

**STRATEGI BAKTERI PROBIOTIK UNTUK MENEKAN PERTUMBUHAN BAKTERI
PATOGEN DIDALAM PENCERNAAN KERAPU *Chromileptes altivelis* DENGAN
MEMPRODUKSI BEBERAPA BAKTERIAL SUBSTANSI**

**PROBIOTIC BACTERIA STRATEGY FOR DEPRESSING PATOGENIC BACTERIA
GROWTH IN DIGESTION OF GROUPEL FISH (*Chromileptes altivelis*) WITH PRODUCING OF
SUBSTANCY BACTERIAL**

Agustono, Hari Suprpto dan Muhajir

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

The aim of the research is looking for probiotic bacteria strategy for depressing the growth of pathogenic bacteria in digestion of grouper fish. Some of anti bacteria can be produced by bacteria, such as protease, bacteriocin (germicidine, pyrocyclin), amilase lipase, and lysozym. In this case, *Bacillus* sp. is chosen because it can produce antibacteria against *Vibrio* sp. and probiotic multifactor effect, that is enzyme production and competition of nutrient and space.

Keywords : probiotic bacteria, grouper, pathogenic

Pendahuluan

Probiotik menurut Parker (1974) adalah organisme atau substansi yang mendukung keseimbangan jumlah mikro-organisme dalam pencernaan ikan atau kerapu. Pada stadia larva, ikan sudah hidup di lingkungan yang banyak sekali bakteri patogen, pada waktu tersebut saluran pencernaan dan sistem immune belum berkembang sehingga sebetulnya bakteri probiotik sangat diperlukan pada waktu stadia larva (Vadstein, 1977). Gram negatif facultatif anaerob banyak terdapat pada saluran pencernaan ikan dan kerang-kerangan, sehingga simbiosis anaerob kemungkinan dominan pada intestine bagian belakang ikan tropis herbivor (Clement, 1997). *Vibrio* dan *Pseudomonas* adalah bakteri yang umum dijumpai pada crustacea (Moriarty, 1990), ikan laut (Sakata, 1990) dan kerang-kerangan (Prieur, et al., 1990). Sedangkan *Aeromonas*, *Plesiomonas* dan bakteri Enterobacteriaceae dominan pada ikan air tawar (Sakata, 1990). Bakteri pada manusia dan hewan umumnya bersifat menetap pada saluran pencernaan manusia dan mamalia, sedangkan hanya sementara pada ikan dan mikroorganisme air (Moriarty, 1990). Ikan adalah poikilothermic sehingga jumlah mikroba akan berhubungan dengan suhu air (Lesel, 1990). Perubahan salinitas juga mempengaruhi mikroba (Hamid et al., 1978; Sakata et al., 1980; Ringo and Storm, 1993) dan ikan laut harus minum supaya air tidak hilang dari tubuh. Aliran air yang terus menerus mempengaruhi medium disekeliling-

nya, misalnya pada yang terjadi pada filter feeder seperti bivalve, larva kerapu. Hal tersebut penting pada larva karena belum adanya gastric barrier. Sehingga mikroflora yang ada di pencernaan kemungkinan berubah dengan cepat dengan adanya intrusi bakteri dari makanan dan air. Pada bivalve, mikroflora yang ditemukan sama dengan yang terdapat pada air laut dan sediment (Sugita et al., 1981; Prieur et al., 1990). Bakteri yang sama juga ditemukan pada *Penaeus japonicus* dan di air laut, tetapi normal mikroflora kemungkinan masuk lewat pakan (Moriarty, 1990). Sedangkan pada larva dan juvenil ikan pengaruh makanan terhadap masuknya bakteri ke saluran pencernaan telah diketahui (Ringo et al., 1995). Bakteri yang masuk ke saluran pencernaan lewat pakan luar biasa jumlahnya pada waktu pemberian pakan pertama kali (Munro et al., 1993; Bergh et al., 1994).

