اثرات آنتاگونیستی پروبیوتیک‌های گرم مثبت بر باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی در شرایط برون‌تنی و اثر محافظتی آن‌ها در شرایط درون‌تنی در ماهیان

مهدی سلطانی [*۱]، روژین فرشگر [۲].

۱- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، msoltani@ut.ac.ir

۲- دانش آموخته دکتری دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه، rozhinfarshgar3000@gmail.com

خلاصه

مطالعات نشان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت تاثیر خوبی در پیشگیری و کنترل شیوع بیماری‌ها در آبزی پروری دارند. ترکیبات فعال زیستی متنوعی مانند باکتریوسین‌ها، سیدروفورها، آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها توسط باکتری‌های گرم‌مثبت ترشح می‌شود که بر علیه بیماری‌زایی بالقوه باکتری‌های گرم منفی مانند ویبریوها و آیروموناس‌ها اثرات قابل توجهی دارند به طوری که مانع از چسبندگی و تثبیت باکتری‌های بیماری زا در مخاط دستگاه گوارش می‌شوند. دهها گونه باکتری گرم‌مثبت به ویژه باسیلوس‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش آبزیان جدا سازی شده و نقش پروبیوتیکی آن‌ها در دهها گونه ماهی مورد بررسی قرار گرفته است. تصور می‌شود که که این پروبیوتیک‌ها با پاتوژن‌های گرم منفی در دستگاه گوارش مقابله کرده و با آن‌ها اثر آنتاگونیستی دارند. اگر چه پروبیوتیک‌های گرم مثبت قادر به مهار رشد پاتوژن‌های گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی هستند اما اطلاعات اندکی درباره حداقل غلظت مورد نیاز برای اثر بازدارندگی پروبیوتیک‌های گرم مثبت در مقابل باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا وجود دارد. علاوه بر این، ترکیب پروبیوتیک‌های گرم مثبت در آبزیان می‌تواند عملکردهای فیزیولوژیکی ایمنی میزبان را بهبود بخشیده و مقاومت به بیماری را افزایش دهد. با این حال، درباره ارتباط اثرات آنتاگونیستی در شرایط برون تنی با اثرات محافظتی در شرایط درون تنی پروبیوتیک‌های گرم مثبت اطلاعاتی وجود ندارد. برای مثال میزان دز مناسب آن‌ها در بیشتر مطالعات انجام شده مورد توجه قرار نگرفته است و داده های کمی برای نشان دادن رفتار رشد آن‌ها مانند اثرات هم افزایی یا آنتاگونیستی در دسترس است. این مطالعه به بررسی اثرات آنتاگونیستی در شرایط برون تنی، اثربخشی بالینی در شرایط درون تنی و تجویز پروبیوتیک‌های گرم مثبت در مقابل پاتوژن‌های گرم منفی در ماهیان پرداخته و سوالات و تحقیقات مورد نیاز آینده را مورد بحث قرار داده است.

کلمات کلیدی: باسیلوس، آنتاگونیست، پروبیوتیک، گرم مثبت، گرم منفی.

۱. مقدمه

توسعه صنعت آبزی‌پروری به صورت سیستم‌های پرورشی متراکم و فوق متراکم می‌تواند بر عملکردهای فیزیولوژیکی و ایمنی بدن موجودات آبزی پرورشی به طور قابل توجهی تأثیر بگذارند و منجر به شیوع بیماری‌های عفونی به ویژه بیماری های باکتریایی شود[۱] .در این شرایط پرورشی، با توجه به جمعیت بیشتر باکتری‌های گرم منفی در دستگاه گوارش حیوانات آبزی و محیط آبی، احتمال شیوع بیماری‌هایی که توسط پاتوژن‌های گرم منفی ایجاد می‌شود بیشتر از باکتری های گرم مثبت است. این پاتوژن‌ها ممکن است به صورت عامل اولیه و یا ثانویه بیماری ایجاد کنند[2]. با توجه به شیوع بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های گرم منفی در صنعت آبزی‌پروری ممکن است داروهای بیشتری برای پیشگیری، کنترل و درمان استفاده شود. استفاده از داروها در صنعت آبزی‌پروری می‌تواند سبب ایجاد مشکلاتی از جمله افزایش مقاومت باکتریایی و افزایش باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در بافت‌های خوراکی شود. این مسئله سبب ایجاد نگرانی در زمینه بهداشت عمومی شده و به اکوسیستم های آبی آسیب می‌رساند. استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین داروها به منظور پیشگیری و یا محافظت در برابر بیماری‌ها می تواند سبب بهبود قابلیت هضم مواد غذایی، ایمنی ذاتی، مقاومت در برابر بیماری و کاهش استرس شود. به خوبی ثابت شده است که تجویز برخی از باکتری‌های گرم مثبت مانند باکتری‌های اسید لاکتیک(LAB) و باسیلوس می تواند از چسبندگی، کلونیزاسیون، و تکثیر پاتوژن‌های گرم منفی بیماری‌زا در دستگاه گوارش ماهیان و سخت‌پوستان جلوگیری کند[1,3,4]. پروبیوتیک‌های گرم مثبت اتصال و تکثیر پاتوژن‌های گرم منفی بر روی سطوح ساختاری (مانند گیرنده‌ها و مولکول‌های چسبنده) را مهار می‌کند و همچنین هضم غذا، کیفیت آب پرورشی را بهبود می‌بخشد و سبب تحریک پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌شود [۶،۵]. در مطالعات بسیاری مکانیسم اثر پروبیوتیک‌های گرم مثبت شامل LAB و باسیل‌ها در آبزی پروری مورد مطالعه قرار گرفته است [۷،۸]. تا به امروز بیش از ۵۰ گونه از باکتری‌های گرم مثبت، که بیشتر متعلق به جنس باسیلوس و باکتری های اسیدلاکتیک هستند به عنوان پروبیوتیک در ماهیان پرورشی تجویز شده است [۱۰،۹،۱]. علاوه بر این، در شرایط درون‌تنی اثربخشی و قدرت بسیاری از پروبیوتیک‌های گرم مثبت در برابر بسیاری از پاتوژن‌های گرم منفی در دزهای مختلف و تحت شرایط مختلف در بسیاری از گونه های ماهیان برای مدت زمان‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است[۱،۹]. با این حال سؤالات بسیاری به ویژه در خصوص تعیین ارتباط بین اثرات آنتاگونیست پروبیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی با نتایج میزان اثربخشی بالینی این پروبیوتیک‌ها به عنوان عامل پیشگیری کننده در شرایط درون تنی وجود دارد که نیازمند مطالعات بیشتری در آینده می‌باشد. به عبارت دیگر در بسیاری از این بررسی‌ها میزان دز بهینه جهت اثربخشی بالینی یک پروبیوتیک خاص روی باکتری گرم منفی پاتوژن هدف مورد کم توجهی قرار گرفته است. این مطالعه به بررسی فعالیت آنتاگونیستی پروبیوتیک‌ها در شرایط برون تنی و مقاومت این پروبیوتیک‌های گرم مثبت در شرایط بیماری و درون تنی در برابرپاتوژن های گرم منفی ماهیان و شکاف ها و کارهای تحقیقاتی مورد نیاز آینده می‌پردازد.

۲. گرم مثبت‌ها

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) باکتری‌های میله‌ای شکل شامل کارنوباکتریوم و لاکتوباسیلوس و یا باکتری‌های کروی شامل انتروکوک، لوکونوستوک، پدیوکوکوس، استرپتوکوکوس و واگوکوکوس می‌باشد که از منابع مختلف من جمله دستگاه گوارش ماهیان و سخت پوستان جدا شده است[۱۱]. این باکتری‌ها در شاخه فیرمیکوت‌ها ، کلاس باسیل، و راسته لاکتوباسیل‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. این باکتری‌ها غیرهاگ زا، با مورفولوژی میله ای یا کروی، کاتالاز و اکسیداز منفی و اکثرا غیرمتحرک هستند. به طور کلی، pHمورد نیاز جهت رشد این باکتری‌ها ۵.۵ تا ۸.۵ است، دارای نیازهای غذایی پیچیده بوده و به دو دسته هموفرمنتیو و هتروفرمنتیو تقسیم می‌شوند. هتروفرمنتیوها از قند اسید لاکتیک، اسید استیک یا الکل و دی اکسید کربن تولید می‌کنند در حالی که هموفرمنتیوها از قند اسیدلاکتیک تولید می‌کنند. یک ویژگی مطلوب باکتری‌های LAB تولید مواد مهار کننده رشد مانند باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن، دی‌اسیل‌ها و غیره تولید می‌کنند. جنس باسیلوس‌ها متعلق به شاخه فیرمیکوت‌ها، کلاس باسیل) (Bacilli، راسته باسیل (Bacilllales))و خانواده باسیلاسه (Bacillaceae) می‌باشند و تقریباً از ۳۰۰ گونه و زیرگونه تشکیل شده است. این باکتری‌ها هوازی، میله‌ای شکل و هاگ‌زا مشخص می‌باشد و در شرایط کمبود کربن و گلوکز بی‌هوازی اختیاری می‌باشند. آنها چندین مزایای متمایز مانند رشد سریع، توانایی تحمل طیف وسیعی از شرایط فیزیولوژیکی، تولید آنزیم‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، متابولیت‌ها، و سایر ترکیبات فعال زیستی را دارند و از دستگاه گوارش ماهیان و سخت پوستان جدا شده اند[۱۲] .آرتروباکترها غیرهاگ‌زا، بدون کپسول بوده و از طیف گسترده و متنوعی از مواد آلی استفاده می‌کند، توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی را دارد [۱۳،۱۴] و در روده ماهیان وجود دارد. بیفیدوباکترها «باکتری‌های خوب» نامیده می‌شود که هاگ تولید نمی‌کند. در اشکال مختلف از جمله میله‌ای کوتاه، منحنی و گرزی‌شکل وجود دارند. کاتالاز و اکسیداز منفی بوده و بیشتر آنها غیرمتحرک هستند و برای سلامتی مفید می‌باشد [۱۵]. بروکوتریکس‌ها غیرهاگ‌زا، غیرمتحرک و کاتالاز مثبت است. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل هستند اما در طول دوران رشد تغییرات خاصی در مورفولوژی سلولی نشان می‌دهند. کلستریدیوم تولید کننده بوتیریک اسید است و بوتیرات یک متابولیت ضروری در روده و منبع انرژی ترجیحی برای سلول‌های اپیتلیال است [۱۶]۰ کوکوریا یک باکتری کروی‌شکل دارای دیواره سلولی سفت و سخت است. هوازی یا بی هوازی اختیاری هستند. جنس میکروکوکوس جز خانواده میکروکوکاسه‌ها می‌باشد. این باکتری‌ها کروی، کاتالاز و اکسیداز مثبت با دیواره سلولی قابل توجهی می باشند [۱۷]۰ باکتری‌های جنس رودوکوکوس یک باکتری هوازی، غیرهاگ زا و غیرمتحرک که شباهت زیادی به مایکوباکتریوم‌ها و کورینه‌باکتریوم‌ها دارد. تعداد کمی از گونه‌ها بیماری زا هستند و در طیف وسیعی از محیط‌ها جدا شده‌اند.

