتی باکتریایی بر علیه حداقل یک پاتوژن از ۷ پاتوژن مورد مطالعه بودند (جداول ۱ و ۲).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۱. ویژگی های مرفولوژیکی جدایه های جداسازی شده با محیط کشت MRS Agar و دامنه فعالیت ضد میکروبی آن‌ها به روش چاهک گذاری

کد جدایه	ویژگی های مرفولوژیکی	دامنه فعالیت ضد میکروبی
CS1	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila*
CS2	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ، فاقد اسپور	*V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, S. thyphirium*
CS3	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و زرد رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, P. aeruginosa, Sh. sonnei*
CS4	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و زرد رنگ، فاقد اسپور	*A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei*
CS5	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد و کرم رنگ، فاقد اسپور	*S. thyphirium*
CS6	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ، فاقد اسپور	*P. aeruginosa, S. thyphirium*
CS7	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و کرم رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS8	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و کرم رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS9	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد و کرم رنگ، فاقد اسپور	فاقد فعالیت ضد میکروبی
CS10	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد و زرد رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS11	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ، فاقد اسپور	*P. aeruginosa*
CS12	کوکو باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد و کرم رنگ، فاقد اسپور	*Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS13	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد و سفید رنگ، فاقد اسپور	*A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei*

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۲. ویژگی های مرفولوژیکی جدایه های جداسازی شده با محیط کشت Marine Agar و دامنه فعالیت ضد میکروبی آنها به روش چاهک گذاری

کد جدایه	ویژگی های مرفولوژیکی	دامنه فعالیت ضد میکروبی
CS14	میله ای گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، بیضی، حاشیه رشته ای، زرد کم رنگ، فاقد اسپور	*V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa,*
CS15	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد، حاشیه موج دار، زرد کم رنگ، دارای اسپور	فاقد فعالیت ضد میکروبی
CS16	کوکسی گرم منفی دارای کلنی های بزرگ، گرد، حاشیه صاف، نارنجی رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi*
CS17	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد، حاشیه صاف، قهوه ای رنگ، فاقد اسپور	فاقد فعالیت ضد میکروبی
CS18	باسیل خمیده گرم منفی دارای کلنی های بزرگ، گرد، حاشیه صاف، سفید رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS19	باسیل خمیده گرم منفی دارای کلنی های متوسط، گرد، حاشیه صاف، سفید رنگ، فاقد اسپور	فاقد فعالیت ضد میکروبی
CS20	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد، حاشیه صاف، سفید	*A. hydrophila*
CS21	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد، حاشیه صاف، صورتی رنگ فاقد اسپو	*, A. hydrophila, P. aeruginosa, S. thyphirium*
CS22	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، گرد، حاشیه موج دار، شیری، دارای اسپور	فاقد فعالیت ضد میکروبی
CS23	باسیل خمیده گرم منفی دارای کلنی های متوسط، گرد، حاشیه صاف، سفید رنگ، فاقد اسپور	فاقد فعالیت ضد میکروبی
CS24	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد، حاشیه موج دار، نارنجی رنگ فاقد اسپور	*V. harveyi, A. hydrophila, P. aeruginosa, S. thyphirium*
CS25	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های کوچک، گرد، حاشیه صاف، سبز لجنی، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS26	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های بزرگ، نامنظم، حاشیه موج دار، زرد کم رنگ، دارای اسپور	*V. cholera, S. thyphirium*
CS27	کوکسی گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، گرد، حاشیه موج دار، زرد کم رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, , A. hydrophila, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS28	باسیل گرم مثبت دارای کلنی های متوسط، بیضی، حاشیه صاف، زرد کم رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*
CS29	باسیل خمیده گرم منفی دارای کلنی های کوچک دارای حاشیه صاف، سفید رنگ، فاقد اسپور	*V. cholera, V. harveyi, A. hydrophila, Y. ruckeri, P. aeruginosa, Sh. sonnei, S. thyphirium*

جدایه‌هایی که دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه همه پاتوژن‌ها بودند تحت آزمایش‌های ایمنی زیستی قرار گرفتند. پس از بررسی فعالیت همولیتیک این ۷ جدایه ، تنها جدایه‌های CS29,CS25,CS18 گاما همولیتیک بودند و هیچ گونه هاله‌ای در اطراف خط کشت آن‌ها مشاهده نشد. به همین ترتیب در بین ۷ جدایه مذکور، دو جدایه CS29 و CS18 از نظر فعالیت ژلاتیناز و لیپاز در تمام شرایط آزمایش منفی بودند (جدول۳). از طرفی این دو جدایه تنها به آمپی سیلین و وانکومایسین مقاوم بودند و در مقابل آنتی بیوتیک‌های تست شده (ایترپتومایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین و پنی‌سیلین) حساس بودند و بقیه جدایه‌های مورد ارزیابی،

