نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۸، پاییز ۱۳۸۹

شناسایی گونه های ویبریو پروبیوتیک علیه ویبریوهای بیماری زا در ماهی قزل آلای رنگین کمان

• مصطفی اخلاقی
دانشیار بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (نویسنده مسئول)
• محمد جواد نوروزی اصل
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۷۱۲۰۷۳۱۷
Email: akhlaghi@ shirazu.ac.ir

چکیده

تعداد ۱۱۶ نمونه از ماهی های دریایی و رسوبات ساحلی سواحل خلیج فارس در بوشهر تهیه شد تا با کشت بر روی محیط تی سی بی اس ویبریوهای موجود جداسازی شوند. پس از انجام آزمایش های بیوشیمیایی، ۳۰ گونه ویبریو جدا گردید که در نهایت ۷ گونه *Vibrio* شامل *V. ordalii*، *V. vulnificus*، *V. harveyi*، *V. alginalyticus*، *Vibrio anguillarum* *Carchariae* و *V. splendidus* شناسایی گردیدند. پاتوژنیستی گونه های جدا شده مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید گونه های و*V. anguillarum*، *V. vulnificus* و *V. ordalii* از بیماریزایی شدیدی برای ماهی قزل آلای رنگین کمان برخوردار هستند. خواص آنتاگونیستی این گونه ها بر یکدیگر با روش استفاده از مایع بالایی کشت و همچنین روش آگار دو لایه انجام گرفت و نشان داد تعدادی از این ویبریوها اثر بازدارندگی بر دیگر گونه ها دارند. سه گونه، *V. splendidus*، *V. alginalyticus* و *V.harveyi* بطور جداگانه با غذای ماهی ها به مدت ۱۴ روز به مقدار ۱۰۹-۱۰۷ استفاده شد و ماهی ها با ویبریوهای بیماری زا بروش غوطه‌ورسازی مورد چالش قرار گرفتند. در حالیکه میزان بقاء در گروه کنترل ۵۳/۳-۴۶/۶ درصد بود، ماهی هایی که از پروبیوتیک استفاده نمودند دارای درصد بقاء ۹۶/۶-۹۳/۳ بودند که به طور معنی داری با گروه کنترل متفاوت بود ($P < ۰/۰۵$). گونه های پروبیوتیکی مورد مطالعه در این تحقیق توانستند باعث تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی از جمله افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و انفجار تنفسی نوتروفیل های ماهی قزل آلای رنگین کمان شوند.

کلمات کلیدی: ویبریو، پروبیوتیک، ماهی قزل آلای رنگین کمان

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 88 pp: 9-18

Identification of probiotic vibrios against pathogenic vibrios in rainbow trout

By: Akhglaghi M (Corresponding Author; Tel: +989171207317) Associate Professor of Veterinary Faculty of Shiraz University, and Nouroziasl MJ, Graduated of Veterinary Faculty of Shiraz University.

A total of 116 marine fishes and sediments were collected from Persian gulf shore near Bushehr in order to isolate vibrio species. After culturing on thiosulphate- cirate- bile salts- sucrose and with biochemical tests, 30 isolates showed vibrio characteristics which were categorized in 7 vibrio species, *V. anguillarum, V. alginalyticus, V. harveyi, V. vulnfiicus, V. ordalii, V. carchariae and V. splendidus*. In pathogenicity evaluation of vibrio isolates for rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *V .vulnificus, V. angillarum and V. ordalii* resembled the most pathogens. Antigonistic effects of the isolates were determined using supernatant assay and double-agar layer method. Three isolates, *V. alginolyticus, V. splendidus and V. haveyi* were separately incorporated into the feed and fed to rainbow trouts for 14 days at doses equivalent to 107-109 cells g-1 of feed and fish were challenged with pathogenic vibrios. Whereas the untreated controls experienced survival rate of 46.6-53.3% when challenged by immersion with *V. vulnificus V. anguillarum and V. ordalii,* the probiotic treated groups remained healthy with a high survival rate of 93.3-96.6%. The probiotic vibrio species studied in this research reflected stimulation of innate immunity, namely enhanced phagocytic activity and phagocytic index of kidney macrophages and respiratory burst activity of neutrophils.