۳ . باکتری‌های گرم منفی

اعضای جنس ویبریو و آیروموناس‌ها مهم‌ترین پاتوژن در صنعت آبزی‌پروری می‌باشد [۱۸]۰ گونه‌های ویبریو با شکل میله‌ای خمیده (ویرگول مانند)، متحرک و غیراسپورزا می‌باشند. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، و بسیاری از آنها اکسیداز مثبت هستند. معمولاً برای رشد به نمک نیاز دارند. جنس آیروموناس غیراسپورزا، متحرک یا غیر متحرک، بی‌هوازی اختیاری و اکسیداز مثبت می‌باشد. مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زا در ماهیان و سخت پوستان آیروموناس هیدروفیلا و آیروموناس سالمونیسیدا هستند.

۵. نحوه عملکرد پروبیوتیک‌های گرم مثبت

۵-۱. تعدیل سیستم ایمنی

مانند سایر حیوانات، ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد. پروبیوتیک‌های گرم مثبت قادر به تحریک و تعدیل پاسخ‌های ایمنی ذاتی حیوان با افزایش مونوسیت‌ها، گلبول‌های قرمز، گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها در آبزیانی مانند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپور، گربه‌ماهی و تیلاپیا هستند[۱۲، ۱۹].پروبیوتیک‌های گرم مثبت نیز الگوهای مولکولی حفظ شده میکروارگانیسم‌ها از جمله فلاژلین، اگزوپلی ساکاریدها، پپتیدوگلیکان، اسیدهای لیپوتیکوئیک، لایه S پروتئین A، اسید نوکلئیک میکروارگانیسم‌ها را دارند.این پدیده باعث القای حرکات آبشاری می‌شود که به دنبال آن اینترلوکین‌ها و سیتوکین‌ها و سایر عوامل ملکولی فعال کننده سیستم ایمنی حیوانات ترشح می‌شود[۲۰]. پروتئین شوک حرارتی۷۰(HSP70) را می‌توان با پروبیوتیک‌های گرم مثبت مانند لاکتوباسیلوس فروکتیورانس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم تحریک کرد و از نشانه های آن افزایش مقاومت به شرایط استرس، و تنظیم بیان ژن برخی از سایتوکین ها از جمله فاکتور نکروز تومورα (TNF-α)، اینترلوکین1β (IL-1β) ، و اینترلوکین ۱۰ (IL-10) می‌باشد[۲۱].

۵-۲. رقابت برای محل اتصال

مکانیسم پروبیوتیک‌های گرم مثبت در کنترل باکتری‌های گرم منفی بیماری زا حذف رقابتی است[۲۲]. پروبیوتیک‌های گرم مثبت می‌توانند به اپیتلیوم مخاط دستگاه گوارش چسبیده و به دنبال آن کلونیزاسیون رخ بدهد و از چسبندگی و کلونیزاسیون باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا روی سطوح دستگاه گوارش جلوگیری می‌کند [۲۲]. با توجه به رقابت پروبیوتیک‌ها در چسبندگی و کلونیزه شدن با باکتری‌های بیماری‌زا پتانسیل خود را به عنوان یک ابزار جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها امیدوارکننده نشان می‌دهند [۲۳]. با این حال، هیچ تلاشی برای تعیین میزان دز بهینه پروبیوتیک‌ها برای حداکثر رقابت، چسبندگی و کلونیزاسیون در دستگاه گوارش حیوانات آبزی نشده است. فرآیند چسبندگی شامل واکنش‌هایی میان غشای سلولی باکتری و ترکیبی از اپیتلیال و لایه مخاط چسبنده روده میزبان و عوامل متعددی مانند نیروهای غیرفعال (نیروهای آبگریز، فضایی و الکترواستاتیک)، و پروتئین‌های تقویت‌کننده چسبندگی می‌باشد که بر اتصال و چسبندگی پروبیوتیک‌ها به اپیتلیوم مخاطی میزبان اثر می‌گذارند [۲۴].

۵-۳. رقابت برای مواد مغذی

مکانیسم پروبیوتیک‌های گرم مثبت برای مهار پاتوژن‌های باکتریایی رقابت برای مواد مغذی مانند آهن است[۲۵]. سیدروفورها(عامل اتصال آهن)، سبب می شود آهن را به داخل سلول از طریق مکانیسم‌های انتقال فعال منتقل کند [۲۶]. اما جزئیات رقابت پروبیوتیک‌های گرم مثبت و پاتوژن‌های ماهی در اخذ مواد مغذی نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

۵-۴. مقاومت در برابر بیماری

قبلا نشان داده شده بود که پروبیوتیک‌های گرم مثبت اثرات مثبتی بر مقاومت به بیماری‌ها دارند[۲۷]. پروبیوتیک‌های گرم مثبت نیز باکتریوسین، سیدروفور، لیزوزیم، هیدروژن پراکسید، مواد اسیدی و آنتی بیوتیک ترشح می‌کنند که برای پاتوژن‌های باکتریایی ماهی و سخت‌پوستان مضر هستند [۲۸].

۵-۵. ترشح مواد ضد باکتریایی

چندین مطالعه تولید مواد ضد باکتریایی توسط باکتری‌های پروبیوتیک گرم مثبت که جهت مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی در ماهی و سخت‌پوستان تولید می‌شود را با استفاده از سنجش‌های میکروبیولوژیکی مانند انتشار دیسک و میکرورقیق‌سازی اثبات کردند [۱۱]. برخی از مطالعات نشان دادند که پروبیوتیک‌های گونه لاکتوباسیلوس دارای پروتئین‌های ضد باکتریایی، دی استیل، هیدروپراکسید و اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه هستند که در افزایش مقاومت به بیماری و افزایش پاسخ‌های ایمنی موجودات آبزی نقش دارند [۱۱].

۵-۶. مداخله در سیستم حد نصاب (QS)

سیستم حد نصاب (QS) یک ارتباط سلول به سلول جمعیت‌های باکتریایی به وسیله مولکول‌های سیگنال‌دهی کوچکی می‌باشد که سطح حدت را در بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی تنظیم می‌کند. این یک ویژگی مطلوب برای مهار حدت است و می‌تواند فرصت‌های جدیدی را برای کارهای درمانی در آبزی‌پروری از طریق مهار حدت باکتری‌های بیماریزای هدف به جای رشد و تکثیر آن‌ها فراهم کند. مطالعات تحقیقاتی نشان داده است که مهارکننده‌های QS از جمله باکتری‌ها می‌تواند بیماری زایی را کاهش دهد و از موجودات آبزی در برابر بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بیماری زا گرم منفی محافظت کند [۲۹]به عنوان مثال، باسیلوس QSI-1 که از روده کپور پروسی و ماهیانی که به صورت خوراکی در رژیم غذایی این باسیلوس‌ها را مصرف کرده بودند، جدا شده است. این باسیلوس باعث می شود این ماهییان قابلیت زنده‌مانی خوبی داشته باشند[۸].