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

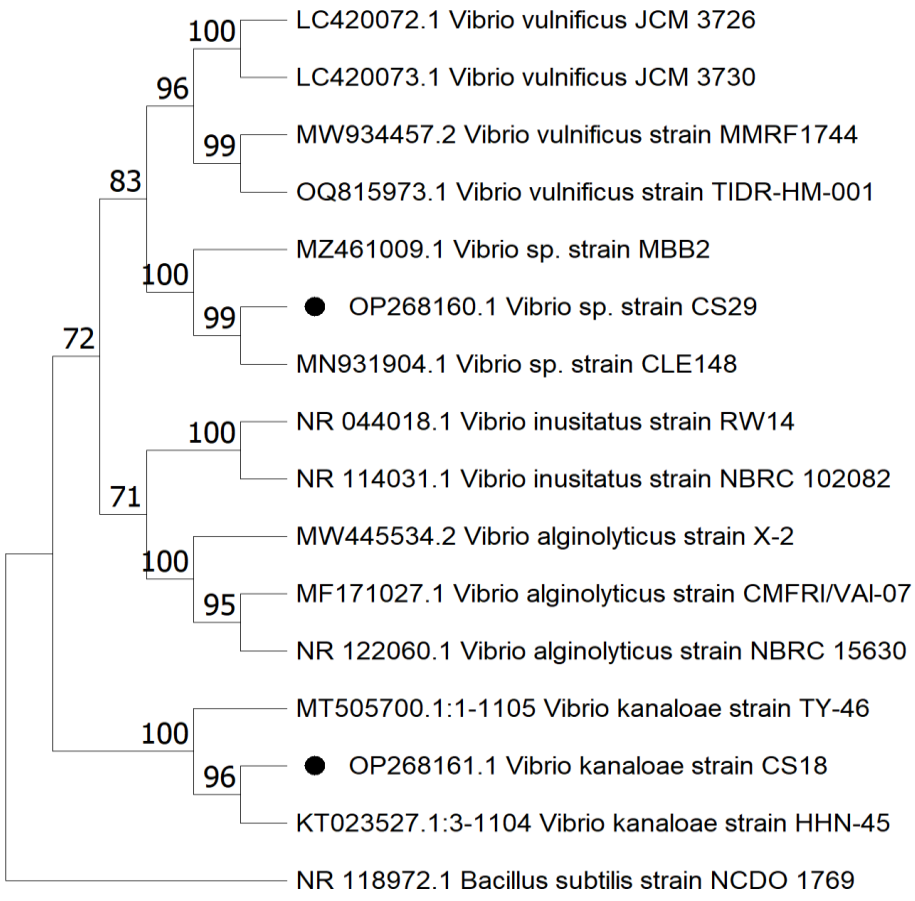
نسبت به بیش از ۲ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۳، دو جدایه CS29 و CS18 با موفقیت جنبه‌های ایمنی زیستی آن‌ها اثبات شد و خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام pHهای مورد بررسی(۳-۱)، میزان بقاء جدایه‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه کاهش یافت با این حال هر دو جدایه زنده ماندند و جدایه CS18 درصد بقاء بالاتری را در مقایسه با جدایه CS29 در pH=۱ از خود نشان داد (جدول ۴). با توجه به نتایج حاصل از تحمل نمک صفراوی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، تحمل جدایه CS29 در ۰/۳ و ۱ درصد کلات سدیم پس از ۱۸۰ دقیقه بیشتر از جدایه CS18 بود. علاوه بر این، تحمل شرایط شیره معده جدایه CS29 نیز بالاتر از جدایه CS18 بود. ارزیابی چسبندگی سلول‌های باکتریایی به حلال‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که بیشترین درصد آبگریزی هر دو جدایه CS29 و CS18 در زمان استفاده از حلال زایلن می‌باشد. هر دو جدایه پتانسیل تجمعی قابل توجهی را نشان دادند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون جدایه CS18 پتانسیل بالاتری را برای تجمعی نسبت به جدایه CS29 نشان داد. به منظور بررسی خواص کمک تجمعی از سه پاتوژن ماهیان استفاده گردید. هر دو جدایه دارای توانایی کمک تجمعی در مقابل هر سه پاتوژن بودند. بیشترین قابلیت کمک تجمعی در هر دو جدایه در برابر P. aeruginosa ثبت گردید. همچنین دو جدایه انتخاب شده تولید کننده آنزیم‌های مختلف خارج سلولی از جمله پروتئاز، آمیلاز و سلولاز بودند (جدول ۴). جدایه هایCS29 و CS18 با استفاده از ژن 16S rRNA با توالی ۱۵۰۰ جفت باز در حد جنس و گونه شناسایی شدند. جدایه CS18 بیشترین تشابه (۹۸/۱۹درصد) را به*V. Kanaloae* strain HHN-45(KT023527.1) و جدایه CS29 بیشترین تشابه (۹۷/۱۶ درصد) را به *Vibrio* sp strainVN (MH671113.1) نشان داد و در نهایت توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های CS18 و CS29 به ترتیب با شماره‌های دسترسی OP268161.1 و OP268160.1 در NCBI ثبت گردید. شکل ۱ درخت فیلوژنتیک روابط تکاملی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA دو جدایه مذکور را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۳. ارزیابی ایمنی زیستی باکتری های جداسازی شده