Mikroorganisme yang bersifat sementara pada ikan dapat digunakan untuk memperbaiki kondisi kolam, bahkan Moriarty (1998) menyebutkan probiotik sebagai "water additives", tetapi definisi yang sebenarnya adalah bakteri yang dimasukkan dengan berbagai macam cara kedalam saluran pencernaan dan tetap hidup untuk memperbaiki kesehatan. Pada tahun 1991 Porubcan mencoba dua cara untuk memperbaiki kualitas air dan produksi kerapu *P.monodon*. Cara yang pertama adalah biofilter yang mengambang diinokulasi dengan nitrifying bacteria untuk mengurangi jumlah ammonia dan nitrit pada air, treatment

seperti ini menambah kelangsungan hidup kerapu (Porubcan, 1991a). Kedua adalah menambahkan bakteri *Bacillus* spp ke dalam kolam dekat dengan aerator untuk mengurangi penggunaan oksigen dan menambah produksi kerapu (Porubcan, 1991b). Pada umumnya yang disebut probiotik komersial adalah mengandung bakteri nitrifikasi dan *Bacillus* spp. Kedua bakteri tersebut sangat berbeda, nitrifikasi bakteri membutuhkan lingkungan yang sebenarnya dan belum pernah ditemukan di saluran pencernaan dari hewan. *Bacillus* spp dipakai probiotik untuk mammalia hidup pada tanah dan mereka tidak menetap pada saluran pencernaan, hanya aktif pada selama transit di saluran pencernaan (Ghounier-Chateau, 1994). Selanjutnya mereka melaporkan banyak mengisolasi *Bacillus* spp dari ikan (Hamid *et al.*, 1978), crustacea (Sharmila *et al.*, 1996), bivalve (Sugita *et al.*, 1981). Queiroz dan Boyd (1998) melaporkan bahwa *Bacillus* spp dapat meningkatkan survival dan produksi channel catfish, tetapi pengarang tersebut menitik beratkan pada kualitas air yang dikondisikan sangat buruk dengan perlakuan. Kennedy (1998) mengisolasi strain *Bacillus subtilis* dari ikan snook *Centromopus undecimalis*. Inokulasi dari strain tersebut ke dalam air pemeliharaan menghilangkan *Vibrio* sp dari semua lava snook sesudah menurunkan salinitas 30-3 ‰. Moriarty (1998) juga melaporkan bahwa pemberian *Bacillus* sp bisa meningkatkan survival pada kolam kerapu. Dengan treatment tersebut dapat menurunkan jumlah luminous *Vibrio* sp pada sediment dan air, walaupun efek terhadap mikroflora pada intestine tidak dipelajari. *Bacillus* sp tersebut dipilih karena memproduksi antibiotik untuk melawan *Vibrio* sp, tetapi mereka menitik beratkan pada efek multifaktor probiotik misalnya produksi enzim, kompetisi untuk nutrisi dan ruang. Beberapa mekanisme tersebut kemungkinan mencegah berbiaknya strain yang resisten terhadap antibiotik. Data yang sesungguhnya Moriarty (1998) menunjukkan bahwa *Bacillus* spp mempunyai aksi penghambatan terhadap luminous *Vibrio* sp pada kolam sedimen, tetapi survival kerapu kemungkinan bisa disebabkan oleh efek probiotik atau efek yang tidak langsung pada kesehatan kerapu.