۶. پروبیوتیک‌های گرم مثبت در مقابل پاتوژن‌های گرم منفی در ماهیان

۶-۱. لاکتوباسیلوس‌ها

مطالعات متعددی در خصوص اثربخشی و قدرت لاکتوباسیلوس‌ها انجام شده است [۱۱،۱]. لاکتوباسیلوس گونه DS-12 در برابر آیروموناس هیدروفیلا، ادواردزیلا تاردا، پاستورلا پیسیسیدا و ویبریو آنگوئیلارم خاصیت مهاری دارد اما قادر به مهار رشد سودوموناس فلورسانس و سودوموناس آنگویلی سپتیکا نبود[۳۰]. این تنوع در فعالیت آنتاگونیستی برعلیه باکتری‌های بیماری زای گرم منفی ممکن است به دلیل تولید و ترشح اسید توسط باکتری لاکتوباسیلوس گونه DS-12 باشد[۳۱]. در شرایط آزمایشگاهی اثرات مهارکنندگی *L. curvatus* CLFP 150 در برابر آئروموناس سالمونیسیدا، ویبریو سالمونیسیدا و یرسینیا روکری، و همچنین L.Sakei CLFP 202 روی یرسینا روکری و آیروموناس سالمونیسیدا ثابت شده است [۳۱]. با این حال، همان نویسندگان، تنها اثر درون تنی *L. sakei* را در قزل آلای رنگین‌کمان در چالش با آیروموناس سالمونیسیدا بررسی نمودند که با افزایش پاسخ‌های ایمنی و میزان زنده‌مانی ۹۷.۸٪ تا ۱۰۰٪ در مقایسه با ۶۵.۵٪ بقا در گروه شاهد همراه بود [۳۲]. بعدها، بالکازار و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که *L.fermentum* CLFP 242 توانست چسبندگی آیروموناس هیدروفیلا، آیروموناس سالمونیسیدا و یرسینا روکری به مخاط روده قزل آلای رنگین کمان را کاهش دهد، اما *L. plantarum* CLFP 238 فقط از چسبندگی آیروموناس هیدروفیلا، آیروموناس سالمونیسیدا به مخاط روده قزل‌آلا جلوگیری می‌کند[۳۳]. با این حال، هر دو گونه لاکتوباسیلوس در شرایط آزمایشگاهی نتوانستند از رشد پاتوژن های گرم منفی جلوگیری کنند. بنابراین اثرات حفاظتی این گونه‌های لاکتوباسیلوس در برابر پاتوژن‌های گرم منفی بیماری‌زا ناشناخته است. سویه لاکتوباسیلوس گونه‌های RLD1، RLD2 و RLD3 جدا شده از گربه‌ماهی(*Clarias orientalis*)، ماهی تیلاپیا، ماهی (*Punitus carnaticus*)Gende، مار ماهی Hari و ماهی روهو در محیط

آب شیرین اثرات آنتی باکتریایی علیه گونه آیروموناس را نشان می‌داد. اما تنها سویه RLD2 طیف وسیعی از خاصیت آنتاگونیستی را علیه گونه‌های آیروموناس و ویبریو نشان می‌داد[۳۴]. اطلاعاتی در مورد اثرات پروفیلاکتیک لاکتوباسیل‌ها در ماهیان عفونی شده با پاتوژن‌های گرم منفی در شرایط درون تنی در دسترس نیست. الایراجا و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر مهاری لاکتوباسیلوس مورینوس AU06 جدا شده از رسوبات دریایی در برابر گونه‌های ویبریو و سودوموناس آیروژنوزا را نشان دادند اما اثربخشی بالینی آن در برابر این پاتوژن‌های ماهی ناشناخته است[۳۵]. از میان پنج گونه لاکتوباسیلوس *Lb. rhamnosus* ATCC 53103. ،*Lb. casei* Shirota ،*Lb.bulgaricus* ،*L. rhamnosus* LC 705 و لاکتوباسیلوس جانسونی (La1) ، گونه L.rhamnosus ATCC 53103 , *Lb. bulgaricus* و لاکتوباسیلوس جانسونی La1 چسبندگی قابل توجهی به پوست و مخاط روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان دادند، اما هیچ یک از آنها قادر به مهار اتصال آیروموناس سالمونیسیدا به لایه مخاطی نبودند [۳۶]. ترکیب باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با باسیلوس سوبتیلیس نشان دهنده اثربخشی بالینی بهتر چند سویه نسبت به سویه منفرد است[۳۷]. علاوه بر این، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جدا شده از دوغ با *A. hydrophila* در روش آزمایشگاهی آنتاگونیست بود و هنگامی که به طور تجربی گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) با آیروموناس هیدروفیلا آلوده شده و با این پروبیوتیک‌ها به مدت سه هفته مورد تغذیه قرار گرفت، شرایط هماتولوژیکی بهتری از خود نشان دادند و باعث بقای ۱۰۰ درصدی نسبت به بقای ۷۶.۶ درصدی در ماهیان شاهد شد [۳۸]. تیلاپیا با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به میزان $۱۰^{۶}$ × ۷ سلول در ۱۰۰ گرم رژیم غذایی به مدت ۹۸ روز تغذیه شد پس از چالش با *A. hydrophila* میزان بقای ۱۰۰ درصدی را در مقایسه با ۸۰ درصد بقا در ماهی شاهد نشان داد[۳۹]. پیرارات و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند در تیلاپیا نیل پس از تغذیه ماهی با *Lb. rhamnosus* به مدت دوهفته، و با در معرض قرار گرفتن با باکتری ادواردزیلا تاردا در مقایسه با ماهی شاهد از نظر بالینی میزان زنده مانی بیشتر بود، میزان بقا در ماهیانی که با دز بالاتری از پروبیوتیک تغذیه شده بودند(۹۶.۷٪)، به طور قابل توجهی نسبت به ماهیانی که دز کمتر (۸۳/۳٪) از پروبیوتیک را دریافت کرده بودند بالاتر بود که نشان دهنده نقش مهم دز بهینه پروبیوتیک است[۴۰]. پاسخ‌های ایمنی ذاتی ماهی مانند سیستم کمپلمان آلترناتیو، تجمع سلول فاگوسیتیک و فعالیت فاگوسیتوز نیز در ماهی تحت درمان مورد بررسی قرار گرفت. دلیل محافظت از ماهی در برابر سپتی سمی ادواردزیلایی ناشی از اداواردزیلا تاردا بهبود وضعیت سیستم ایمنی ذاتی می تواند باشد [۴۰]. در یک مطالعه نشان داده شد که که *L. delbrueckii* موجود در قسمت قدامی دستگاه گوارش ماهی آزاد اقیانوس اطلس، از ماهی در برابر آیروموناس سالمونیسیدا محافظت می‌کرد[۴]. به طور مشابه، در ماهی سیم سرطلایی تغذیه شده با لاکتوباسیلوس رامنوسوس میزان کلونیزاسیون باکتری‌های *Photobacterium damselae* گونه پسیسیدا، *V. alginolyticus*، *V. harveyi* و *V. anguillarum* در مخاط به طور قابل توجهی کاهش یافت. [3]. این مهار کلونیزاسیون باکتریایی شانس چسبندگی پاتوژن، کلونیزاسیون، تکثیر و نفوذ به بافت میزبان که منجر به ایجاد بیماری می‌شود را کاهش می‌دهد. با این حال، بهینه سازی دز پروبیوتیک مهم است. عاملی مانند دز بیش از حد یا دز پایین پروبیوتیک انتخابی می‌تواند بر نحوه عملکرد پروبیوتیک به عنوان مثال میزان چسبندگی باکتریایی و کلونیزاسیون، رقابت باکتریایی و تحریک ایمنی ذاتی میزبان تأثیر منفی بگذارد. نویسندگان همچنین نشان دادند که سطح چسبندگی به مخاط ماهی وابسته به سویه پروبیوتیک می‌باشد. منقار ماهی نواردار تغذیه شده با لاکتوباسیلوس ساکی به مدت شش هفته پس از به چالش کشیدن با ادواردزیلا تاردا بقا ۶۰ درصدی در مقایسه با میزان بقا ۴۰ درصدی در ماهیان شاهد نشان دادند. در ترکیب این پروبیوتیک‌ها با گیاه کلاهک جمجمه بایکال میزان بقا به ۷۵٪ رسید که به این دلیل می باشد که پاسخ‌های ایمنی در ماهی‌های تغذیه شده با ترکیب گیاه و پروبیوتیک بهبود می‌یابد [۴۱]. لی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند تغذیه مارماهی ژاپنی با *L.*