Keywords: Vibrio, Probiotic, Rainbow trout

مقدمه

با گسترش صنعت پرورش آبزیان، وقوع بیماری های عفونی از جمله بیماری های باکتریایی اجتناب ناپذیر است. توسعه مقاومت باکتریایی علیه آنتی بیوتیک های مورد استفاده روزبروز در حال ازدیاد می باشد (۲۵) که مشکلات بزرگی در راه مبارزه با بیماری های باکتریایی در پیش خواهد گذاشت. بنابراین رفته رفته توجه محققین به استفاده از پروبیوتیک ها افزایش می‌یابد (۲۶) .در آبزی پروری، آنتی بیوتیک های مورد استفاده نهایتاً وارد محیط زیست شده و زمینه مقاومت باکتریایی را در مزرعه فراهم می سازند. از جمله این مقاومت می توان به مقاومت باکتری های آزاد ماهیان به اکسی تتراسیکلین اشاره نمود (۱۴). با به اجرا در آوردن مقررات استفاده از آنتی بیوتیک و اعمال قوانین خاص در این ارتباط برای آبزی پروران زمینه توجه و استفاده از پروبیوتیک ها آشکارتر می شود (۴). پروبیوتیک ها در حقیقت قسمتی از میکروفلور دستگاه گوارش شده و به سلامت میزبان خود کمک می نماید. این عمل با چسبیدن آنها به مخاط روده و تولید متابولیت های ضد میکروبی و بطور کلی رقابت با میکروارگانیسم های پاتوژن می باشد (۸).

از سال ۱۹۸۰، جنس ویبریو مورد بازبینی دقیق قرار گرفته است و در حال حاضر در این جنس ۴۴ گونه وجود دارد که تعدادی از آنها برای ماهی ها، میگوها، صدف های پرورشی و سایر آبزیان بیماریزا می باشد (۹). بیماری ویبریوزیز یکی از بیماری های پر اهمیت ماهی های آب شور، لب شور و شیرین ماهی های پرورشی در دنیا محسوب می شود که عمدتا توسط گونه های انگوئیلاروم، اوردالی، ولنیفیکوس، سالمونیسیدا و ویسکوزوس ایجاد می شود (۳).

تحقیقاتی در خصوص اثر بازدارندگی رشد گونه های بیماریزای ویبریو توسط دیگر ویبریوهای محیطی بعمل آمده است (۲۳) که می تواند بواسطه تولید برخی مواد نظیر آنتی بیوتیک ها، باکتریوسین ها، سیدروفرها، لیزوزیم، پروتئاز، پراکسید هیدروژن و تغییر دادن اسیدیته محیط بواسطه تولید اسیدهای آلی باشد (۲۲،۱۰). باکتریوسین تولید شده توسط میکروفلور روده علیه *V.anguillarum* در ماهی کفشک تحت تأثیر محیط رشد باکتری ها قرار دارد و تغییر می یابد (۱۶). گزارشی از نقش پروبیوتیکی یک سوش از *V.anguillarum* در کاهش بیماری فورونکلوزیز که عامل آن *Aeuromonas salmonicidda* می باشد و نیز *V.anguillarum* و *V.ordalii* (عامل ویبریوزیز در ماهی) صورت گرفته(۴) و تأکید بر جایگزین نمودن پروبیوتیک ها بجای آنتی بیوتیک ها شده است این پروبیوتیک ها قادر به تولید مواد ضد میکروبی و باکتریوسین هستند (۲۲).

هدف از انجام این تحقیق شناسایی گونه های غیربیماری زای ویبریو علیه گونه های بیماریزای منطقه جنوب کشور در ماهی قزل آلای رنگین کمان با روشی مؤثر، آسان، ارزان و دوستدار محیط زیست می باشد بوده است.