کد جدایه		فعالیت‌ها						
		همولیزین	ژلاتیناز	لیپاز				مقاومت آنتی بیوتیکی
			۱۰/ روز ۴°C	۳/ روز ۲۵°C	۲/ روز ۳۷°C	۱۰/ روز ۴°C	۳/ روز ۲۵°C	۲/ روز ۳۷°C	
CS7	α		-	-	-	-	-	-	پنی سیلین، وانکومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین
CS8	α		-	-	-	-	-	-	آمپی سیلین، پنی سیلین، وانکومایسین، تتراسایکلین، استرپتومایسین
CS10	α		+	+	+	+	+	+	آمپی سیلین، وانکومایسین، تتراسایکلین
CS18	γ		-	-	-	-	-	-	آمپی سیلین، وانکومایسین
CS25	γ		+	+	+	+	+	+	آمپی سیلین، پنی سیلین، وانکومایسین، تتراسایکلین
CS28	α		+	+	+	+	+	+	آمپی سیلین، پنی سیلین، وانکومایسین
CS29	γ		-	-	-	-	-	-	آمپی سیلین، وانکومایسین

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]



شکل ۱. درخت فیلوژنتیک توالی نوکلئوتیدی ژن16S rRNA جدایه‌های CS18 و CS29

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۴. ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری های منتخب

فعالیت ها		CS18	CS 29
درصد بقا در شرایط اسیدی	pH = ۱	۵۰ ± ۲/۴	۴۸ ± ۲/۶
	pH = ۲	۶۲ ± ۱/۷	۵۷ ± ۳/۱
	pH = ۳	۶۵ ± ۲/۹	۱/۹ ± ۶۸
درصد مقاومت به نمک صفراوی	۰/۳ درصد	۵۱ ± ۱/۶	۶۵ ± ۳/۳
	۱درصد	۴۳ ± ۲/۲	۵۰ ± ۲/۷
درصد مقاومت به شیره معده شبیه سازی شده	pH = ۲	۵۳ ± ۲/۵	۵۵ ± ۱/۱
درصد آبگریزی	زایلن	۵۸ ± ۱/۸	۶۶ ± ۳/۷
	کلروفرم	۴۰ ± ۲/۸	۲۵± ۲/۴
	اتیل استات	۴۸ ± ۲/۶	۵۷ ± ۱/۵
درصد تجمعی		۶۷ ± ۳/۶	۶۳ ± ۱/۷
درصد کمک تجمعی	*A. hydrophila*	1. ± ۱/۶	۲۲ ± ۲/۲
	P. aeroginosa	۱۸ ± ۲	۲۹ ± ۳/۱
	S. typhirium	۱۲ ± ۱/۵	۲۷ ± ۲/۷
آنزیم خارج سلولی	پروتئاز	+	+
	آمیلاز	+	+
	سلولاز	+	+

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

بحث

دستگاه گوارش ماهی به عنوان یک اکوسیستم میکروبی پیچیده و بسیار پویا شناخته می‌شود که میکروارگانیسم‌های درون آن تعیین کننده وضعیت سلامت میزبان و به عنوان مهار کنندگان پاتوژن‌های بیماریزا می‌باشند (Nayak, 2010). به منظور استفاده از جنبه‌های مفید این میکروارگانیسم‌های ناشناخته دستگاه گوارش، بررسی و شناسایی کامل آن‌ها ضروری می‌باشد. اکثر پروبیوتیک‌های موجود در بازار که در حال حاضر در آبزی پروری استفاده می‌شوند، از حیوانات خشکی زی جداسازی گردیده‌اند که امکان پایداری و کلونیزه شدن آن‌ها در دستگاه گوارش ماهی به صورت کامل وجود ندارند (Hoseinifar *et al.*, 2018; El-Saadony *et al.*, 2021). بنابراین به منظور سازگاری بهتر این میکروارگانیسم‌ها با دستگاه گوارش ماهی، بایستی پروبیوتیک‌های بومی جداسازی و شناسایی شوند. زیرا پروبیوتیک‌های بومی از نظر توانایی چسبیدن و کلونیزه شدن در دیواره روده میزبان از هر منشاء دیگری مفیدتر و کارآمدتر هستند (Hoseinifar *et al.*, 2018; Akter *et al.*, 2016).