Metodologi

Isolasi bakteri

Bakteri diisolasi dari kerapu, larva dan air pemeliharaan dengan prosedur sebagai berikut. Sepuluh sampel yang masing-masing diambil dari kerapu (hepatopancreas/HP, intestine), larva dan

air pemeliharaan. Larva yang berjumlah 10 sampel dengan berat masing-masing 0.1 g, HP dan intestine dengan berat yang sama kemudian digerus tersendiri pada mortar 0.9 ml air laut steril. Kemudian diambil sebanyak 0.1 ml dan diencerkan berseri 10 kali dan ditanam pada Marine Agar 2216 (MA, Difco Laboratories). Air laut yang tidak diencerkan dan diencerkan 10 kali ditanam pada medium yang sama. Sesudah inkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam, bakteri yang bersifat swarming (tumbuh menyebar) akan tumbuh pada plate, dan koloni yang membentuk zona terang (clear zone) yang mempunyai daya inhibisi (penghambat) terhadap bakteri swarming diambil untuk ditanam lagi agar dapat koloni murni. Bakteri yang didapatkan diinokulasi pada media MA semisolid dan disimpan pada suhu 20°C untuk penelitian lebih lanjut.

Identifikasi bakteri

Bakteri yang sudah didapatkan kemudian diidentifikasi untuk mengetahui strain bakteri tersebut. Sebagai pembanding didapatkan adalah Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Strain bakteri yang didapatkan atau yang telah teridentifikasi kemudian disimpan dengan glycerol pada suhu -20°C dan diberi label untuk penelitian berikutnya.

Strain *Vibrio* untuk penelitian

Lima strain bakteri *Vibrio* sp telah diisolasi dan diidentifikasi dan dibandingkan dengan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Bakteri tersebut diisolasi dari air pemeliharaan ikan dan dari HP kerapu. Kemudian bakteri tersebut disimpan dengan glycerol dan disimpan pada -20°C sampai untuk digunakan. Pada waktu akan digunakan bakteri dithawing dulu pada suhu kamar selama 1 jam kemudian diinokulasikan pada MA.

Tes penghambatan

Bakteri antiswarming yang didapatkan dilakukan testing untuk mengetahui kemampuannya dalam menghambat strain *Vibrio* sp dengan metode double-layer plate (Imada *et al.*, 1985; Dopazo *et al.*, 1988). Plate MA diinokulasi dengan cara stabbing (ditusukkan) dengan bakteri antiswarming, setiap plate bisa diinokulasi sampai 7 strain. Sesudah inkubasi pada suhu 30°C selama 4 hari, bakteri dibunuh dengan menggunakan uap chloroform selama 10 menit dan ditumpang (overlay) MA yang mengandung sedikit dari *Vibrio* sp. Plate kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Zona terang akan didapatkan sekitar koloni dari bakteri yang memproduksi antibiotik.

Identifikasi dan tes terhadap bakteri yang memproduksi antibiotik

Strain yang telah diketahui mempunyai daya hambat terhadap bakteri *Vibrio* sp kemudian dilakukan identifikasi untuk mengetahui karakteristiknya. Semua dilakukan pada suhu 30°C, semua karakter bakteri termasuk koloni, morfologi, pengecatan gram, produksi pigmen, motilitas, flagella, produksi oksidase dan katalase, tes OF, produksi nitrat, pertumbuhan pada suhu 4 dan 30°C, penggunaan sitrat dan pertumbuhan pada air laut. Produksi lipase, amylase, gelatinase, deoksiribonuclease juga diuji. Kemampuan menggunakan berbagai bahan organik sebagai sumber karbon diuji dengan menggunakan basal medium agar yang mengandung 0.2 % gula (Krieg and Holt, 1984).

Hasil dan Pembahasan

Studi pendahuluan tentang bakteri probioitik telah dilakukan pada untuk mendapatkan bakteri yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan *Vibrio* sp, dan bakteri pathogen lainnya mengurangi jumlah bahan organik di kolam budidaya ikan dan kerapu kerapu. Kerugian dari industri perikanan tahun 1989-1992 9(dalam kurun 4 tahun) sebesar 248 juta USD atau 62 juta USD per tahun dan enam tahun kemudian pada tahun 1998 dengan total kerugian senilai 318 juta USD per tahun. Penelitian ini dilakukan berdasarkan kegagalan budidaya kerapu *C. altivelis* dan bberapa komoditas lainnya akibat bakteri *Vibrio* sp dan mendesak dilakukan karena untuk mencega, kegagalan budidaya kerapu dan menjaga kelangsungan ekspor kerapu Indonesia, meningkatkan pendapatan petani ikan dan mengurangi pengangguran yang terus meningkat setiap tahunnya.