pentosus PL11 در چالش با ادواردزیلا تاردا کاهش معنی داری را در میزان مرگ و میر در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دادند که به دلیل افزایش قابل توجه سطح ایمنی ماهی‌های درمان شده بود[۴۲]. با این حال، هیچ یک از این مطالعات، ظرفیت آنتاگونیستی پروبیوتیک ها را در شرایط برون‌تنی اندازه گیری نکرد. پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم 13BC، 1MTK و 4BC و لاکتوباسیلوس برویس 1BT جدا شده از روده ماهی کپور معمولی و ماهی تیلاپیا خاصیت بازدارندگی بالایی در برابر گونه های ویبریو و سودوموناس آئروژینوزا در هر دو شکل پروبیوتیک (سلول های زنده) و پارا پروبیوتیک (ترکیبات خارج سلولی) داشت [۴۳]. در کار بعدی کاکتچام و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص شد این سویه‌های LAB برای استفاده در آبزی پروری ایمن هستند زیرا آنها فاقد فعالیت‌های همولیتیک و ژلاتیناز هستند، آمین بیوژنیک تولید نکرده و مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد نمی‌کنند[۴۴]. ارزیابی اثربخشی بالینی پروبیوتیک‌ها و ایمنی آنها در میزبان هدف در شرایط درون تنی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. در ماهی تیلاپیا با رژیم غذایی حاوی لاکتوباسیلوس بسیار چسبنده برویس JCM 110 که بعدا در معرض سویه خطرناک آیروموناس هیدروفیلا قرار می‌گرفت در مقایسه با گروه کنترل زنده مانی بالاتری را نشان می‌دادند[۴۲]. در حالی که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس JCM 1132 با چسبندگی کم تر فعالیت محافظتی کم‌تری داشت که نشان دهنده این می باشد سطح چسبندگی پروبیوتیک‌ها یکی از عوامل مطلوب در انتخاب سویه‌های لاکتوباسیلوس برای استفاده به عنوان یک ابزار حفاظتی در صنعت آبزی پروری می‌باشد[۴۲]. افزایش مقاومت نسبت به بیماری آیروموناس هیدروفیلا در باس دریایی آسیایی تغذیه شده با لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به مدت ۳۰ روز به صورت جداگانه نشان داد لاکتوباسیلوس پنتوسوس موثرتر از لاکتوباسیلوس فرمنتوم بود. تجویز لاکتوباسیلوس casei و لاکتوباسیلوس پلانتاروم، در برابر سپتی سمی ناشی از آیروموناس متحرک ایجاد شده توسط آیروموناس هیدروفیلا در مقایسه با ماهی شاهد هیچ اثر محافظتی قابل توجهی را نشان نداد[۴۵]. برخلاف آن کاربرد خوراکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم در کپور معمولی عفونی شده با آیروموناس هیدروفیلا باعث افزایش بقای قابل توجهی در ماهی شد. سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس جدا شده از محصولات تخمیر شده ماهیان، فعالیت ضد باکتریایی را علیه شیگلا فلکسنری و پروتئوس ولگاریس نشان می‌داد[۴۶]. اما هیچ داده‌ای وجود ندارد که نشان دهنده اثربخشی بالینی این پروبیوتیک نسبت به باکتری های گرم منفی بیماری زا باشد. استفاده مکرر خوراکی از LAB یا استفاده ترکیبی از LAB همراه با سایر پروبیونت‌ها و محرک‌های ایمنی بقای ماهیان آلوده با پاتوژن‌های باکتریایی گرم منفی را بهبود می‌بخشد . با این حال، هیچ یک از این مطالعات، به مطالعه میزان همبستگی بین اثر محافظتی پروبیوتیک‌های هدف در شرایط درون تنی با فعالیت‌های آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی نپرداخته است. علاوه بر این، برخی از پروبیوتیک‌ها ممکن است یک اثر آنتاگونیستی وابسته به دز را با میکروفلور میزبان ارائه می دهد، بنابراین، بهینه سازی دز یک عامل مهم برای اعتباربخشی به اثربخشی بالینی محافظتی پروبیوتیک‌های انتخاب شده است. بهینه سازی دز پروبیوتیک‌های گرم مثبت به صورت ترکیبی از لاکتوباسیلوس‌ها و باسیلوس‌ها که در برابر پاتوژن‌های گرم منفی اثر محافظتی بیشتری نسبت به استفاده تکی دارند، نیاز به توجه بیشتری دارد[۴۵].

۶-۲ . کارنوباکتری‌ها

Carnobacterium inhibens K1 منشا گرفته ازدستگاه گوارش ماهی آزاد اقیانوس اطلس دارای اثرات آنتاگونیستی در برابر آیروموناس سالمونیسیدا و ویبریو آنگوئیلارم بود [۴۷]. بعدها، زمانی که همان سویه کارنوباکتریوم توسط رابرتسون و همکاران در سال ۲۰۰۰، آزمایش شد، مهارکننده آیروموناس هیدروفیلا، آیروموناس سالمونیسیدا و فلاوباکتریوم سایکروفیلیوم، سودوموناس damselae تحت گونه پیسیسیدا، ویبریو آنگوئیلاروم، ویبریو اردالی بود اما بر lividum *Janthinobacterium* ،*V. alginolyticus* و *V. harveyi* و *Y. ruckeri* اثر

نداشت. تغذیه آزاد ماهی اقیانوس اطلس با پروبیوتیک به مدت هفت روز و پس از در معرض قرار گرفتن پاتوژن های *A. salmonicida*، *Y. ruckeri*، *V. anguillarum* و *V. ordalii* اثر محافظتی نشان ندادند. پس از تغذیه ماهی با پروبیوتیک به مدت ۱۴ روز بقای ماهی در آلودگی با *A. salmonicida*، *V. ordalii*، و *Y. ruckeri*، افزایش یافت اما در مورد ویبریو آنگوئیلاروم این چنین نیست. علاوه بر این، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده به مدت ۱۴ روز با پروبیوتیک بقای قابل توجهی پس از چالش با آیروموناس سالمونیسیدا و یرسینا روکری داشت. به طور مشابه، زمانی که ماهی ۲۸ با روز با پروبیوتیک تغذیه شد بقا در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود [۴۸]. چنین داده‌هایی به وضوح نشان می‌دهد که مدت زمان کاربرد پروبیوتیک یک معیار مهم در به دست آوردن اثربخشی حفاظتی بالینی است. مصرف خوراکی کارنوباکتریوم به مدت دو هفته در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در کاهش عفونت با آیروموناس سالمونیسیدا موثر بود[۴۹]. فعالیت آنتاگونیستی *Carnobacterium divergens* سویه ۶۲۵۱ منشا گرفته از دستگاه گوارش آزاد ماهی قطبی بر علیه آیروموناس سالمونیسیدا و ویبریو آنگوئیلاروم نشان داده شد[۵۰]، اما هیچ اطلاعاتی در مورد اثربخشی بالینی این پروبیوتیک بر علیه پاتوژن‌های گرم منفی وجود ندارد. در یک مطالعه سویه *C. divergens* Lab 01 به مدت سه هفته در رژیم غذایی ماهی گنجانده شد پس از چالش ماهی با باکتری ویبریو آنگوئیلاروم میزان بقای ۶۰ درصدی در لارو ماهی کاد اقیانوس اطلس در مقایسه با ماهی کنترل به میزان بقای ۴۰٪ مشاهده شد. هیچ فعالیت مهاری قابل توجهی از *C.divergens* منشا گرفته از روده ماهی کاد در برابرویبریو آنگوئیلاروم وجود ندارد در صورتی که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت آنتاگونیستی مشاهده شده است[۵۱]. بنابراین، نتایج آزمایشگاهی در خصوص خواص آنتی باکتریایی یک پروبیوتیک به تنهایی برای تصمیم گیری در مورد استفاده از یک پروبیوتیک خاص به عنوان یک عامل پیشگیری کننده در صنعت آبزی پروری کافی نیست. *C. maltaromaticum* B26 و *C. divergens* B33 جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت شرایط آزمایشگاهی بر علیه آیروموناس سالمونیسیدا، آیروموناس هیدروفیلا، ویبریو آنگوییلاروم و یرسینا روکری فعالیت آنتاگونیستی داشتند. ایزوله‌ها می توانستند در لایه مخاط روده ماهی کلونیزه شوند[۱۹]. علاوه بر این، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سویه B26 یا سویه B33 در صورت مواجهه با آیروموناس سالمونیسیدا هشتاد درصد بقا در مقایسه با ۲۰ درصد بقا در گروه شاهد نشان می‌داد. میزان بقای به ترتیب ۷۳٪ و ۸۰٪ درماهی‌های تحت درمان در زمان مواجهه با یرسینا روکری در مقایسه با ۱۳٪ بقا در ماهی شاهد مشاهده گردید [۱۹] ، که نشان دهنده ارتباط مثبت بین اثربخشی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی پروبیوتیک‌های مورد استفاده می‌باشد.

۶-۳. لاکتوکوکوس‌ها

لاکتوکوکوس لاکتیس AR21 جدا شده از روتیفر(*Brachionus plicatilis*) در شرایط آزمایشگاهی اثر مهاری در برابر سویه ویبریو آنگوئیلاروم نشان داد[۳۱] زمانی که لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس CLFP 100 و لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه Cremoris CLFP 102 جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلای رنگین کمان با آیروموناس سالمونیسیدا، یرسینا روکری و ویبریوم آنگوئیلاروم در شرایط برون‌تنی تحت چالش قرار دادند، اثر مهارکنندگی مشاهده نمودند. کاهش ظرفیت چسبندگی مخاط ماهی به پاتوژن‌های گرم منفی نیز با این دو LAB مشاهده شد [۳۱]که می تواند کلونیزه شدن و تکثیر پاتوژن‌ها را سرکوب کند. علاوه بر این، مصرف خوراکی سویه CLFP 100 توانست ۱۰۰٪ زنده ماندن را در قزل آلای رنگین‌کمان پس از چالش با آیروموناس سالمونیسیدا القا کند که تفاوت معنی داری با ماهی‌های درمان نشده با میزان بقای ۶۵.۶٪ داشت[۳۲]. این تفاوت در بقای ماهی به دلیل افزایش سطح پاسخ های ایمنی ماهی تیمار شده نسبت به ماهی شاهد بود و این داده‌ها توسط نویسندگان