در این مطالعه باکتری‌های جداسازی شده از روده دلقک ماهیان، با استفاده از فعالیت آنتاگونیستی در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها غربالگری شد. که در میان آن‌ها ۷ جدایه شامل CS29, CS28, CS25,CS18, CS10,CS8,CS7 در برابر تمام پاتوژن‌های مورد استفاده در این پژوهش، فعالیت ضد باکتریایی نشان دادند و از رشد این پاتوژن‌ها جلوگیری به عمل آوردند که از میان آن‌ها، دو جدایه CS29 و CS18 به دلیل نداشتن فعالیت همولیتیکی و عدم تولید آنزیم‌های لیپاز و ژلاتیناز ایمنی زیستی آن‌ها تایید گردید و در ادامه ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها ارزیابی گردید. پس از شناسایی مولکولی، دو جدایه مذکور متعلق به جنس *Vibrio* بودند. برخی از گونه های ویبریو به عنوان عوامل بیماریزای آبزیان می باشند اما برخی از آنها می‌توانند به عنوان پروبیوتیک نقش ایفا کنند (Medina *et al.*, 2023; Ramirez *et al.*, 2022). .بعلاوه نتایج سنجش ایمنی زیستی دو جدایه CS29 و CS18 تایید کرد که جدایه‌های مذکور به واسطه عدم تولید همولیزین α و β و عدم تولید آنزیم‌های ژلاتیناز و لیپاز، غیربیماریزا بوده و می‌تواند به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرد. آزمایش همولیتیک در شناسایی یک باکتری با پتانسیل پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی بسیار مهم می باشد زیرا همولیزین تولید شده توسط جدایه باکتریایی باعث لیز شدن سلول میزبان گشته و باعث آزاد شدن ترکیبات حاوی آهن مانند هموگلوبین می گردد (Argyri *et al.*, 2013; Seker, 2010). آنزیم ژلاتیناز یک متالوپروتئیناز وابسته به روی می باشد که توسط باکتری های بیماریزا تولید می شود. تولید این آنزیم توسط باکتری باعث هیدرولیز ژلاتین در بافت همبند و در نتیجه آسیب به بافتهای میزبان می شود(Zhang *et al.*, 2015). پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های منتخب نشان داد که آن‌ها تنها نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و وانکومایسین مقاوم بوده در حالی که به دیگر آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه حساس بودند. حساسیت پروبیوتیک‌ها به آنتی بیوتیک‌های تجاری، یکی از ملزومات پروبیوتیک می‌باشد (Duche *et al.*, 2023) زیرا پروبیوتیک‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها می‌توانند ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی خود را به دیگر میکروفلورهای روده انتقال دهند و برای انسان‌ها به عنوان مصرف کنندگان ثانویه از طریق زنجیره غذایی مضر باشند (Zheng *et al.*, 2017) .

به منظور اعمال اثر مفید یک جدایه به عنوان پروبیوتیک در میزبان، جدایه مورد نظر بایستی توانایی زنده ماندن در طول زمان انتقال بین معده و قسمت فوقانی روده را داشته باشد تا بتواند در روده میزبان کلونیزه شود (Abatenh, 2018). بنابراین در زمان ارزیابی یک پروبیوتیک در شرایط برون تنی، ارزیابی مقاومت آن به pHهای پایین بسیار حائز اهمیت بوده و یک معیار خیلی مهم جهت ارزیابی مقاومت آن در شیره معده و نمک‌های صفراوی در روده کوچک میزبان می‌باشد. در راستای این موارد، دو جدایه ارزیابی شده سطوح زنده مانی قابل توجهی را در pHهای بسیار پایین نشان دادند به طوری که در pH=۱ میزان بقای ۲/۴ ± ۵۰ و ۲/۶ ± ۴۸ به ترتیب در جدایه‌های CS29 و CS18 ثبت گردید. باکتری ها مکانیسم های متفاوتی از جمله بازسازی دیواره سلولی، فعال سازی پمپ پروتونی H+-ATPase، مصرف پروتون درون سلولی (دکربوکسیلاسیون گلوتامات) و یا ایجاد محیط قلیایی (فعالیت های اوره آز یا آرژنین دیمیتاز) را برای مقاومت در برابر محیط اسیدی به کار ببرند (Cotter and Hill, 2003, Mira et al., 2010; Wang *et al.*, 2018). در همین راستا پروبیوتیک *V. rhodolitvs* که از روده ماهی هامور هیبریدی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