Berdasarkan hasil yang didapatkan bakteri yang diisolasi adalah *Bacillus* sp dan *Aalteromonas* sp dan beberapa bakteri lain yang merupakan bakteri asli yang mempunyai daya penghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp dan mampu mengurangi polutan di kolam serta

mengurangi jumlah bakteri patogen di intestine kerapu. Jika bacterial load pada kolam tinggi selain menimbulkan Bacterial White Spot Syndrome (BWSS) walaupun tidak merugikan/mematikan kerapu/ikan tetapi membuat organoleptik ikan menjadi buruk dan juga menurunkan ketersediaan oksigen yang ada dan menjadikan ikan rentan terhadap penyakit dan perubahan alam lainnya.

Probiotik mempunyai peran sangat penting didalam ekosistem tambak, karena mempunyai beberapa fungsi yang tidak bisa digantikan bakteri lain. Bakteri yang bisa memproduksi substansi mirip antibiotik sangat diperlukan didalam ekosistem tambak karena pertumbuhan bakteri ini bisa menekan bakteri patogen dengan cara berkompetisi untuk mendapatkan makanan dan ruang untuk ikan dan kerapu dengan cara memproduksi suatu substansi yang dapat menghambat atau membunuh patogen lain. Bakteri in bisa digunakan untuk mengurangi penggunaan antibiotik didalam budidaya ikan yang tidak meninggalkan residu yang berbahaya dan bias digunakan untuk menjaga keseimbangan flora atau jenis dan jumlah bakteri yang berada didalam air sehingga ikan atau kerapu terhindar dari infeksi yang mematikan.

Salah satu cara untuk mendapatkan panen kerapu yang banyak dalam jangka waktu yang singkat adalah memakai teknik budidaya intensif walaupun banyak kendalanya. Karena semakin tinggi padat penebaran yang digunakan menyebabkan stress pada ikan yang akhirnya menyulut terjadinya penyakit. Dewasa ini karena permintaan yang banyak penggunaan budidaya intensif merupakan keharusan, tanpa ini pemenuhan permintaan sulit dipenuhi. Misalnya untuk budidaya ikan kerapu Ikan kerapu *Chromileptes altivelis* yang merupakan warmwater fish dengan suhu optimal 20 - 30°C bisa hidup pada air dan laut. Indonesia merupakan negara produsen kerapu terbanyak didunia dengan produksi 41.000 MT pada tahun 1995. Atau 90 persen hasil tersebut dari

Tabel 1. Substansi Antibakteri Yang Dihasilkan Dan Spesies Bakterinya

Nama Bakteri	Subtansi antibakteri yang diproduksi
<i>Bacillus brevis</i>	Protease, bacteriocin (germicidine dan pyrocydin)
<i>Bacillus circulans</i>	Protease, bacteriocin (circulin)
<i>Bacillus coagulanss</i>	Protease, dan bacteriocins
<i>Pseudomonas spp.</i>	Protease, amilase lipase
<i>Pseudomona putida</i>	Protease, amilase lipase
<i>Pseudomonas mallei</i>	Protease, amylase, lipase
<i>Pseudomonas spp.</i>	Protease, amylase, lipase
<i>Pseudomonas maltophillia</i>	Protease, amylase, lipase
<i>Corynebacterium</i>	Bacteriocyn, lysozym
<i>Corynebacterium boffmani</i>	Bacteriocyn, lysozym

tangkapan di alam dan ini harus disertai dengan produksi buatan. Bobot ikan konsumsi adalah 0.5 – 2 kg/ekor dan berharga sangat mahal. Jika *Vibrio* sp. menimbulkan penyakit pada kerapu, kemungkinan disebabkan defense mechanism menurun, karena dalam keadaan stress produksi antibody dan aktifitas phagocytosis terganggu.