اندازه گیری شد. نتایج مشابه در ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای تغذیه شده با سویه CLFP 100 گزارش شد. در ماهیانی که پروبیوتیک مصرف کردند و در معرض آیروموناس سالمونیسیدا قرار گرفتند میزان بقا ۸۵٪ بود در مقابل در گروه شاهد میزان بقا ۶۳٪ بود[۵۲]. مجددا تحت سنجش آزمایشگاهی، لاکتوکوکوس لاکتیس CLFP101 توانست ظرفیت چسبندگی آیروموناس هیدروفیلا، یرسینا روکری و ویبریو آنگوئیلاروم را به مخاط روده ماهی قزل آلا کاهش دهد[۳۳]، این مطلب نشان دهنده رقابت لاکتوکوکوس سویه‌های لاکتیس در دستگاه گوارش ماهی با عوامل باکتریایی جهت چسبندگی و کلونیزه شدن است. به خوبی اثبات شده است که باکتری‌های LAB اسیدهای آلی مختلفی ترشح می کند که در برابر چندین گونه باکتری گرم منفی موثر هستند [۵۳]. بنابراین، محدودیت چسبندگی و کلونیزاسیون پاتوژن‌های گرم منفی در دستگاه گوارش ماهی می تواند تا حدی به دلیل وجود چنین ترکیبات ضد باکتریایی ترشح شده توسط LAB باشد. علاوه بر این، سویه CLFP 101 قادر به مهار رشد پاتوژن‌های گرم منفی فوق در محیط کشت شد. لاکتوکوکوس لاکتیس WFLU12 جدا شده از ماهیان دریایی وحشی توانست رشد *V. ichthyoenteri* و آیروموناس سالمونیسیدا و ویبریو آنگوئیلاروم را مهار کند [۵۴]. اما اثر محافظتی آن در برابر این پاتوژن های گرم منفی ناشناخته است و بنابراین، در آینده کارهای تحقیقاتی روی هر دو شکل پروبیوتیک و پاراپروبیوتیک مورد نیاز است. باکتریوسین سویه های لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس (1FT, 1FWو 3FT) به دست آمده از روده ماهی کپور معمولی و تیلاپیا مهارکننده رشد گونه ویبریو و سودوموناس آیروژنوزا بود [۴۳]. اگرچه ایمنی این سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس توسط Kakcham و همکاران تحت شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد، نویسندگان ایمنی و اثر حفاظتی سویه ها در شرایط درون تنی در گونه های ماهی ذکر شده را مطالعه نکرده‌اند. لاکتوکوکوس لاکتیس HNL12 جدا شده از دستگاه گوارش هامور کوهان‌دار وحشی در غلظت‌های مختلف (۱۰۱۰-۱۰۶ CFU/g) به مدت چهار هفته در ماهیان به صورت خوراکی تجویز شد. این مطالعه نشان داد که ماهیانی که در معرض *V.harvey* قرار گرفتند میزان بقایی در محدوده ۵۶٪ تا ۷۰٪ داشتند در مقایسه در ماهیان شاهد ۳۶ درصد بقا مشاهده شد. مقاومت به بیماری (۷۰ درصد بقا) در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک در دز بالاتر (۱۰۸CFU/g-1≥) بیشتر بود و میزان بقا در دزهای کم (۱۰۶CFU/g) کاهش یافته بود(۵۶ درصد بقا). این مطلب نشان دهنده اهمیت بهینه سازی دز پروبیوتیک است همچنین، چنین افزایشی در مقاومت به بیماری در ماهیان با تشخیص افزایش پاسخ‌های ایمنی ماهی، یعنی افزایش فعالیت انفجار تنفسی، سوپراکسید دیسموتاز، اسید فسفاتاز، لیزوزیم و همچنین تنظیم مثبت بیان چندین ژن ایمنی تایید شد[۵۵].

۶-۴. پدیوکوکوس‌ها

در مطالعه ای [۵۶] مشخص شد *Pediococcus parvulus* 2.6 در شرایط آزمایشگاهی با ویبریو آنگوئیلاروم رقابت می‌کند. علاوه بر این، این سویه قادر به تولید ماده β- گلوکان بود که می تواند P.parvulus را در روده ماهی کلونیزه کند و ایمنی سلولی حیوان را تحریک کند. اثربخشی ترکیبات گلوکان ترشح شده توسط باکتری های LAB نیاز به مطالعات بیشتر دارد. در مطالعه ای توسط گونگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ سویه *P.pentosaceus* SL001 جدا شده از خاک رشد *Plesiomonas shigelloides*، اداواردزیلا تاردا، آیروموناس سوبریا، آیروموناس ورونی و آیروموناس هیدروفیلا را مهار کرد[۵۷].

۶-۵. لوکونوستوک‌ها

در چالش با عفونت آیروموناس سالمونیسیدا با تجویز *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 یک همبستگی مثبت بین کارهای درون‌تنی و برون‌تنی درسنجش زیستی مشاهده شد .همان سویه CLFP 196 نیز فعالیت آنتاگونیستی علیه یرسینا روکری عامل یرسینیوزیس ماهی نشان داد [۳۲]، اما هیچ داده‌ای در ارتباط با اثربخشی بالینی در برابر یرسینیوز ماهی وجود ندارد. در قزل‌آلای قهوه‌ای تغذیه شده با *Leuconostoc mesenteroides* به میزان 10^{6}CFU g-1 به مدت یک ماه، بعد از در معرض قرار گرفتن در برابر آیروموناس سالمونیسیدا بقای قابل توجهی (۹۱٪) در مقایسه با گروه شاهد(۶۷٪) نشان دادند. تحریک ایمنی سلولی و کلونیزاسیون پروبیوتیک در روده ماهی می تواند بخشی از دلایل چنین تفاوت‌هایی در بقای ماهیان باشد. در یک مطالعه نشان دادند *Leuconostoc mesenteroide* منشا گرفته از روده ماهی سرماری رشد آزمایشگاهی آیروموناس هیدروفیلا، سودوموناس آیروژنوزا و *Shewanella putrefaciens* را مهار می‌کند[۵۸]. *L.Leu* R.A76 *Mugil cephalus* جدا شده از مخاط پوستی ماهی کفال در برابر آیروموناس هیدروفیلا اثر مهاری نشان داد [۵۹].

۶-۶. واگوکوکوس‌ها

در مطالعه ای *Vag. fluvialis* جدا شده از دستگاه گوارش ماهی حلوا در شرایط برون‌تنی فعالیت مهاری در برابر ویبریو آنگوئیلاروم ، *Ph. damselae* subsp. piscicida و یرسینا روکری داشت اما روی *V. alginolyticus* اثر نداشت و در شرایط درون‌تنی ماهی خاردار اروپایی تغذیه شده با این پروبیوتیک به میزان 10^{9}CFU g-1 به مدت ۲۰ روز، ۸۲.۳٪ بقا پس از چالش با عفونت *V. anguillarum* در مقایسه با ۷۰٪ بقا در ماهی شاهد [۶۰] مشاهده گردید. علاوه بر این، زمانی که مخاط روده ماهی در معرض سویه پروبیوتیک قرار می‌گرفت ظرفیت چسبندگی ویبریو آنگوئیلاروم به طور قابل توجهی کاهش می‌یافت که نشان دهنده این است رقابت در چسبندگی توسط پروبیوتیک منجر به پیشگیری از کلونیزاسیون، تکثیر و نفوذ پاتوژن به بافت میزبان می‌شد. در مطالعه بعدی توسط رومن و همکاران [۶۱]، تجویز رژیم غذایی حاوی سویه *Vag. fluvialis* در ماهی سیم سرطلایی و سی باس اروپایی، افزایش ایمنی ذاتی را نشان می‌داد. پاسخ ها، نشان دهنده اثربخشی احتمالی *Vag. fluvialis* به عنوان پروبیوتیک می‌باشد.

۶-۷. انتروکوکوس‌ها

گزارشاتی رضایت‌بخش در خصوص باکتری انتروکوکوس فاسیوم Tehobak در توانایی چسبندگی به پوست و مخاط روده قزل‌آلای رنگین‌کمان و مهار رشد پاتوژن ویبریو آنگوئیلاروم، آیروموناس سالمونیسیدا و *F. psychrophilum* وجود دارد[۳۶] در شرایط آزمایشگاهی، اثر مهاری قوی انتروکوکوس گالیناروم علیه ویبریو انگوئیلاروم مشاهده شده است [۶۲]. زمانی که ماهی سی باس اروپایی با این پروبیوتیک تغذیه شد، بقای بالاتری (۷۶٪) را در چالش با ویبریو آنگوئیلاروم در مقایسه با گروه کنترل(۶۹.۳۴٪)نشان داد. که این می‌تواند به علت چسبندگی پروبیوتیک و اثر رقابتی آن با با ویبریو آنگوئیلاروم باشد اما اطلاعاتی در خصوص اثر پروبیوتیک بر پاسخ‌های ایمنی ماهی در دسترس نیست. در یک زیست سنجی آزمایشگاهی نشان داده شد که *E. faecium* SF68 به میزان10^{6}CFU /ml قادر به مهار رشد ادواردزیلا تاردا نبود. زمانی که مارماهی اروپایی با این سویه از *E. faecium* تغذیه شد، پس از چالش با ادواردزیلا تاردا بقای قابل توجهی (۷۳٪) را در مقایسه با گروه شاهد(۴۵

٪) نشان دادند [۶۳]. الجنیا و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که سه سویه از انتروکوک‌های (R.A2، R.A5 و(R.A73 جدا شده از مخاط پوست ماهی تیلاپیا رشد *A. hydrophila* تحت شرایط آزمایشگاهی مهار می کند[۵۹]، اما بررسی اثر حفاظتی در شرایط درون تنی این سویه‌های *E. faecium* نیازمند کارهای تحقیقاتی در آینده است. تاچیبانا و همکاران در سال ۲۰۲۰ با تجویز *E. faecium* در تیلاپیا و سنجش مقاومت در برابر *A. hydrophila* نشان دادند که هم دز و هم مدت زمان تغذیه پروبیوتیک بسیار مهم است[۶۴].

۶-۸. استرپتوکوک‌ها

تیلاپیا تغذیه شده با استرپتوکوکوس ترموفیلوس (به میزان $۱۰^{۷} \times ۸$ سلول در ۱۰۰ گرم جیره) به مدت ۹۸ روز، در چالش با *A. hydrophila* با میزان بقای ۸۵ درصد اختلاف ناچیزی را با گروه شاهد(میزان بقا ۸۰ درصد) نشان دادند اما زمانی که ماهی با استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به صورت ترکیبی تغذیه شدند بقا به ۱۰۰٪ افزایش یافت [۳۹]، که این نشان دهنده اثر حفاظتی بهتر توسط چند سویه نسبت به یک سویه می‌باشد.