(*EpinepHelus lanceolatus*♂× *EpinepHelus fusciguttatus*♀) جداسازی شده بود، قادر به بقاء ۴۹/۸ درصد در pH=۲/۵ بود. دستگاه گوارش ماهیان حاوی مواد ضد میکروبی، اسیدها، نمک‌های صفراوی و آنزیم‌های مختلفی می‌باشد که محیطی بسیار دشوار را برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌کند (Gomez and Balcazar, 2008). نمک‌های صفراوی فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را از طریق اختلال در غشاء سلولی باکتری‌ها ایجاد کرده و باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شوند (Begley *et al.*, 2005) Balcazar و همکاران (۲۰۰۸) تخمین زده‌اند که غلظت صفرا در دستگاه گوارش ماهی بین ۰/۴ تا ۱/۳ درصد می‌باشد. به همین دلیل آزمایش‌های برون تنی سنجش مقاومت نمک صفراوی در پروبیوتیک‌ها معمولا تا غلظت‌های۰/۳ درصد انجام می‌شود (Chen *et al.*, 2016). یافته‌های این مطالعه نشان داد که دو جدایهCS29 و CS18 پس از مواجه با ۰/۳ درصد نمک صفراوی به ترتیب به میزان ۱/۶ ± ۵۱ و ۳/۳ ± ۶۵ درصد قادر به بقاء بودند که نشان‌دهنده تحمل آن‌ها در مقابل نمک‌های صفراوی دستگاه گوارش ماهی می‌باشد. باکتری های پروبیوتیک از طریق سنتز پروتئین یا اسید چرب خاص، تولید بیوپلیمرهای محافظ، تولید یک آنزیم خاص و یا تغییر ترکیب غشاء سلولی، در مقابل نمک های صفراوی دستگاه گوارش مقابله کنند (Horáčková *et al.*, 2018).

جدایه‌های مطالعه حاضر درصد تجمعی بالایی را نشان دادند که این یافته‌ها بیانگر توانایی اتصال بالای آن‌ها به دیواره سلول اپیتلیال روده می‌باشد. یکی دیگر از معیارهای مهم جهت انتخاب یک سویه به عنوان پروبیوتیک، بررسی قابلیت چسبندگی آن سویه به سلول‌های دستگاه گوارش میزبان می‌باشد تا علاوه بر جلوگیری از تجمع و چسبندگی باکتری‌های بیماریزا به دستگاه گوارش، با تولید مواد ضد میکروبی بتواند محیط را برای رشد آن‌ها نامناسب سازد و مانع از اتصال و تهاجم این پاتوژن‌ها به دستگاه گوارش شود(Gabriela *et al.*, 2019). علاوه بر این قابلیت چسبندگی پروبیوتیک‌ها به ترمیم موکوس صدمه دیده و طولانی کردن استقرار آن‌ها در دستگاه گوارش میزبان کمک می‌کند (Twetman and stecksen-Blicks, 2008 ; Campana *et al.*, 2017). در این راستا آزمایش‌های تجمعی، کمک تجمعی و آبگریزی سطح سلول باکتری‌ها می‌تواند به عنوان راه‌های ابتدایی شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک با خصوصیات چسبندگی و با ویژگی‌های مناسب برای اهداف تجاری استفاده شوند. اتصال باکتری‌ها به دیواره سلولی یک فرآیند بسیار پیچیده‌ای می‌باشد که نیاز به ایجاد پیوندهای اختصاصی، غیراختصاصی و وجود رسپتورهای خاصی دارد. مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین‌های لایه S در سطح دیواره سلولی نقش بسیار مهمی در ویژگی تجمعی سویه‌ها دارد (Li *et al.*, 2015). از طرف دیگر هر دو جدایه دارای توانایی کمک تجمعی در مقابل هر سه پاتوژن بودند. بیشترین قابلیت کمک تجمعی در برابر پاتوژن *P. aeruginosa* در هر دو جدایه ثبت گردید. مطابق یافته‌های Boset و همکاران (۲۰۰۸) ویژگی کمک تجمعی پروبیوتیک‌ها سبب جلوگیری از رشد و اتصال پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش میزبان می‌شود. همچنین در اثر ویژگی کمک تجمعی پروبیوتیک‌ها، غلظت ترکیبات ضد میکروبی در اطراف پاتوژن‌ها افزایش یافته در نهایت سبب از بین رفتن آن‌ها می‌گردد (Kaewnopparat *et al.*, 2013).

آبگریزی سطح سلول پروبیوتیک‌ها عامل کلیدی دیگری است که به خواص چسبندگی پروبیوتیک به بافت میزبان کمک می‌کند(Guo *et al.*, 2010). اندازه گیری خاصیت آبگریزی در شرایط برون تنی به طور گسترده با استفاده از هیدروکربن‌های مختلف مورد مطالعه قرار می‌گیرد و یکی از رایج ترین روش پذیرفته شده برای شناسایی ویژگی‌های چسبندگی غیر اختصاصی سلول است(Rijnaarts *et al.*,1993). نتایج حاصل از ارزیابی جدایه‌های CS29 و CS18 نشان داد که هر دو جدایه بیشترین درصد آبگریزی را در مقابل زایلن از خود نشان دادند که نشان دهنده ماهیت آبگریز بودن آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، آبگریزی سلول‌های باکتریایی تحت تاثیر شرایط محیطی می‌باشد که در آن قرار گرفته‌اند و به همین دلیل است که سویه‌های متفاوت باکتریایی رفتارهای متفاوتی را از نظر آبگریزی از خود نشان می‌دهند (Merghni *et al.*, 2014; Vesterlund *et al.*, 2005). در نهایت جدایه‌های CS29 و CS18 تولید کننده آنزیم‌های خارج سلولی از جمله پروتئاز، آمیلاز و سلولاز بودند. توانایی پروبیوتیک‌ها برای تولید آنزیم‌های خارج سلولی یکی دیگر از ویژگی‌های مهم جهت انتخاب پروبیوتیک بالقوه می‌باشد زیرا آنزیم‌های ذکر شده نقش قابل توجهی در استفاده از مواد غذایی توسط میزبان، کاهش ضریب تبدیل غذایی (Mulyasari *et al.*, 2016) و کاهش آلودگی محیط زیست (Lalloo *et al.*, 2007) را دارند.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