Moriarty (1998) juga melaporkan bahwa pemberian *Bacillus* sp bisa meningkatkan survival pada kolam kerapu. Dengan treatment tersebut dapat menurunkan jumlah luminous *Vibrio* sp pada sediment dan air, walaupun efek terhadap mikroflora pada intestine tidak dipelajari. *Bacillus* sp tersebut dipilih karena memproduksi antibiotik untuk melawan *Vibrio* sp, tetapi mereka menitik beratkan pada efek multifaktor probiotik misalnya produksi enzim, kompetisi untuk nutrisi dan ruang. Beberapa mekanisme tersebut kemungkinan mencegah berbiaknya strain yang resisten terhadap antibiotik. Data yang sesungguhnya Moriarty (1998) menunjukkan bahwa *Bacillus* spp mempunyai aksi penghambatan terhadap luminous *Vibrio* sp pada kolam sedimen, tetapi survival kerapu kemungkinan bisa disebabkan oleh efek probiotik atau efek yang tidak langsung pada kesehatan kerapu

Probiotik menurut Parker (1974) adalah organisme atau substansi yang mendukung keseimbangan jumlah mikroorganisme dalam pencernaan ikan atau kerapu. Pada stadia larva, ikan sudah hidup di lingkungan yang banyak sekali bakteri patogen, pada waktu tersebut saluran pencernaan dan sistem immune belum berkembang sehingga sebetulnya bakteri probiotik sangat diperlukan pada waktu stadia larva (Vadstein, 1977). Gram negatif facultatif anaerob banyak terdapat pada saluran pencernaan ikan dan kerang-kerangan, sehingga simbiosis anaerob kemungkinan dominan pada intestine bagian belakang ikan tropis herbivor (Clement, 1997). *Vibrio* dan *Pseudomonas* adalah bakteri yang umum dijumpai pada crustacea (Moriarty, 1990), ikan laut (Sakata, 1990) dan kerang-kerangan (Prieur, et al., 1990). Sedangkan *Aeromonas*, *Plesiomonas* dan bakteri Enterobacteriaceae dominan pada ikan air tawar (Sakata, 1990).

Bakteri pada manusia dan hewan umumnya bersifat menetap pada saluran pencernaan manusia dan mamalia, sedangkan hanya sementara pada ikan dan mikroorganisme air (Moriarty, 1990). Ikan adalah poikilothermic sehingga jumlah mikroba akan berhubungan dengan suhu air (Lesel, 1990). Perubahan salinitas juga mempengaruhi mikroba (Hamid et al., 1978; Sakata et al., 1980; Ringo and Storm, 1993) dan ikan laut harus minum supaya air

