

ชื่อโครงการ “การแยกหาและศึกษาเชื้อซึ่งแสดงศักยภาพแบคทีเรียโปรไบโอติก ที่สามารถยับยั้งโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลานิล

Isolation and study of the potential probiotic bacterial strains which capable of
inhibiting bacterial infection in Nil fish (*Tilapia oreochromis*)

เสาวนิต ทองพิมพ์ *¹⁾ พิชานิกา ชอบจิตต์ ¹⁾ และ สมพงษ์ ดุลย์จินดาชบาพร ²⁾

- 1) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น * Email: saoton@kku.ac.th
- 2) ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น จากปลานิลที่มีลักษณะปกติ น้ำและโคลนบริเวณกระชังที่เลี้ยงปลานิล และจากอาหารหลายชนิด เช่น ผลิทดักหน่มเปรี้ยว ข้าวและอาหารหมักดองทางภาคอีสาน นำแบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้มาคัดเลือกว่าเชื้อที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาโดยใช้เทคนิค agar-overlaying และ well-diffusion พบแบคทีเรีย 25 ไอโซเลทซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ที่ดีคือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* และ *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล จากนั้นได้เลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ไอโซเลท CR1T5 มาใช้ในการทำ “challenged test” ซึ่งพบว่าเชื้อ CR1T5 สามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้และยังช่วยส่งเสริมการเจริญของปลานิลอีกด้วย จากการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การย้อมติดสีแกรม และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ พบว่าไอโซเลท CR1T5 อยู่ในสกุลบาซิลลัส โดยมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

คำสำคัญ (Keywords): โปรไบโอติก แลคโตบาซิลลัส ปลานิล โรคติดเชื้อในปลา

1. บทนำ

แบคทีเรียโปรไบโอติกหมายความว่าแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ (host) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่เชื้อนั้นอาศัยอยู่ โดยเชื้อโปรไบโอติกส์จะไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคและ/หรือช่วยส่งเสริมการเจริญของโฮสต์ (Fuller, 1989) มีรายงานถึงเชื้อแบคทีเรียในสกุลต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เช่น *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* และ *Saccharomyces* เป็นต้น (Gatesoupe, 1999; Burnett and Neil, 1977; Villamil et. al., 2003) ได้มีการนำเชื้อโปรไบโอติกส์ไปใช้อย่างได้ผลในวงการปศุสัตว์ เช่น ฟาร์มโค สุกร และไก่ (Alder and Damassa, 1980; Pollman et. al.,

1980) ซึ่งพบว่าเชื้อโปรไบโอติกส์ช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์และทำให้สัตว์แข็งแรงมีภูมิต้านทานการติดเชื้อก่อโรคได้

ปัจจุบันจากการที่ประชากรโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้มีความต้องการอาหารเพิ่มมากขึ้นด้วยสัตว์น้ำที่จับได้ในธรรมชาติจึงมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค ทำให้จำเป็นต้องพึ่งพาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อให้ได้ผลผลิตมากพอ และได้เริ่มมีการนำเอาเชื้อโปรไบโอติกส์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Gomez-Gil et. al., 2000; Gram et. al., 1999; Robertson et. al., 2000; Gatesoupe, 1999)

ในประเทศไทยนั้นการเลี้ยงปลาในกระชังกำลังเป็นอาชีพที่นิยมในหมู่เกษตรกร โดยในเขตจังหวัดขอนแก่นนั้นเกษตรกรได้ทำการเลี้ยงปลานิลในกระชังตามลำน้ำพอง และปัญหาที่พบบ่อยได้แก่ปลาในกระชังมักอ่อนแอและป่วยจากการติดเชื้อจนตายลงเป็นจำนวนมาก เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารให้ปลากินเพื่อป้องกันการติดเชื้อ ซึ่งนอกจากจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายแล้ว การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานจะส่งผลให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาและมียาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อปลาที่นำไปบริโภคได้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจแยกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกเพื่อใช้ผสมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิล เพื่อให้สามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในปลานิลและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 เชื้อก่อโรคปลานิล

เชื้อก่อโรคปลานิลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 3 เชื้อได้แก่ *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* และ *Streptococcus* sp. ซึ่งเก็บรักษาอยู่ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.2 การแยกหาเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก

2.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารประเภทหมักดอง ได้แก่ โยเกิร์ต ยาคุลท์ แหนม ม้า ปลาจ่อม ผักกาดดอง นำมาทำ dilution plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ส่วนตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ ข้าว ปลานิลที่มีลักษณะปกติ ดิน น้ำ และโคลนจากบริเวณกระชังเลี้ยงปลานิลนั้นนำมาทำ dilution plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion (BHI) agar โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะต่างๆ กันไว้เพื่อใช้คัดเลือกหาเชื้อโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้งโรคติดเชื้อในปลานิลต่อไป

2.2.2 การคัดเลือกเชื้อที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคปลานิล

นำเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่มีลักษณะโคโลนีต่างๆ กันมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคปลาทั้ง 3 ชนิด (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *Streptococcus* sp.) ด้วยวิธี agar-overlaying โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ลงบน BHI agar plate จากนั้นทำการเททับผิวหน้า plate ด้วยเชื้อก่อโรคที่ผสมอยู่ใน BHI agar medium นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หรือไม่ โดยดูจากโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของเชื้อที่แยกได้

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อที่แยกได้ในกการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคปลาโดยวิธี well-diffusion ด้วย โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ใน BHI broth จนเชื้อเข้าสู่ stationary growth phase ทำการเตรียมเชื้อก่อโรคปลาโดยผสมซัสเพนชันของเชื้อก่อโรคลงใน BHI soft agar หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวแล้ว เจาะหลุมด้วย cork borer จากนั้นนำซัสเพนชันของเชื้อที่เจริญอยู่ใน BHI broth มาใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนตรวจสอบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หรือไม่ โดยสังเกตจากโซนใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมที่เจาะไว้

2.3 การศึกษาจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อโปรไบโอติกที่แยกได้

ทำการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อโปรไบโอติกที่แยกได้โดยตรวจสอบลักษณะของโคโลนี รูปร่างและการติดสีย้อมแบบต่างๆ ของเซลล์ การเคลื่อนที่ การสร้างเอนโดสปอร์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ เปรียบเทียบกับคุณลักษณะที่ตีพิมพ์ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

2.4 การทำ “challenged test”

ในการทดลองใช้ลูกปลาซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 44 กรัม โดยแบ่งลูกปลาออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปลาปกติ ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารปลาที่ผสมเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในความเข้มข้น 1.2×10^8 เซลล์ต่อกรัมของอาหารปลา

เป็นเวลา 15 วัน ก่อนนำมาทำ “challenged test” ด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดในปริมาณ 3.1×10^6 เซลล์ เข้าใต้ผิวหนังตรงบริเวณกล้ามเนื้อเหนื่อเส้นข้างตัวปลา (lateral line) ตรวจผลการทดลองโดยวัดขนาดและน้ำหนักของปลา และเฝ้าสังเกตอาการป่วยและตายของปลา โดยในส่วนของปลาที่ตายจะนำไปผ่าพิสูจน์รวมทั้งทำการแยกเชื้อจากอวัยวะภายในของปลาที่ตายด้วย

3. ผลการทดลอง

3.1 การแยกหาแบคทีเรียโปรไบโอติก

ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากอาหารหมักดองได้แก่ โยเกิร์ต ยาจุลท์ แหนม ม้า ปลาร้า ปลาจ่อม ผักกาดดอง และจากข้าว ปลานิลที่มีลักษณะปกติ ดิน น้ำ และโคลนจากบริเวณกระชังเลี้ยงปลานิล แยกได้เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่างๆ กันทั้งหมด 107 ไอโซเลท แต่มีเพียง 25 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ โดยทั้งหมดเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อโปรไบโอติก

ชนิดของอาหาร	จำนวนไอโซเลทที่พบ
แหนมหมู	2
แหนมเนื้อ	3
ม้า	3
ปลาร้า	3
ปลาจ่อม	2
ผักกาดดอง	2
ยาจุลท์	2
โยเกิร์ต	6
ข้าว	2

จากเชื้อที่แสดงศักยภาพเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก 25 ไอโซเลทที่แยกได้ ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมารับ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลท CR1T5 ซึ่งแยกได้จากข้าวเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษาบ่งชี้ชนิดของเชื้อโปรไบโอติก