نتیجه گیری

جدایه‌های *Vibrio kanaloae* CS18 و*Vibrio* sp. CS29 جداسازی شده از دستگاه گوارش دلقک ماهی کلارکی خصوصیات بالقوه پروبیوتیکی قابل توجهی را ارائه داده و طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی را در برابر هفت باکتری بیماریزای آبزیان در شرایط برون تنی نشان داده است. با این حال آزمایش‌های درون تنی برای تایید این سویه‌ها به عنوان پروبیوتیک بومی مناسب در صنعت تکثیر و پرورش این ماهی زینتی، مورد نیاز است.

References

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegay, Z., Tefera, G., Aynalem, E. 2018. Health benefits of probiotics. Journal of Bacteriology and Infectious Diseases. 2(1), 8-27.

Akter, M. N., Parvez, I., Patwary, Z. P. 2016. Beneficial effects of probiotics in aquaculture. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 4(5), 494 -9.

Aly, S. M.; Abd-Rahman, A.M., John, G., Mohamed, M.F. 2008 . Characterization of some bacteria isolated from Oreochromis niloticus and their potential use as probiotics. Aquaculture. 277, 1-8. http://doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.021

Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K-AG., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., et al. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiology. 33, 282- 91. https:// doi: 10.1016/j.fm.2012.10.005

Begley, M., Gahan, C. G. M.; Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. 2016. FEMS Microbiology Reviews. 29, 625-651. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003

Campana, R., van Hemert, S., Baffone, W. 2017. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. Gut pathogens, 9, 1-12. https://doi: 10.1186/s13099-017-0162-4

Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., Zhang, H., Wen, P., Yu, J. 2009. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. International Journal of Infectious Diseases. 13(6), 717-721. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.11.014

Chen, Y., Li, J., Xiao, P., Li, G.Y., Yue, S., Huang, J., Zhu, W.Y., Mo, Z. L. Isolation and characterization of *Bacillus* spp. M001 for potential application in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) against *Vibrio anguillarum*. 2016. Aquaculture Nutrition. 22, 374-381. https://doi.org/10.1111/anu.12259

Cotter, P. D., Hill, C. 2003. Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67, 429-453. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003.

Darilmaz, DO, Beyatli, Y, Yuksekdag, Z. N. 2012. Aggregation and hydrophobicity properties of 6 dairy Propionibacteria strains isolated from homemade Turkish cheeses. Journal of Food Science. 77, M20–M24. https://doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02438.x

Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Khajeh, K., Shavandi, M. Shavandi, Ventosa, A. 2012. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. Applied Microbiology and Biotechnology. 95, 789-798. https://doi: 10.1007/s00253-011-3706-4

Duche, R.T., Singh, A., Wandhare, A. G., Sangwan, V., Sihag, M. K., Nwagu, T. N. T., Panwar, H., Ezeogu, L. I. 2023. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. BMC Microbiology. 23 (1), 142. https:// doi: 10.1186/s12866-023-02883-0. PMID: 37208603; PMCID: PMC10197481.

Eissa, E. H., Ahmed, N. H., El-Badawi, A. A., Munir, M. B., Abd Al-Kareem, O. M., Eissa, M. E. H.; Hussien, E. H. M., Sakr, S. E. 2022. Assessing the influence of the inclusion of *Bacillus subtilis* AQUA-GROW® as feed additive on the growth performance, feed utilization, immunological

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

responses and body composition of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. 53, 6606-6615. http://doi:10.1007/s10499-023-01298-y

El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A., et al. 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: an overview. Fish & Shellfish Immunology. 117, 36 - 52. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007

Gabriela, K., Ivana, H., iveta, H. 2019 . In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. Fermentation. *54*, 1-11. https://doi.org/10.3390/fermentation5040100

Gill, H. S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best Practical & Research in Clinical Gastroenterology. 17, 755-773. http://doi: 10.1016/s1521-6918(03)00074-x

Giri, S. S., Sen, S. S., Jun, J. W., Sukumaran, V., Park, S. C. 2016. Role of *Bacillus subtilis* VSG4-derived biosurfactant in mediating immune responses in *Labeo rohita*. Fish & Shellfish Immunology. 54, 220-229. http://doi: 10.1016/j.fsi.2016.04.004