۶-۹. بیفیدوباکتریوم‌ها

کاهش قابل توجهی در کلونیزه شدن *Ph. damsela* تحت گونه پسیسیدا، *V.alginolyticus*، *V.Harvey* و *V. Anguillarum* در ماهی سرطلایی تغذیه شده با بیفیدوباکتریوم لاکتیس گزارش شد. هنگامی که تیلاپیا با رژیم غذایی حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ($۱۰^{۷} \times ۱$ سلول در۱۰۰ گرم رژیم غذایی) به مدت ۹۸ روز تغذیه شد، در چالش با *A. hydrophila* میزان زنده مانی آنها ۱۰۰درصد بود که به طور قابل توجهی بالاتر از گروه شاهد(۸۰٪) بود [۳۹].

۶-۱۰. باسیلوس

سرکوب میکروب‌های مضر توسط باسیلوس‌های مفید به دلیل ترشح چندین ماده متابولیت از جمله لیزوزیم، پروتئازها، سیدروفورها و باکتریوسین‌ها(باسیتراسین، گرامیسیدین S، پلی میکسین و تیروتریسین) صورت می گیرد همچنین، عملکردهایی مانند رقابت برای جایابی، اخذ مواد مغذی ضروری و ایجاد نوسانات در pH به دلیل تولید اسید آلی از دیگر جنبه‌های مفید این باکتری است که نشان‌دهنده نقش مهم رقابت باکتریایی در روده ماهی است[۶۵]. باکتریوسین اصلی ترین عامل اصلی محدود کردن پیشرفت چسبندگی، کلونیزه شدن و تکثیر باکتری‌های بیماری زا در دستگاه گوارش ماهی است [۶۰]. در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی فعالیت آنتاگونیستی و ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌های گرم منفی در داخل بدن توسط جنس باسیلوس در موجودات آبزی را گزارش شده است[۱۲، ۶۶]. استفاده از باسیلوس به شکل پاراپروبیوتیک سبب بهبود وضعیت ایمنی و سلامت ماهی می‌شود به عنوان مثال، در یک مطالعه گزارش شد استفاده از *B. subtilis* AB1 به دو شکل پروبیوتیک و پارا پروبیوتیک در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت دو هفته سبب شد ماهی بقای بالاتری را در چالش با آیروموناس نشان دهد[۶۷]. تزریق داخل صفاقی اجزای سلولی(پروتئین‌های سلولی، پروتئین‌های خارج سلولی و پروتئین‌های دیواره سلولی) گونه باسیلوس به ماهی روهو سبب افزایش پاسخ های ایمنی و میزان بقای ۶۰٪ تا ۸۰٪ پس از چالش با *A. hydrophila* شد. عواملی همچون سن، گونه ماهی، وضعیت رشد، مواد غذایی موجود در رژیم، کیفیت آب و همچنین دز یا غلظت پروبیوتیک و مدت زمان تجویز بروبیوتیک می‌تواند بر عملکرد باسیلوس‌ها تاثیر بگذارد. تولید باکتریوسین، آنتی بیوتیک‌ها و آنزیم‌های لیتیکی، رقابت برای چسبندگی، رفع سیستم حد نصاب، تحریک سیستم ایمنی و بهبود کیفیت آب پرورشی از جمله روش‌های شناخته شده‌ای است که توسط پروبیوتیک‌های باسیلی استفاده می شود و این عوامل

می تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم بر کارایی پروبیوتیک‌ها تأثیر بگذارد. مقاومت‌آنتی بیوتیکی در عناصر ژنتیکی مانند پلاسمیدها به صورت افقی بین گونه‌های مختلف باکتری منتقل می‌شود[۶۸]. این مکانیسم مرتبط با عناصر ژنتیکی در باکتری‌های غیربیماری زا می تواند خطری برای سلامت انسان و حیوانات محسوب شود[۶۹]. اخیراً برخی از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در برخی از باسیل ها مانند *B. licheniformis* و *B. paraliceniformis* گزارش شده است که ممکن است باعث مقاومت یا کاهش حساسیت به آنتی بیوتیک‌های خاص شود[۷۰].

۶-۱۱. بروچتریکس

تجویز *Brochthrix thermosphacta* BA211 (به میزان 10^{10}CFU/ g) در رژیم غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت دو هفته ، با چالش ماهی با *A. bestiarum* مرگ و میر ماهی را به ۱۲ درصد می‌رساند در صورتی که در گروه شاهد ۷۸ درصد تلفات گزارش شده است[۷۱]. در اثر فعالیت این باکتری‌ها انفجار تنفسی القا شده توسط سیستم ایمنی افزایش می‌یابد.

۶-۱۲. کلستریدیوم بوتیریکوم

تجویز کلستریدیوم بوتیریکوم MIYAIRI از طریق لوله دهانی به شکل پاراپروبیوتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای سه روز متوالی و چالش با *V. anguillarum* سبب بهبود مقاومت ماهی، بهبود عملکرد لکوسیت و افزایش میزان بقای ماهی(۹۰٪ بقا) در مقایسه با گروه شاهد(۲۲٪) می‌شود. ماهیان گروه شاهد تحت درمان با آلبومین قرار گرفته بودند[۷۲]. با افزایش میزان پاتوژن، میزان بقا کاهش یافته بود، که نشان دهنده اهمیت تعیین LD50 و یا LC50 یک پاتوژن خاص در ماهی به عنوان یک معیار ضروری برای بهینه سازی دز پروبیوتیک است. سویه های کلستریدیوم بوتیریکوم CB2 بدست آمده از خاک چسبندگی بالایی در روش آزمایشگاهی نشان می‌داد. این باکتری فعالیت آنتاگونیستی قابل توجهی علیه *V. anguillarum* و *A. hydrophila* داشت. زمانی که باکتری به صورت خوراکی به شکل پروبیوتیک یا پارا پروبیوتیک به ماهی drum Chinese داده شد پاسخ‌های ایمنی و بقا در چالش با *V. anguillarum* و *A. hydrophila* افزایش یافت.

۶-۱۳. کوکوریا

در مطالعه‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت دو هفته با *Kocuria* SM1 (که از روده ماهی قزل‌آلا اخذ شده بود) مورد تغذیه قرار گرفت. در این مطالعه پس از چالش ماهی با باکتری‌های *A. anguillarum* و *V. ordalli*، میزان بقای ۸۵٪ و ۸۰٪ گزارش شد در صورتی که در گروه شاهد به ترتیب ۲۰-۲۶ درصد بقا گزارش شد [۷۳]در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که با تغذیه ماهی قزل‌آلا با پاراپروبیوتیک *Kocuria* SM1 و سپس در معرض قرار گرفتن ماهی با *V. anguillarum* میزان زنده مانی ۹۰-۷۲ درصد گزارش شد در صورتی که در گروه شاهد میزان بقا ۲۷-۸٪ بود[۷۴].

۶-۱۴. میکروکوک‌ها

افزودن *Micrococcus luteus* به رژیم غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سبب شد میزان مرگ و میر ماهیانی که در چالش با *A. salmonicida* قرار گرفته بودند کاهش یابد [۷۵]. در مطالعه عبدالرحمن و همکاران در سال ۲۰۰۹ *Micrococcus luteus* توانست *A. hydrophila* را در شرایط آزمایشگاهی کنترل کند، و زمانی که نیل تیلاپیا

با پروبیوتیک به مدت سه ماه تغذیه شد پس از چالش با *A. hydrophila* مرگ و میر ماهی از ۹۰٪ به ۲۵٪ کاهش یافت[۷۶].

۱۵-۶. رودوکوکوس‌ها

مکمل غذایی پارا پروبیوتیک *Rhodococcus* SM2 شناسایی شده در دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب شد پاسخ‌های ایمونولوژیک ماهی قزل‌آلا در برابر باکتری *V. anguillarum* بهبود یابد و بقای ماهی افزایش یابد[۷۷]. در آزمایش دیگری توسط همان نویسندگان، استفاده از ترکیبات سلول باکتری(پروتئین های سلول کامل، پروتئین های دیواره سلولی) منجر شد ایمنی ذاتی افزایش یابد و ماهی به طور قابل توجهی محافظت بهتری از خود در برابر *V. anguillarum* نشان داد [۷۷].