tidak hilang dari tubuh. Aliran air yang terus menerus mempengaruhi medium disekelilingnya, misalnya pada yang terjadi pada filter feeder seperti bivalve, larva kerapu. Hal tersebut penting pada larva karena belum adanya gastric barrier. Sehingga mikroflora yang ada di pencernaan kemungkinan berubah dengan cepat dengan adanya intrusi bakteri dari makanan dan air. Pada bivalve, mikroflora yang ditemukan sama dengan yang terdapat pada air laut dan sediment (Sugita et al., 1981; Prieur et al., 1990). Bakteri yang sama juga ditemukan pada *Penaeus japonicus* dan di air laut, tetapi normal mikroflora kemungkinan masuk lewat pakan (Moriarty, 1990). Sedangkan pada larva dan juvenil ikan pengaruh makanan terhadap masuknya bakteri ke saluran pencernaan telah diketahui (Ringo et al., 1995). Bakteri yang masuk ke saluran pencernaan lewat pakan luar biasa jumlahnya pada waktu pemberian pakan pertama kali (Munro et al., 1993; Bergh et al., 1994) Mikroorganisme yang bersifat sementara pada ikan dapat digunakan untuk memperbaiki kondisi kolam, bahkan Moriarty (1998) menyebutkan probiotik sebagai “water additives”, tetapi definisi yang sebenarnya adalah bakteri yang dimasukkan dengan berbagai macam cara kedalam saluran pencernaan dan tetap hidup untuk memperbaiki kesehatan. Pada tahun 1991 Porubcan mencoba dua cara untuk memperbaiki kualitas air dan produksi kerapu *P.monodon*. Cara yang pertama adalah biofilter yang mengambang diinokulasi dengan nitrifying bacteria untuk mengurangi jumlah ammonia dan nitrit pada air, treatment seperti ini menambah kelangsungan hidup kerapu (Porubcan, 1991a). Kedua adalah menambahkan bakteri *Bacillus* spp kedalam kolam dekat dengan aerator untuk mengurangi penggunaan oksigen dan menambah produksi kerapu (Porubcan, 1991b). Pada umumnya yang disebut probiotik komersial adalah mengandung bakteri nitrifikasi dan *Bacillus* spp. Kedua bakteri tersebut sangat berbeda, nitrifikasi bakteri membutuhkan lingkungan yang sebenarnya dan belum pernah ditemukan di saluran pencernaan dari hewan. *Bacillus* spp dipakai probiotik untuk mamalia hidup pada tanah dan mereka tidak menetap pada saluran pencernaan, hanya aktif pada selama transit di saluran pencernaan (Ghounier-Chateau, 1994). Selanjutnya mereka melaporkan banyak mengisolasi *Bacillus* spp dari ikan (Hamid et al., 1978), crustacea (Sharmila et al., 1996), bivalve (Sugita et al., 1981). Queiroz dan Boyd (1998) melaporkan bahwa *Bacillus* spp dapat meningkatkan survival dan produksi channel catfish, tetapi pengarang tersebut menitik

beratkan pada kualitas air yang dikondisikan sangat buruk dengan perlakuan. Kennedy (1998) mengisolasi strain *Bacillus subtilis* dari ikan snook *Centromopus undecimalis*. Inokulasi dari strain tersebut kedalam air pemeliharaan menghilangkan *Vibrio* sp dari semua lava snook sesudah menurunkan salinitas 30-3 ‰. Moriarty (1998) juga melaporkan bahwa pemberian *Bacillus* sp bisa meningkatkan survival pada kolam kerapu. Dengan treatment tersebut dapat menurunkan jumlah luminous *Vibrio* sp pada sediment dan air, walaupun efek terhadap mikroflora pada intestine tidak dipelajari.

Kesimpulan

Bacillus sp tersebut dipilih karena memproduksi antibiotik untuk melawan *Vibrio* sp, tetapi mereka menitik beratkan pada efek multifaktor probiotik misalnya produksi enzim, kompetisi untuk nutrisi dan ruang. Beberapa mekanisme tersebut kemungkinan mencegah berbiaknya strain yang resisten terhadap antibiotik. Data yang sesungguhnya Moriarty (1998) menunjukkan bahwa *Bacillus* spp mempunyai aksi penghambatan terhadap luminous *Vibrio* sp pada kolam sedimen, tetapi survival.