Gómez, G. D., Balcázar, J. L. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Microbiology Immunology. 52, 145-154. http://doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x

Guo, X.H, Kim, J.M, Nam, H.M., Park, S. Y., Kim, J.M. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. Anaerobe. 16, 321-326. http://doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.03.006

Horáčková, Š., Plocková, M., Demnerová, K. 2018. Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction. Biotechnology Advances. 36, 682-690. https://doi .org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.005

Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., Zhou, Z. 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. Frontiers in Microbiology. 9, 2429. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429

Hossain, M. K., Hossain, M. M., Mim, Z. T.; Khatun, H., Hossain, M.T., Shahjahan, M. 2022. Multi-species probiotics improve growth, intestinal microbiota and morphology of Indian major carp *mrigal Cirrhinus cirrhosus*. Saudi Journal of Biological Science. 29, 103399. http://doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103399

Jang, H. J., Song, M. W., Lee, N. K., Paik, H. D. 2018. Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic Lactobacillus plantarum Ln1 isolated from kimchi. Journal of Food Science Technology. 55, 3174-3180. http://doi: 10.1007/s13197-018-3245-4

Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., Settharaksa, S. 2013. In vitro probiotic properties of L. fermentum SK5 isolated from vagina of healthy woman. Anaerobic. 22, 6-13. http://doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.04.009

Khouadja, S., Haddaji, N., Hanchi, M., Bakhrouf, A. 2017. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics for *Vibrio parahaemolyticus* depuration in pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture Research. 48, 1885-1894. http://doi:10.1111/are.13026

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 16 (2),111-120. https://doi.org/10.1007/BF01731581

Klaenhammer, T. R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition. 130, 415s-416s. http://doi: 10.1093/jn/130.2.415S

Kodama, G., Annunciação, W. F., Sanches, E. G., Gomes, C. H. A. M., Tsuzuki, M. Y. 2011. Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, Amphiprion ocellaris, em sistema de recirculação. Boletim Do Instituto De Pesca. Boletim do Instituto de Pesca. 37 (1), 61-72.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547. http://doi: 10.1093/molbev/msy096

Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., Gardiner, N. 2007. Isolation and selection of Bacillus spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

ornamental fish. Journal of Applied Microbiology. 103, 1471-1479. http://doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x

León, J., Pellón, F., Unda, V., David, J., Anaya, C., Mendoza, V. 2000. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. Revista Peruana de Biologia. 7, 202-210. http://doi: 10.15381/rpb.v7i2.6828

Luo, N., Wang, L., Wang, Z., Xiao, B., Wang, N., Yu, X., Wu, D., Song, Z. 2022. Effects of dietary supplementation of duo-strain probiotics with post-spraying technology on growth performance, digestive enzyme, antioxidant capacity and intestinal microbiota of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture Report. 26, 101301. http:// doi: 10.14202/vetworld.2024.602-611

Medina, A., García-Márquez, J., Moriñigo, M.Á., Arijo, S. 2023. Effect of the Potential Probiotic *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 on the Immune System of *Solea senegalensis* and Protection against *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and *Vibrio harveyi*. *Fishes*. 8 (7), 344. https://doi.org/10.3390/fishes8070344

Merghni, A., Leban, N., Behi, L., Bakjrouf, A. 2014. Evaluation of the probiotic properties of Bacillus spp. Strains isolated from Tunisian hypersaline environments. African Journal of Microbiology Research. 8 (4), 398- 405. http//doi: 10.5897/AJMR2013.5457

Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J., Chobert, J., Hani, K., Haertle, T. 2014. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. World Journal of Microbiology Biotechnology. 30 (4), 1207-1217. http://doi: 10.1007/s11274-013-1535-6

Militz, T.A., Foale, S., Kinch, J., Southgate, P. C. 2017. Consumer perspectives on theoretical certification schemes for the marine aquarium trade. Fish Research. 193, 33-42. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.03.022

Mira, N. P., Teixeira, M. C., Sá-Correia, I. 2010. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A genome-wide view. OMICS. 14, 525-540. https://doi.org/10.1089/ omi.2010.0072

Mohammadi, G., Rafiee, G., Tavabe, K. R., Abdel-Latif, H. M., Dawood, M. A. 2021. The enrichment of diet with beneficial bacteria (single or multi-strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 539, 736640. http:// doi: 10.3390/biology11111644

Mulyasari, W., Suprayudi, M. A., Zairin, M., Sunarno, M. T. D. 2016. Screening of probiotics from the digestive tract of gouramy (Osphronemus goramy) and their potency to enhance the growth of tilapia (Oreochromis niloticus). AACL Bioflux. 9, 1121-1132.