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی باکتری ها

تعداد ۴۸ نمونه از بستر دریا و ۶۸ نمونه از ماهی های کوچک خلیج فارس (با وزن متوسط ۳۵ گرم شامل هامور، گوازیوم، شوریده و سنگسر ماهی ها) (جمعاً ۱۱۶ نمونه) در منطقه بوشهر جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه آبزیان دانشکده منتقل شد. جهت جدا نمودن گونه های ویبریو بر روی محیط تی سی بی اس[1] کشت داده شد به این ترتیب که ماهی های کوچک تازه صید شده دریایی خرد شده همچنین نمونه های رسوب با آب دریا (استریل شده) هموژن شده و با رقت یکدهم و یک صدم بر روی محیط بی اچ آ[2] کشت داده شد و در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز نگهداری شد. کلنی های رشد یافته سپس بر روی محیط تی سی بی اس انتقال یافته و در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. تعداد ۳۰ جدایه با ۳۳ آزمایش فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

مورد شناسایی واقع شدند (۲۷،۶،۳،۲،۱). در تمام محیط های مورد استفاده، به میزان لازم کلرور سدیم اضافه گردید. درجه حرارت برای رشد باکتری های مورد آزمایش ۲۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. باکتری های جدا شده روی محیط نیمه جامد تی اس بی۳ حاوی ۰/۲ درصد آگار خالص در شیشه های کوچک درپیچ دار رشـد داده شـد و بمیزان ۲۰ درصد حجم گلسیرول استریل اضافه گردیده و در ۷۰- درجه سانتی گرادنگهداری شدند (۱۸).

آزمایش تعیین بیماریزایی گونه های ویبریو جدا شده

به منظور بررسی بیماریزایی گونه های انگوئیلاروم، الجنیتکوس، کارکاریا، هاروئی، اوردالی، ولنیفیکوس و اسپلندیدوس این باکتری ها بطور جداگانه به دو ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن متوسـط ۱۰۰ گرم تزریق گردید و پس از دو روز ماهی ها با بیهوشی زیاد کشته شده و با کشت از کلیه آنها در روی آگار خوندار مجدداً همان باکتری ها جدا شدند. سپس باکتری به میزان های $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ در هر یکدهم میلی لیتر سـرم فیزیولوژی (۱۸) تهیه و مقـدار ۰/۱ میلـی لیتر از آن به گروه هـای ۱۰ تایی ماهی های قزل آلای رنگین کمان(۲۵۰ ماهی با وزن متوسط ۳۵ گرم) بصورت مجزا بشکل داخل صفاقـی تزریق گردید. در هر بار آزمایش همان تعـداد ماهی در هر گروه به عنوان کنترل فقط با سرم فیزیولوژی استریل بطور صفاقی تزریق شدند و در تانک دیگری نگهداری گردیدند.

در روش غوطه ورسازی، بیماریزایی گونه های انگوئیلاروم، الجنیتکوس، کارکاریا، هاروئی، اوردالی، ولنیفیکوس و اسـپلندیدوس بطور جداگانه تعیین گردید. برای هر گونه باکتری۱۰ ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن متوسط ۴۰ گرم در محلول تهیه شـده از آب دریا و باکتری که در هر میلی لیتر آن $۱۰^{۸}$ باکتری وجود داشت همراه با هوادهی به مدت سه دقیقه قرار داده شدند. ماهـی ها تـا ۲ هفته بعد بطور معمول مورد تغذیه قـرار گرفته، آب با درجه حرارت متوسـط ۱۶ درجه سانتیگراد و اکسـیژن ۸ پی پی ام تنظیم گردید و هـر گونه علائم غیر طبیعی ثبـت گردید. ماهی هایی که علائم درمانگاهی غیرعادی داشـتند با بیهوشی زیاد کشته شـده و از بافت کلیه آنها به منظور جداسازی ویبریو تزریق شده بطور استریل کشت می شد.

پس از نمونه گیری و منفی بودن کشت از ماهیهایی که تا ۲ هفته بعد از تزریق و غوطه ورسـازی در باکتری همچنان سالم ماندند، عدم بیماریزا بودن باکتری مورد استفاده برای این ماهی ها مشخص شد.