Daftar Pustaka

- Ahne, W., W. Popp and R. Hoffman (1982) : *Pseudomonas fluorescens* as a pathogen of tench *Tinca tinca*. Bull. Europe. Ass. Fish Path. 4 : 56 - 57.
- Allen, D. A., B. Austin and R. R. Colwell (1983) : Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. J. Gen. Microbiol, 129 : 2043 - 2062.
- Aoki, T., Kitao, T., Itabashi, T., Wada, Y., Sakai, M. (1981) : Proteins and lipopolysaccharides in the membrane of *Vibrio anguillarum*. Develop. Biol. Standard., 49, 225 - 232.
- Austin, B. and D. Austin (1987) : Bacterial Fish Pathogen. Ellis Horwood. London. Pp 250 - 262.
- Bergh, O., K.E.Naas and T.Harboe (1994) : Shift in the intestinal microflora of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae during first feeding. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 51:1899-1903.
- Chart, H. and Trust, T.J. (1984) : Characterization of the surface antigen of the marine fish pathogens, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Can. J. Microbiol., 30, 703 - 710.
- Clement, K.D. (1997) : Fermentation and gastrointestinal microorganism in fishes. In: Mackei, R.I., B.A. Witte, R.E. Isaccson (Ed), Gastrointestinal Microbiology, Vol 1, Gastrointestinal Ecosystem and Fermentation, Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, pp 156-198.
- Dopazo, C.P., M.L.Lemos, C.Lodeiros, J.Bolinches, J.L. Barja and A.L.Toranzo (1988) : Inhibitory activity of antibiotics-producing marine bacteria against fish pathogens. J.Appl.Bact., 65: 97-101.
- Egidius, E. and Anderson, K. (1979) : Bath immunization-a practical and non stressing method of vaccinating farmed sea rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against Vibriosis, J.Fish.Dis. 2, 405 - 410.
- Ellis, A.E. (1988) : Fish Vaccination. Academic Press.
- Fryer, J.L., Rohovec, J.S. and Garrison, R.L. (1978) : Immunization of salmonid for control of Vibriosis. Mar. Fish Review, 40, 20 - 23.
- Figueras, A., M. M. Santarem and B. Novoa (1997) : *In vitro* immunostimulan of turbot *Scophthalmus maximus* leucocytes with beta glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. Fish Pathology, 32 : 153 - 157.
- Gould, R.W., O'Leary, P.J., Garrison, R.L., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1978) : Spray vaccination: a method for immunization of fish. Fish. Pathol., 13, 63 - 68.
- Gournier-Chateau, N., J.P.Larpen, I.Catellanos, J.L.Larpen (1994) : Les Probiotiques en Alimentation Animale et Humaine. Tehchnique et Documentation Lavoisier, Paris. 192 pp.
- Hamid, A., T.Sakata and D.Kakimoto (1978) : Microflora in the alimentary tract of grey mullet. A comparison of the mullet intestinal microflora in fresh and seawater. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44 : 53-57.
- Imada, C., U.Simidu and T.Naga (1985) : Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51:799-803.
- Johnson, K.A., Flynn, J.K and Ammend, D.F. (1982) : Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. J.Fish.Dis., 5, 207 - 213.
- Kawai, K., Kusuda, R. and Itami, T. (1981) : Mechanisms for protection in ayu orally