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อ CR1T5 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จะให้ลักษณะโคโลนีโค้งนูน สีขาวขุ่น ทึบแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ผิวมัน ขอบเรียบ เมื่อนำเซลล์มาทำการย้อมสี พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ จากนั้นนำเชื้อมาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

จากการนำลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไปเทียบกับคุณลักษณะของแบคทีเรียที่ได้ตีพิมพ์ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology สามารถบ่งชี้ได้ว่าไอโซเลท CR1T5 คือเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

3.3 การศึกษา “challenged test”

ลูกปลาซึ่งใช้ในการทดลองนี้มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 43.9 กรัม และมีความยาวเฉลี่ยจากปลายปากถึงปลายครีบกหาง 13.5 เซนติเมตร เลี้ยงในตู้เลี้ยงปลา 2 ตู้ โดยตู้ที่ 1 มีปลา 11 ตัวซึ่งให้อาหารปลาปกติ ในขณะที่ตู้ที่ 2 มีปลา 12 ตัวและให้อาหารปลาที่ผสมเชื้อ *L. plantarum* CR1T5 ที่มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติก 1.2×10^8 เซลล์ต่อกรัมของอาหารปลา ทำการเลี้ยงปลาเป็นเวลา 15 วัน แล้วจึงทำการตรวจวัดน้ำหนักและความยาวของปลาในแต่ละตู้ ซึ่งพบว่าปลาในตู้ที่ให้อาหารผสมเชื้อ CR1T5 มีเจริญเติบโตได้ดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับเชื้อโปรไบโอติก ซึ่งเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักและความยาวเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 3

หลังจากนั้นจึงทำการฉีดเชื้อก่อโรคปลาทั้ง 3 ชนิดในปริมาณ 3.1×10^6 เซลล์ เข้าใต้ผิวหนังตรงบริเวณกล้ามเนื้อเหนื่อเส้นข้างตัวปลาทั้ง 2 ตู้ ทำการเลี้ยงปลาต่อไปด้วยอาหารที่ผสมและไม่ผสมเชื้อโปรไบโอติกดังกล่าวมาแล้วข้างต้นเป็นเวลาอีก 20 วัน โดยในแต่ละวันเฝ้าสังเกตและบันทึกอาการป่วยและตายของปลาในแต่ละตู้

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อโปรไบโอติก CR1T5

ชนิดการทดสอบ	ผลการทดสอบ
Catalase test	-
Oxidase test	-
Motility	-
Strictly aerobe	-
Facultatively anaerobe	+
Growth at 10°C	+
Growth at 15°C	+
Growth at 37°C	+
Growth at 45°C	+
Growth in 2% NaCl	+
Growth in 3% NaCl	+
Growth in 4% NaCl	+
Growth in 6.5% NaCl	+
Esculin hydrolysis	+
Acid production from:-	
Lactose	+
Glucose	-
Galactose	+
Sucrose	+
Fructose	+
Sorbitol	+
Mannose	+
Melibiose	+
Raffinose	+
Xylose	-
Arabinose	+
Melezitose	+
Gas production from glucose	-

พบว่าหลังจากฉีดเชื้อก่อโรค ปลาในแต่ละตู้ตายลงในวันรุ่งขึ้นตั้งแต่ 1 ตัว หลังจากทำการเลี้ยงต่อไปพบว่าปลาที่ให้อาหารผสมเชื้อ CR1T5 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดังปกติ คิดเป็นอัตราการตายเพียง 8.3% ในขณะที่ปลาที่ให้อาหารปกติทยอยแสดงอาการป่วยและ

ตาย จนเหลือรอดชีวิตเพียงตัวเดียวคิดเป็นอัตราการตาย 90.1% หลังจากเลี้ยงปลาต่อมาครบ 20 วัน

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของปลา

ชนิดอาหารที่ใช้เลี้ยงปลา	น้ำหนักปลาเพิ่มขึ้น (%)	ความยาวปลาเพิ่มขึ้น (%)
อาหารปกติ	27.2	8.7
อาหารผสมเชื้อ CR1T5	75.2	20.7