آزمایش اثر آنتاگونیستی

آزمایـش تعیین اثر ضـد میکروبی گونه های غیر بیماریـزا بر بیماریزا بدین ترتیب انجام گرفت که از مایع بالایی محیط کشـت آبگوشـتی تی اس بی (مقدار ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر) از گونه های غیر بیماریزا در محیط کشـت آبگوشتی ویبریوی بیماریزا استفاده شد و سپس کشت ویبریوهای بیماریزا در این محیط انجام شد. برای این کار ابتدا باکتری ها شمارش شده و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد بر روی محیط جامد کشت داده شد تا مشخص نماید باکتری ها از بین رفته اند و اثر آنتی بیوتیکی حاصل شده است. براساس شمارش پرگنه ها، تعداد باکتری زنده ثبت گردید. برای کنترل در این آزمایش، از یک کشت بروش فوق بدون اضافه نمودن مایع بالایی گونه غیر بیماریزا استفاده شد (۱۷).

همچنین برای ارزیابی آنتاگونیستی به روش آگار دو لایه۴ به این ترتیب انجام شد که مقدار ده میکرولیتر از محیط کشت آبگوشتی پروبیوتیک مورد نظر بر روی محیط آگاربی اچ آی کشـت داده شـد و پلیت ها در ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. با استفاده از بخار کلروفرم به مدت ۳۰ دقیقه و قرار دادن پلیت در معرض این بخار، باکتری های رشد یافته در پلیت کشته شـدند. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محیط آبگوشـتی کشـت داده شده با ویبریوهای بیماریزا با مقدار ۵ میلی لیتر محیط آبگوشـتی حاوی ۰/۷ درصد آگار مخلوط شـده و در سـطح هر پلیت ریخته شد. این پلیت حاوی دو لایه آگار در ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید و قطر دایره ایجاد شده توسـط کلنی های پروبیوتیکی که توانسته بودند رشد بیماریزا را مهار سازند اندازه‌گیری شد. اثر آنتاگونیستی در صورتی مثبت قلمداد شد که اثر بازدارندگی رشد بیشتر از قطر ۱ میلی متر مشاهده شود (۷).

استفاده از پروبیوتیک در غذا

هـر یک از پروبیوتیک های مورد نظر (ویبریو الجینولتیکوس، هاروئی و اسـپلندیدوس) پس از کشـت در آبگوشت تی اس بی به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد رشد داده شد و تعداد باکتری ها شمارش گردیـد. مقدار مشـخصی از غذای قـزل آلای رنگین کمان بـا وزن ۴۵ گرم انتخاب و به نحوی با باکتری مخلوط شـد که در هر گرم غذا $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۸}$ و یا $۱۰^{۹}$ (بر اساس آزمایش) بدست آید. برای این کار چندین بار آزمایش صورت گرفت و پس از مخلوط نمودن از یک گرم غذا رقت های لازم بدست آمد و با کشـت رقت ها از تعداد باکتری های زنده در غذا اطمینان حاصل شد. غذای آماده شـده به تعداد ۴۰۰ قزل آلای رنگین کمـان ۴۵ گرمی برای آزمایش اثر اسـتفاده از پروبیوتیک های ویبریو علیه ویبریوهای بیماریزا و ۲۰۰ ماهی قزل آلای رنگین کمان برای آزمایش تعیین فعالیت و شـاخص فاگوسیتوزی بـه مـدت ۱۴ روز روزانه ۳ بار خورانیده شـد (تمام غذاهایـی که ماهی ها می گرفتند حاوی پروبیوتیک بود)(۱۱). در گروه کنترل غذا بدون استفاده از پروبیوتیک به ماهی ها داده شد.

بررسی اثر پروبیوتیکی ویبریوهای غیر بیماریزا در مواجهه با ویبریوهای بیماریزا

محلولـی بـه میـزان $۱۰^{۸}$ باکتـری در میلـی لیتـر از باکتـری هایی *V.vulnificus*، *V.anguillarum* و *V.ordalii* کـه در ایـن تحقیـق بیمـاری زا بودند به طـور جداگانه تهیه و ماهی هایی کـه به آنها به صورت خوراکی پروبیوتیک داده شده بود به مدت ۳ دقیقه به صورت غوطه ورسازی در محلول باکتری قرار داده شدند. در طول غوطه ورسازی ماهی ها، از هواده استفاده شد. ماهی ها تا دو هفته زیر نظر گرفته شدند.