- vaccinated for vibriosis. *Fish Pathol.*, 15, 257 - 262.
- Krieg, N.R. and J.G.Holt (1984) : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vo.1. Wllilam and Wilkin, Baltimore, pp 964.
- Kusuda, R and K. Kawai (1992) : Bacterial infections of fish in Japan. In *Salmonid diseases*, editor T. Kimura. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.
- Leong, J.C dan J.L.Fryer (1993) : Viral vaccine for aquaculture. *Annual. Rev. of Fish Disease*, pp 225 - 240.
- Lesel, R. (1990) : Thermal effects on bacterial flora in the gut of rainbow trout and african catfish. In: Lesel, R (Ed) : *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam, pp 33-38.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall (1951) : Protein measurement with the folin fenol reagent. *J.Biol. Chemistry* 193 : 265- 275.
- Munro, P.D., T.H.Birbeck and A. Barbour (1993) : Influence of rate of bacterial colonization of the gut of turbot larvae on larval survival. In: Resinersten, H., L.A.Dahle, L.Jorgensen, K.Tvinnereim (Eds), *Fish farming Technology*, A.A. Balkema Rotterdam, pp 85-92.
- Moriarty, D.J.W (1997) : The role of microorganism in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151: 333-349.
- Moriarty, D.J.W (1998) : Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.
- Mushiake, K., T. Nakai and K. Muroga (1985) : Effects of Zinc on the activity of Eel *Anguilla japonica* leucocyte. *Fish Pathol* 6 : 125 - 130.
- Plumb, J.A (1994) : Health maintenance of cultured fishes : Principal microbial diseases. CRC Press. Boca Raton.
- Porubcan, R.S. (1991a) : Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tank of *Penaeus monodon* using floating biofilter containing processed diatomaceous erathmedia pre-inoculated with nitrifying bacteria. Program and abstract of the 22nd Annual Conference and Exposition, 16-20 June 1991, San Juan Puerto Rico, World Asquaculture Society.
- Porubcan, R.S. (1991b) : Reduction in chemical oxygen demand and improvement in *Penaeus monodon* yield in pond inoculated with *Bacillus* bacteria. Program and abstract of the 22nd Annual Conference and Exposition, 16-20 June 1991, San Juan Puerto Rico, World Asquaculture Society.
- Prieur, D., G.Mevel, J.L.Nicolas, A.Plusquellec and M.Vigneulle (1990) : Interaction between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr.Mar.Biol.Annu.Rev.*, 28 : 277-352.
- Reed, M and R. Mueench (1958) : The calculation of LD50. *J. Bio. Chemistry.* 5 : 25 - 27.
- Ringo, E., E.Strom and J.A.Tabachek (1995) : Intestinal microflora of salmonids : a review. *Aquacul.Res.*, 26: 773-789.
- Robert, R.J. and M.T. Horne (1978) : Bacterial meningitis in farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, affected with chronic pancreatic necrosis. *J. Fish Diseases.* 1 : 157 - 164.
- Robert (1988) : *Fish Pathology*. Bailliere Tindal. London. Pp 189 - 190.
- Sakata, T. (1990) : Microfora in the digestive tract of fish and shellfish. In :Lesel, R. (Ed), *Microbiology in Poecilotherms*, Elsevier, Amsterdam, pp 171-176.
- Sakata, T., J.Okabayashi and D.Kakimoto (1990) : Variation in the intestinal microflora of Tilapia reared in fresh and sea water. *Bull.Japan.Soc.Sci.Fish.*, 46: 313-317.
- Salati, F., K. Watanabe, K.Kawai and R.Kusuda (1989) : Immune response of ayu against *Vibrio anguillarum* Lipopolysaccharide. *Nippon Suisan Gakkaiishi*, 19 : 45 - 49.
- Sharmila, R., T.J.Abraham, J. Sundararaj (1996) : Bacterial flora of semi-intensive pond reared *Penaeus indicus* and the environment. *J.Aquaculture Trop.*, 11: 193-203.
- Sugita, H., H.Tanaami, T. Kobashi and Y.Deguchi (1981) : Bacterial flora of coastal bivalve. *Bull.Japan.Soc.Sci. Fish.*, 47:655-661.
- Suprpto, H., T. Hara, T. Nakai and K. Muroga (1996) : Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathology* 31 : 203 - 207.
- Suprpto, H. (1997) : Studies on the toxin of *Edwardsiella tarda*. Doctoral dissertation. Hiroshima University, Japan.
- Storm, E. and E. Ringo (1993) : Changes in bacterial flora in developing cod, *Gadus morhua* L larvae after inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the water. In: Walter, B., H.J.Fyhn (Eds), *Physiological and Biochemical Aspects of Fish larval Development*. University of Bergen Norway, pp 226-228.

Tanasomwang, V., T.Nakai, Y.Nishimura and K.Muroga (1998) : *Vibrio*-inhibiting marine bacteria isolated from Black tiger shrimp hatchery. *Fish Pathol.*, 33 : 459-466.

Vadstein, O (1977) : The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155: 401-407.