Nandi, A., Banerjee, G., Dan, S. K., Ghosh, K., Ray, A. K. 2017. Probiotic efficiency of *Bacillus* sp. in Labeo rohita challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. Aquaculture Research. 48, 4334-4345. http://doi: 10.1007/s12602-017-9310-x

Nandi, A., Banerjee, G., Dan, S. K., Ghosh, K., Ray, A. K. 2018. Evaluation of In Vivo Probiotic Efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* in *Labeo rohita* Challenged by Pathogenic Strain of *Aeromonas hydrophila* MTCC 1739. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 10 (2), 391-398. doi:10.1007/s12602-017-9310-x

Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish & Shellfish Immunology. 29, 2-14. http://doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.017

Olivotto, I., Planas, M., Simoes, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R. 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. Journal of the World Aquaculture Society. 42 (2), 135-166. http://doi: 10.1111/j.1749-7345.2011.00453.x

Perin, L. M., Miranda, R.O., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Nero, L. A. 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

from goat milk. International Journal of Food Microbiology. 185, 121-126. http://doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001

Qiu, Z., Xu, Q., Li, S., Zheng, D., Zhang, R., Zhao, J., Wang, T. 2023. Effects of Probiotics on the Water Quality, Growth Performance, Immunity, Digestion, and Intestinal Flora of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in the Biofloc Culture System. Water. 15 (6), 1211. https://doi.org/10.3390/w15061211

Ramirez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizuete, K., Sonnenholzner, S., Alexis, F., Rodríguez, J. 2022. The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus* sensu stricto (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture. 549. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture. 191, 271-288. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00440-3

Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, J., Zehnder, A. J. B. 1993 Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. Applied Environmental Microbiology. 59, 3255-3265. http://doi: 10.1128/aem.59.10.3255-3265.1993

Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letter. 9, 29-33. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x

Sahu, M.K., Sivakumar, K., Poorani, E., Thangaradjou, T., Kannan, L. 2007. Studies on Lasparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. Journal of Environmental Biology. 28 (2), 465-474 .

Seker, E. 2010. Identification of candida species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. Mycopathologia. 169, 303-8. http://doi: 10.1007/s11046-009- 9255-z

Sneath, P., Mair, J. 1986. Bergys manual of systematic bacteriology. 1st edition. Williama and Wilkins, Baltimore. 1599 p.

Tao, X., He, J., Lu, J., Chen, Z., Jin, M., Jiao, L., Masagounder, K., Liu, W., Zhou, Q. 2022. Effects of *Bacillus subtilis* DSM 32315 (Gutcare®) on the growth performance, antioxidant status, immune ability and intestinal function for juvenile *Litopenaeus vannamei* fed with high/low-fishmeal diets. Aquacultue Report. 26, 101282. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101282

Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., Anbarasu, K. 2015. Characterization of *Bacillus spp*. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita* towards to identify novel probiotics against Fish Pathogens. Applied Biochemical Biotechnology. 175, 340-353. http://doi: 10.1007/s12010-014-1270-y

Twetman, S., Stecksén-Blicks, C. 2008. Probiotics and oral health effects in children. International Journal of Paediatric Dentistry. 18 (1), 3-10. http://doi: 10.1111/j.1365-263X.2007.00885.x

Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., Kang, D.K. 2014. In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of Lactobacillus mucosae LM1. Journal of Applied Microbiology. 117, 485-497. http://doi: 10.1111/jam.12539

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., Ouwehand, A. C. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. Research Microbiology. 156, 238-244. http://doi: 10.1016/j.resmic.2004.08.012

Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T. 2003. From Ocean to Aquarium. 1st edition. UNEP-WCMC, Cambridge. 64 p.

Wang, C., Cui, Y., Qu, X. 2018. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. Archives of Microbiology. 200, 195-201. https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2.

Zárate, G., De Ambrosini, V. I. M., Perez, C.A., González, S.N. 2002. Adhesion of dairy Propionibacteria to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo. Journal of Food Protection. 65, 534-539. http//doi: 10.4315/0362-028x-65.3.534

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]

Zhang, J., Gong, F., Li, L., Zhao, M., Wu, Z., Song, J. 2015. The diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and hepcidin in bacteria translocation of liver cirrhosis. International Journal of Clinical and and Experimental Medicine. 8, 16434-16444.

Zhang, X., Peng, L., Wang, Y., Liang, Q., Deng, B., Li, W., Fu, L., Yu, D., Shen, W., Wang, Z. 2014. Effect of dietary supplementation of probiotic on performance and intestinal microflora of Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*). Aquaculture Nutrition. 20, 667-674. https://doi.org/10.1111/anu.12128

Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X., Wong, A. 2017. Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. Frontiers Microbiology. 8, 908. http://doi: 10.3389/fmicb.2017.00908

Zhu, L., Kong, Y., Chang, X., Feng, J., Wang, X., Hou, L., Zhao, X., Pei, C., Kong, X. 2023. Effects of two fish-derived probiotics on growth performance, innate immune response, intestinal health, and disease resistance of *Procambarus clarkii*. Aquaculture. 562 (5), 738765. http://doi:10.1016/j.aquaculture.2022.738765

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-17]