بررسی اثر پروبیوتیکی بر فعالیت فاگوسیتوزی، شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها

از تعـداد ۱۰ قطعه ماهی از هر گروه که به مدت ۱۴ روز پروبیوتیک ها را مصرف نموده بودند پس از بیهوشی خونگیری بعمل آمد. خون جمع آوری شده در شیشه های حاوی هپارین ریخته شد. ماهی ها کشته شدند و سپس بافت کلیه ماهی های خونگیری شده در شرایط استریل خارج و به نسبت ده برابر حجم در محلول اسـتریل حاوی یـک میکروگرم در یک صد میلی لیتر اکسـی تتراسـیکلین، ۰/۲ میلی گرم در یکصد میلی لیتر هپارین (Sigma) و ۰/۱ درصد سـرم گوساله قرار داده شد. با استفاده از مش پلاستیکی اندازه

یک صد میکرونی استریل، بافت کلیه از مش رد شده و بافت های پیوندی آن خارج شد. با اضافه نمودن محلول پرکل (Sigma) محتویات بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سلول ها از لایه سطحی خارج شده و ۳ بار شستشو شدند و تعداد سلول ها در میلی لیتر به تعداد ۱۰۵ در میلی لیتر تنظیم گردیدند. میزان ۱ میلی لیتر از این محلول روی اسلاید میکروسکوپ پخش شد و به مدت یک ساعت در ۱۸ درجه سانتیگراد در شرایط مرطوب گذاشته شده تا سلول ها به اسلاید بچسبند. اسلایدها سپس شستشو شده و سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول حاوی مخمر رنگ شده با رنگ قرمز کنگو حاوی 10^8 مخمر در میلی لیتر اضافه گردید و اسلایدها مجدداً در شرایط مرطوب نگهداری شدند. پس از آن اسلایدها شستشو و به مدت ۵ دقیقه در متانول ۹۶ درصد ثابت گردید. سپس اسلایدها با رنگ آمیزی گیمسا رنگ شدند. گروه های ۱۰۰ تا ۲۰۰ تایی سلول ها با میکروسکوپ شمارش شده تا ماکروفاژهایی که مخمرها را بلعیده اند مشخص شوند. فعالیت فاگوسیتوزی بر اساس تقسیم تعداد سلول هایی که فاگوسیتوز کرده اند تقسیم بر کل سلول های شمارش شده ضربدر عدد ۱۰۰ بدست آمد. شاخص فاگوسیتوزی از تقسیم تعداد مخمر های فاگوسیت شده بر تعداد ماکروفاژهای فاگوسیت کننده تعیین گردید (۲۰).

فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها بر اساس احیاء نیتروبلوتترازولیوم (Sigma) به فرمازان بعنوان شاخص تولید آنیون سوپراکسید O_2^- بود (۲۱). بدین ترتیب که خون تهیه شده تازه حاوی هپارین به میزان ۵۰ میکرولیتر در میکروپلیت ها (Nunc) با حفره های گرد ریخته شد و به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول فوقانی دور ریخته شد و حفره ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی شستشو گردیدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۲ درصد نیتروبلوتترازولیوم اضافه شده و پلیت‌ها به مدت یک ساعت دیگر و همان شرایط نگهداری شدند. سلول ها سپس با متانول ۱۰۰ درصد به مدت ۳ دقیقه ثابت شده و ۳ بار با محلول ۳۰ درصد متانول شستشو گردیدند. پلیت ها با هوا خشک شده و به مقدار ۶۰ میکرولیتر از هیدروکسید پتاسیم ۲ نرمال و ۷۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Sigma) به هر حفره اضافه شدتا فرمازان تشکیل شده آبی رنگ را حل نماید. جذب نوری محلول آبی رنگ ایجاد شده با دستگاه قرائت کننده پلیت الیزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. آزمایش ها برای هر نمونه چهار بار تکرار شد و اعداد بدست آمده بصورت میانگین و انحراف نشان داده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون مربع کای (آزمون دقیق فیشر) برای مقایسه درصد تلفات ماهی ها پس از تزریق باکتری های ویبریو و همچنین مقایسه در صد بقاء ماهی ها پس از استفاده از پروبیوتیک ها علیه ویبریو های بیماریزا استفاده گردید. برای مقایسه اثر استفاده از ویبریو پروبیوتیک ها بر فعالیت فاگوسیتوزی و شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل های ماهی قزل آلای رنگین کمان از آزمون آنوای یک طرفه، من ویتنی در نرم افزار اس پی اس اس برای مقایسه گروهها استفاده شد.