จากการนำปลาที่ป่วยตายมาผ่าซากพิสูจน์ (ยกเว้นปลาที่ตายหลังจากฉีดเชื้อก่อโรคเพียง 1 วัน) พบว่าอวัยวะภายในของปลาผิดปกติไป โดยตับ ม้าม ไต มีสีซีดจางลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วนหัวใจซึ่งปกติมีสีแดงสดจะเปลี่ยนเป็นสีแดงคล้ำ เมื่อทำการแยกเชื้อจากตับไต และหัวใจมาตรวจสอบ พบการติดเชื้อในอวัยวะทั้ง 3 นี้จากแบคทีเรียก่อโรคที่ได้ฉีดให้ปลา

4. อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองแยกหาแบคทีเรียโปรไบโอติกจากตัวอย่างชนิดต่างๆในครั้งนี้อย่างไรก็ตาม เราได้มาจากตัวอย่างอาหารที่เราใช้บริโภคทั้งสิ้น ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในการที่จะนำเชื้อนี้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยไม่ต้องกังวลว่าจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคสัตว์น้ำนั้นในภายหลัง โดยที่ไอโซเลท CR1T5 ซึ่งคัดเลือกนำมาศึกษาในครั้งนี้อยู่ในสกุลบาซิลลัส ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคและได้ถูกจัดไว้ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ ("GRAS", Generally Recognized As Safe) (Sanders and Veld, 1999) จากการศึกษาจำแนกชนิดเชื้อคาดว่าไอโซเลท CR1T5 ได้แก่เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งมีรายงานถึงการนำเชื้อนี้ไปใช้เป็นโปรไบโอติกในด้านเภสัชกรรม (Kaur et. al., 2002) และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Gatesoupe, 1991)

เชื้อไอโซเลท CR1T5 ที่แยกได้นี้ไม่เพียงแต่จะช่วยป้องกันปลานิลที่ใช้ทดสอบจากการติดเชื้อก่อโรค

เท่านั้น แต่ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของลูกปลาอีกด้วย (ดูตารางที่ 2) ดังจะเห็นได้จากน้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของลูกปลาที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นเชื้อ CR1T5 จึงมีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาใช้เป็นอาหารเสริมของปลานิลต่อไป

5. สรุปผลการทดลอง

จากการแยกหาเชื้อโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลานิลจากเชื้อสาเหตุ *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* และ *Streptococcus* sp. ในครั้งนี้แยกได้เชื้อ 25 ไอโซเลท โดยเชื้อ 1 ไอโซเลทที่นำมาศึกษาต่อนั้นพบว่าอยู่ในสกุลบาซิลลัส ซึ่งมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* โดยพบว่าเชื้อนี้นอกจากจะช่วยป้องกันโรคติดเชื้อในปลานิลได้ดีแล้ว ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของปลานิลอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงการอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาดุษฎี ประจำปี 2546 ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย รวมถึงคุณวันชัย หินทอง แห่งบริษัทพีเอ็มเอ จำกัดที่ร่วมอภิปรายและให้ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับอาหารเสริมในสัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Alder, H. E.; Damassa, A. J. Effects of ingested lactobacilli on *Salmonella infantis* and *Escherichia coli* and on intestinal flora, pasted vent and chick growth. *Avian Diseases*. **1980**, 24, 868-878.

Burnett, G. S.; Neil, E. L. A note on the effect of probioticum feed additive on the live-weight

gain, feed conversion and carcass quality of bacon pig. *Anim. Prod.* **1977**, 25, 95-98.

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

Gatesoupe, F. J. The effect of three strains of lactic on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*. **1991**, 96, 335-342.

Gatesoupe, F. J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. **1999**, 180, 147-165.

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

Gram, L.; Melchiorson, J.; Spanggaard, B; Huber, I; Nielsen, T. F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 969-973.

Kaur, I. P.; Chopra, K.; Saini, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 15, 1-9.

Pollman, D. S.; Danielson, D. M.; Peo, E. R. Effect of microbial feed additive on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **1980**, 51, 577-581.

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

Sanders, M. E.; Veld, J. H. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product regulatory and

labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*.

1999, 76, 293-315.

Villamil, L.; Figueras, A; Planas, M; Novoa, B.

Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia*
culture by treatment with bacterial probiotics.

Aquaculture. **2003**, 219, 43-46.