۹. نتیجه گیری

اثربخشی بالینی پروبیوتیک‌های گرم مثبت به عنوان عامل مقاومت در برابر بیماری در بسیاری از گونه‌های کپورماهیان، آزادماهیان و سیچلایدها ارزیابی شده است. مطالعات کمی برای بهینه سازی دز پروبیوتیک‌ها جهت کنترل پاتوژن هدف انجام شده است. همچنین، در اکثر بررسی‌ها به تعیین حداقل غلظت پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی به منظور مهار رشد (اثر باکتریواستاتیک) یا کشتن (اثر باکتریوسید) پاتوژن هدف توجهی نشده است و نیاز به انجام مطالعاتی در آینده دارد. اطلاعاتی در باره همبستگی کار در شرایط آزمایشگاهی با نتایج درون تنی وجود ندارد. نتایج اقدامات درون‌تنی را نمی توان بر اساس کار آزمایشگاهی پیش بینی کرد. پروبیوتیک‌های اندوژن ممکن است توانایی بیشتری برای چسبندگی و کلونیزه شدن در لایه‌های مخاطی حیوانات نسبت به پروبیوتیک‌های اگزوژن داشته باشند. پروبیوتیک‌های گرم مثبت اغلب به صورت جداگانه مصرف می‌شود اما گاهی اوقات ترکیب آنها ممکن است مؤثرتر باشد. سوالی که ایجاد می‌شود این است که آیا پروبیوتیک‌ها یا پاراپروبیوتیک‌ها می تواند به عنوان مواد افزودنی خوراک یا به صورت دارو و یا به صورت واکسن های خوراکی هترولوگ مرده استفاده شود. اگر پروبیوتیک‌ها تقویت کننده سیستم ایمنی بدن هستند پس چگونه می توانیم یک پروبیونت را از یک واکسن ضعیف شده زنده تشخیص دهیم. با این حال، پروبیونت‌ها می‌توانند محافظت سریع‌تری نسبت به واکسن های خوراکی ایجاد کنند. پروبیوتیک LAB به طور کلی به عنوان بی ضررشناخته شده است، اما با گسترش جهانی صنعت آبزی پروری و افزایش بیماری‌های باکتریایی گرم مثبت توسط اعضای لاکتوکوکوس، استرپتوکوک، کارنو باکتریوم و واگوکوک باید به ارزیابی ایمنی توجه زیادی کرد.

۱۲.مراجع

1. Merrifield, D.L., Balcazar, J.L., Daniels, C.L., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.Z., Hoseinifar, S.H., Ringø, E., 2014. Indigenous lactic acid bacteria in fish and crustaceans. In: Merrifield, D.L., Ringø, E. (Eds.), Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics. West Sussex, Wiley-Blackwell, pp. 128–168.
2. 2- Austin, B., Austin, D., 2016. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Disease in Farmed and Wild Fish. Springer Int. Pub., Switzerland, p. 723.
3. Chabrillon, M., Ouwehand, A.C., Diaz-Rosales, P., Arijo, S., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., 2006. Adhesion of lactic acid bacteria to mucus of farmed gilthead seabream, and interactions with fis pathogenic microorganisms. B. Eur Assoc. Fish. Pat. 26, 202–210.
4. Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M.A., Olsen, R.E., Meseguer, J., Ringø, E., 2008. In vitro studies of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis in Atlantic salmon (Salmo salar L.) foregut: tissue responses and evidence of protection against Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida epithelial damage. Vet. Microbiol. 128, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.011.
5. Zheng, C.N., Wang, W., 2017. Effects of Lactobacillus pentosus on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). Aqua. Res. 48, 2767–2777. https://doi.org/10.1111/ are.13110.
6. Kewcharoen, W., Srisapoome, P., 2019. Probiotic effects of Bacillus spp. from Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) on water quality and shrimp growth, immune H.V. Doan et al. Aquaculture 540 (2021) 73658119 responses, and resistance to Vibrio parahaemolyticus (AHPND strains). Fish Shellfish Immunol. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.013.
7. Bai, F., Yin, H., Chen, J., Zhang, X.H., 2008. Disruption of quorum sensing in Vibrio harveyi by the AiiA protein of Bacillus thuringiensis. Aquaculture 274 (1),36–40. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.024.
8. Chu, W., Lu, F., Zhu, W., Kang, C., 2011. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. J. Appl. Microbiol. 110 (1), 202–208. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04872.x.
9. Soltani, M., Lymbery, A., Song, S.K., Hossein-Shrkarabi, P., 2019a. Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. Rev. Aquac. 11, 1325–1341. https://doi.org/10.1111/raq.12295.
10. Ringø, Einar, 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. Aquac. Fish. 5 (2), 1–27. https:// doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001.
11. Ringø, E., Hoseinifar, S.H., Ghosh, K., Doan, H.V., Beck, B.R., Song, S.K., 2018. Lactic acid bacteria in finfish-An update. Front. Microbiol. 9, 1818 https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2018.01818. H.V. Doan et al. Aquaculture 540 (2021) 73658121

12. Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S.H., Kumar, V., Lymbery, A.L., Roy, S., Ringø, E., 2019. Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. Rev. Fish.

13. O'Brien, A., Sharp, R., Russell, N.J., Roller, S., 2004. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. FEMS Microbiol. Ecol.

14. Papaleo, M.C., Fondi, M., Maida, I., Perrin, E., Lo Giudice, A., Michaud, L., Mangano, S., Bartolucci, G., Romoli, R., Fani, R., 2012. Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against Burkholderia cepacia complex bacteria. Biotechnol. Adv. 30 (1), 272–293. https://doi.org/10.1016/j biotechadv.2011.06.011.

15. Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36, 1–29. https://doi.org/10.1016/S0168-1605 (96)01233-0.

16. Tran, N.T., Li, Z., Ma, H., Zhang, Y., Zheng, H., Gong, Y., Li, S., 2020. Clostridium butyricum: a promising probiotic confers positive health benefits in aquatic animals. Rev. Aquac. 12, 2573–2589. https://doi.org/10.1111/raq.12459.

17. Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., Schumann, P., 1995. Taxonomic dissection of the genus Micrococcus: Kocuria gen. nov., Nesterenkonia gen. nov., Kytococcus gen. nov., Dermacoccus gen. nov., and Micrococcus Cohn 1872 gen. emend. Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (4), 682–693. https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-682.
18. Feckaninova, A., Koscova, J., Mudronova, D., Popelka, P., Toropilova, J., 2017. The use of probiotic bacteria against Aeromonas infections in salmonid aquaculture.Aquaculture469,1–8.https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042.
19. Kim, D.-H., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) induced by probiotics. Fish Shellfish Immunol. 21, 513–524. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.02.007.
20. Bron, P.A., Tomita, S., van Swam, I.I., Remus, D.M., Meijerink, M., Wels, M., et al., 2012. Lactobacillus plantarum possesses the capability for wall teichoic acid backbone alditol switching. Microb. Cell Factories 11, 123. https://doi.org/10.1186/1475- 2859-11-123.
21. Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A.M., Cresci, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. Aquac. Int. 12, 377–386. https:// doi.org/10.1023/b:aqui.0000042141.85977.bb.
22. Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R.E., Mayhew, T.M., 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. Aquac. Res. 41, 451–467. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009. 02339.x.

23. Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., et al., 2014. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? Front. Microbiol. 5, 217. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217.
24. Wilson, B.A., Salyers, A.A., Whitt, D.D., Winkler, M.E., 2011. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. American Soc. Microbiol. (ASM), Washington. https://www. worldcat.org/title/bacterial-pathogenesis-a-molecular-approach/oclc/710835671.
25. Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R.E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H.L., Martinsen, L.L., De Schryver, P., Bossier, P., 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? Aquac. Nutr. 22, 219–282. https://doi.org/ 10.1111/anu.12346.
26. Lemos, M.L., Balado, M., 2020. Iron uptake mechanisms as key virulence factors in bacterial fish pathogens. J. Appl. Microbiol. 129 (1), 104–115. https://doi.org/ 10.1111/jam.14595.
27. Modanloo, M., Soltanian, S., Akhlaghi, M., Hoseinifar, S.H., 2017. The effects of single or combined administration of galactooligosaccharide and Pediococcus acidilactici on cutaneous mucus immune parameters, humoral immune responses and immune related genes expression in common carp (Cyprinus carpio) fingerlings.Fish Shellfish Immunol. 70, 391–397. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.032
28. Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture.FEMS Microbiol. Rev. 30, 404–427. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006. 00017.x.
29. Wang, W.Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N., Ikeda, T., 2010. AiiM a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf associated bacterium Microbacterium testaceum. Appl. Environ. Microbiol. 76 (8), 2524–2530. https://doi.org/10.1128/ AEM.02738-09.
30. Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y., Oh, T.K., 1997. Probiotic effect of Lactobacillus sp. DS12 in flounder (Paralichthys olivaceus). J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 305–308.
31. Balcazar, ´ J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, ´ O., Múzquiz, J.L., 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet. Microbiol. 122, 373–380. https:// doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.023.
32. Balcazar, ´ J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Giron´es, O., Muzquiz, J.L., 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). FEMS Immunol. Med. Mic. 51, 185–193. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007. 00294.x.
33. Balcazar, ´ J.L., Vendrell, D., Ignacio, D.B., Imanol, R.-Z.I., Josel, M., Oliva, G., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278, 188–191. https://doi.org/10.1016/j. aquaculture.2008.03.014.
34. Dhanasekaran, D., Saha, S., Thajuddin, N., Rajalakshmi, M., Panneerselvam, A., 2010.
Probiotic effect of Lactobacillus isolates against bacterial pathogens in freshwater fish. J. Coast. Develop. 13 (2), 103–112.
35. Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., Balasubramanian, T., 2014. Production,

purification, and characterization of bacteriocin from Lactobacillus murinus AU06 and its broad antibacterial spectrum. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4, S305–S311. https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C537.

36. Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A.C., 2001. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2430–2435. https://doi.org/10.1128/ AEM.67.6.2430-2435.2001.
37. Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A., Mohamed, M.F., 2008a. Studies on Bacillus subtilis and Lactobacillus acidophilus, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (Oreochromis niloticus) to challenge infections.Fish Shellfish Immunol. 25, 128–136. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013.
38. Al-Dohail, M.A., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M., 2011. Evaluating the use of Lactobacillus acidophilus as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the hematology parameters and histopathology in African catfish Clarias gariepinus juveniles. Aquac. Res. 42, 196–209. https://doi.org/10.1111/j.1365- 2109.2010. 02606.x.
39. Ayyat, M.S., Labib, H.M., Mahmoud, H.K., 2014. A probiotic cocktail as a growth promoter in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). J. Appl. Aquac. 26, 208–215. https:// doi.org/10.1080/10454438.2014.934164.
40. Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium Lactobacillus rhamnosus against experimental Edwardsiella tarda infection in tilapia (Oreochromis niloticus). Vet. Immunol.Immunopathol.113,339347https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.003.
41. Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Balasundaran, C., Heo, M.S., 2011. Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of Oplegnathus fasciatus (Temminck and Schlegel) against Edwarsiella tarda. Fish. Shellfish Immunol.30,886–893. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.013.
42. Liu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z., Zhu, Z., 2013b. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different Lactobacillus strains. Fish Shellfish Immunol. 35, 54–62. https:// doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.010.
43. Kaktcham, P.M., Temgoua, J.-B., Zambou, N.F., Diaz-Ruiz, G., Wacher, C., PerezChabela, M.L., 2017. Quantitative analyses of the bacterial microbiota of rearing environment, tilapia and common carp cultured in earthen ponds and inhibitory activity of its lactic acid bacteria on fish spoilage and pathogenic bacteria.World J.Microbiol. Biotechnol.33(2),1–12. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2197-y.
44. Kaktcham, P.M., Temgoua, J.B., Zambou, M.N., Diaz-Ruiz, G., Wacher, C., P´erezChabela, M.L., 2018. In Vitro evaluation of the probiotic and safety properties of bacteriocinogenic and non-bacteriocinogenic lactic acid bacteria from the intestines of Nile Tilapia and common carp for their use as probiotics in aquaculture.Probiotics Antimicrob. Prot.10(1),98–109. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9312-8.

45. Lin, H.-L., Shiu, Y.-L., Chiu, C.-S., Huang, S.-L., Liu, C.-H., 2017. Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch), against Aeromonas hydrophila. Fish Shellfish Immunol. 60, 474–482. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.026.
46. Aarti, C., Khusro, A., Arasu, M.V., Agastian, P., Al-Dhabi, N.A., 2016. Biological potency and characterization of antibacterial substances produced by Lactobacillus pentosus isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. SpringerPlus 5, 1743. https://doi.org/10.1186/s40064-016-3452-2.
47. Joborn, ¨ A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L., Kjelleberg, S., 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and fecal extracts by Carnobacterium sp. strain K1. J. Fish Dis. 20, 383–392. https:// doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00316.x.
48. Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., Austin, B., 2000. Use of Carnobacterium sp. as a probiotic for Atlantic salmon (Salmo salar L.) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). Aquaculture 185, 235–243. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00349-X.
49. Irianto, A., Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J. Fish Dis. 25, 333–342. https://doi.org/10.1046/ j.1365-2761.2002.00375.x.
50. Ringø, E., 2008. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. Aquac. Res. 39, 171–180. https://doi. org/10.1111/j.1365-2109.2007. 01876.x.
51. Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E., 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (Gadus morhua). Hydrobiologia 352, 279–285. https://doi.org/10.1023/A:1003052111938.
52. Balcazar, ´ J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Múzquiz, J.L., 2009. Effect of Lactococcus lactis CLFP 100 and Leuconostoc mesenteroides CLFP 196 on Aeromonas salmonicida infection in brown trout (Salmo trutta). J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 17, 153–157. https://doi.org/10.1159/000226588.
53. Fooks, L.J., Gibson, G.R., 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiol. Ecol. 39, 67–75. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00907.x.
54. Nguyen, T.L., Park, C.I., Kim, D.H., 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, Paralichthys olivaceus, by probiotic Lactococcus lactis WFLU12 isolated from wild marine fish. Aquaculture 471, 113–120. https://doi.org/10.1016/j. aquaculture.2017.01.008.
55. Sun, Y., He, M., Cao, Z., Xie, Z., Liu, C., Wang, S., Guo, W., Zhang, X., Zhou, Y., 2018. Effects of dietary administration of Lactococcus lactis HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (Cromileptes altivelis). Fish Shellfish Immunol. 82, 296–303. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.039.
56. Perez-Ramos, A., Mohedano, M.L., Pardo, M.A., Lopez, P., 2018. Beta-glucan-producing Pediococcus parvulus 2.6: test of probiotic and immunomodulatory properties in zebrafish models. Front. Microbiol. 9, 1684. https://doi.org/10.3389/ fmicb.2018.01684

57. Gong, L., He, H., Li, D., Cao, L., Ali Khan, T., Li, Y., Pan, L., Yan, L., Ding, X., Sun, Y., Zhang, Y., Yi, G., Hu, S., Xia, L., 2019. A new isolate of Pediococcus pentosaceus (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps. Front. Microbiol. https://doi. org/10.3389/fmicb.2019.01384.
58. Allameh, S.K., Daud, H., Yusoff, Y.M., Saad, C.R., Ideris, A., 2012. Isolation, identification and characterization of Leuconostoc mesenteroides as a new probiotic from intestine of snakehead fish (Channa striatus). Afr. J. Biotechnol. 11 (16), 3810–3816. https://doi.org/10.5897/AJB11.1871.
59. El-Jenia, R., El Boura, M., Calo-Matad, P., Bohmed, ¨ K., Fernandez-Nod, ´ I.C., BarrosVel´azquezd, J., Bouhaouala-Zaharb, B., 2016. In-vitro probiotic profiling of novel Enterococcus faecium and Leuconostoc mesenteroides from Tunisian freshwater fishes. Can. J. Microbiol. 62, 60–71. https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0481.
60. Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Roman, ´ L., Grasso, V., Vega, J., Real, F., 2012. Characterization of the probiotic strain Vagococcus fluvialis in the protection of European sea bass (Dicentrarchus labrax) against vibriosis by Vibrio anguillarum.Vet.Microbiol.155,369–373. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.013.
61. Roman, L., Real, F., Sorroza, L.S., Arbelo, F.A., Padilla, D., Acosta, B., Grasso, V., Bravo, J., Arbelo, F.A., 2012. The in vitro effect of probiotic Vagococcus fluvialis on the innate immune parameters of Sparus aurata and Dicentrarchus labrax. Fish Shellfish Immunol. 33 (5), 1071–1075. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.028.
62. Sorroza, L., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Deniz, S., Roman, L., El-Amari, F., Padilla, D., 2013. A probiotic potential of Enterococcus gallinarum against Vibrio anguillarum infection. Fish Pathol. 48, 9–12. https://doi.org/10.3147/jsfp.48.9.
63. Chang, C.I., Liu, W.Y., 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, Enterococcus faecium SF68 and Bacillus toyoi, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel (Anguilla anguilla). J. Fish Dis. 25, 311–315. https://doi.org/10.1046/ j.1365-2761.2002. 00365.x.
64. Tachibana, L., Tellia, L.S., Diasa, D.C., Gonçalvesb, G.S., Ishikawaa, C.M., Cavalcantea, R.B., Natoria, M.M., Hameda, S.B., Ranzani-Paivaa, M.J.T., 2020. Effect of feeding strategy of probiotic Enterococcus faecium on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. Aqua. Rep. 16, 269–280. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100277.
65. De Vrese, M., Schrezenmeir, J., 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Adv. Biochem. Eng. Bioethanol. 111, 1–66. https://doi.org/10.1007/10_2008_097.
66. Ringø, Einar, 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. Aquac. Fish. 5 (2), 1–27. https:// doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001.
67. Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. Bacillus subtilis AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). J. Appl. Microbiol. 103, 1699–1706. https://doi.org/10.1111/ j.1365-2672.2007. 03402.x.

68. Martinez, J.L., Coque, T.M., Lanza, V.F., de la Cruz, F., Baquero, F., 2017. Genomic and metagenomic technologies to explore the antibiotic resistance mobilome. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1388 (1), 26–41. https://doi.org/10.1111/nyas.13282.
69. Devirgiliis, C., Barile, S., Perozzi, G., 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. Genes Nutr. 6 (3), 275–284. https://doi.org/10.1007/s12263-011-0226-x.
70. Agersø, Y., Bjerre, K., Brockmann Johansen, E., Nielsen, B., Siezen, R., StuerLauridsen, B., Wels, M., Zeidan, A.A., 2019. Putative antibiotic resistance genes present in extant Bacillus licheniformis and Bacillus paralicheniformis strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. PLoS One 14 (1), e0210363. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210363.
71. Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., Lyndon, A.R., 2008. Efficacy of in-feed probiotics against Aeromonas bestiarum and Ichthyophthirius multifiliisskin infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). J. Appl. Microbiol. 105, 723–732. https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2672.2008. 03817.x.
72. Sakai, M., Yoshida, T., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), by oral administration of Clostridium butyricum bacterin. J. Fish Dis. 18, 187–190. https://doi.org/10.1111/ j.1365-2761. 1995.tb00276.x.
73. Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2010a. Kocuria SM1 controls vibriosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). J. Appl. Microbiol. 108, 2162–2170. https://doi. org/10.1111/j.1365-2672.2009.04618.x.
74. Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2010b. Development of protection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) to Vibrio anguillarum following use of the probiotic Kocuria SM1. Fish Shellfish Immunol. 29, 212–216. https://doi.org/10.1016/j. fsi.2010.03.008.
75. Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. 25, 633–642.https:// doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x.
76. Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E., 2009. Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Fish Shellfish Immunol. 27, 175–180. https:// doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020.
77. Sharifuzzaman, S.M., Abbass, A., Tinsley, J.W., Austin, B., 2011. Subcellular components of probiotics Kocuria SM1 and Rhodococcus SM2 induce protective immunity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) against Vibrio anguillarum. Fish Shellfish Immunol. 30, 347–353. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.005.