نتایج

از ۳۰ گونه باکتری بدست آمده از کشت های انجام شده از ماهی های دریایی و رسوبات، ۷ گونه باکتری ویبریو بدست آمد که بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی با استفاده از منابع موجود با ویبریو های جدا شده قبلی مقایسه گردید و گونه های انگوئیلاروم، الجینولیتیکوس، هاروئی، اوردالی، ولنیفیکوس، کارکاریا و اسپلندیدوس تعیین گردیدند (۳)(جدول ۱). اکثر گونه های جدا شده ویبریو خصوصیات متغیر را از خود نشان می دادند. در آزمایش های انجام شده سعی بر این شد که پاسخ مثبت بیوشیمیایی ثبت گردد.

تمام ویبریوهای جدا شده مورد مطالعه در این تحقیق کاتالاز و اکسیداز مثبت بوده و همگی در ۶/۵-۳ در صد نمک رشد کردند. این ویبریوها دارای خصوصیت های متفاوت بیوشیمیایی از همدیگر بوده و در تولید آنزیم و تخمیر قند ها تفاوت داشتند (جدول ۱).

نتایج حاصل از قدرت بیماریزایی *V. anguillarum* در مقدار 10^6و 10^7 در میلی لیتر ۴۰ در صد ماهی ها و مقدار 10^8 باکتری در میلی لیتر ۶۰ درصد ماهی های قزل آلا را پس از تزریق داخل صفاقی بیمار نموده و باعث تلفات آنها شد. همین الگوی تلفات در *V. vulnificus* مشاهده می شود که در صد مجموع تلفات این دو باکتری شبیه به هم و برابر ۴۶/۵ درصد ثبت گردید. *V. ordelii* در 10^6و 10^7 باکتری در میلی لیتر معادل ۴۰و۲۰ درصد تلفات و در 10^8 باکتری معادل۴۰ درصد تلفات را نشان داد. *V. splendidus* در 10^6 باکتری در میلی لیتر تلفاتی بجا نگذاشت لیکن در 10^7، ۴۰ درصد و در 10^8، سبب۶۰ درصد تلفات شد. گونه *V. harreyi* و *V. carchariae* هر کدام تلفات کمتری را ایجاد نموده و بطور میانگین فقط ۶/۶ درصد تلفات را باعث شدند. در این آزمایش *V. alginoleticus* در هیچکدام از مقادیر استفاده شده باعث تلفات نگردید(جدول ۲). در گروه کنترل نیز هیچ تلفاتی مشاهده نشد.

نتایج حاصله از روش غوطه ورسازی بیماریزایی گونه های ویبریو برای ماهی قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق نشان داد گونه انگوئیلاروم، ولنیفیکوس و اوردالی که با استفاده از 10^8باکتری در هر میلی لیتر آن غوطه ور شده بودند توانستند بترتیب ۶۰، ۶۰و ۵۰ در صد تلفات ایجاد نمایند. *V.carchariae* ۲۰ درصد تلفات و گونه الجنیتکوس، هاروئی، اسپلندیدوس در این روش باعث بیماری ماهی های قزل الای رنگین کمان نشدند.

اثر آنتاگونیستی ویبریوها به روش آگار دو لایه در جدول ۳ نشان داده شده است. ویبریو الجینولتیکوس دارای بیشترین بازدارندگی رشد (قطر بازدارندگی به میلی متر) علیه گونه انگوئیلاروم، ولنیفیکوس و اوردالی بود. این میزان از بازدارندگی از رشد بمیزان کمتری در ویبریو هاروئی و اسپلندیدوس مشاهده گردید (جدول ۳). همچنین نتایج حاصل از آزمایش تعیین اثر ضد میکروبی گونه های غیر بیماریزا بر بیماریزا بروش استفاده از مایع بالایی محیط کشت آبگوشتی نشان داد که بترتیب گونه الجینولتیکوس، ویبریوهاروئی و ویبریو اسپلندیدوس بیشترین اثر بازدارندگی از رشد را علیه ویبریوهای بیماریزا داشتند.

نتایج حاصله از خوراندن پروبیوتیک های ویبریو که شامل گونه هایی بودند که یا تلفاتی برای ماهی نداشته یا کمترین بیماریزایی را داشتند به این ترتیب بود که پس از خوراندن 10^7، 10^8و 10^9 باکتری در هر گرم غذای ماهی به مدت ۱۴ روز و سپس چالش با گونه ولنیفیکوس، انگوئیلاروم و اوردالی به عنوان بیماری زا برای ماهی ها مورد استفاده قرار گرفتند، *V.alginoliticus* در مقادیر 10^7 تا 10^9 در مجموع توانست به ترتیب ۹۰، ۸۳/۳ و ۹۶/۶ در صد موجب بقاء ماهی ها در مقابل گونه ولنیفیکوس، انگوئیلاروم و اوردالی

جدول۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گونه های ویبریو در این تحقیق را نشان می دهد.

خصوصیت*	و.آنگوئیلارم	و.آلجینولتیکوس	و.کارکاریا	و. هاروئی	و. اوردالی	و. ولنیفیکوس	و.اسپلندیدوس	و.پاراهمولیتکوس**	و.سالمونیسیدا**	و.کلرا**
آگارتی سی بی اس	زرد	زرد	زرد							
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
متیل رد		+				+	+			+
واگوس پروسکر	+	+					+			+
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
حرکت	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در:										
۰ درصد نمک	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۳ درصد نمک	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۶/۵ درصدنمک							+			
۴ درجه سانتی گراد	+	+	+			+	+	+		
۳۰ درجه سانتی گراد										+
تولید:	+	+	+	+			+	+		
ایندول	+					+	+			+
آرژنین دی هیدرولیز		+	+	+		+		+		
لیزین دی کربوکسیلاز		+	+	+				+		+
اورنیتین دی‌کربوکسیلاز			+		+		+			+
اوره آز	+	+	+				+			+
هیدرولیز ژلاتین	+					+				
هیدرولیز نشاسته	+	+				+	+	+		
احیا نیترات	+						+			+
سیترات										+
حساسیت به ۰/۱۲۹(۱۵۰میکروگرم)	+	+	+	+	+	+	+		+	+
مصرف: الفا – دی – گلوکز	+	+	+	+	+	+	+		+	+
تخمیر مالتوز	+	+			+	+	+			+
مالیت		+		+		+				+
سوکروز	+	+	+	+	+					+
دی- مانوز	+	+	+	+	+	+	+	+		+
آرابینوز	+							+		
دی مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+		+
دی – فرکتوز		+		+		+				
دی – گالاکتوز				+						
دی – ترهالوز	+	+		+		+				
دی – سوربیتول	+	+								
آمیگدالین	+									

و= ویبریو += پاسخ مثبت آزمایش

***در این جدول خصوصیات بارز مشاهده شده ذکر گردیده است.**

****در این تحقیق مورد مطالعه قرار نگرفتند فقط خصوصیات آنها برای مقایسه در این جدول ذکر شده است.**

جدول ۲- بیماریزایی گونه های مختلف ویبریو مورد آزمایش در این تحقیق پس از تزریق به ماهی های قزل آلای رنگین کمان را نشان می دهد (حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند (P<۰/۰۵).

باکتری	تعداد ماهی	تعداد باکتری در میلی‌لیتر	درصد تلفات	تعداد ماهی	تعداد باکتری در میلی‌لیتر	درصد تلفات	تعداد ماهی	تعداد باکتری در میلی‌لیتر	درصد تلفات	درصد مجموع تلفاتی که باکتری ویبریو جدا گردید
V. anguillarum	۱۰	$۱۰^{۶}$		۱۰	$۱۰^{۷}$		۱۰	$۱۰^{۸}$		۴۶/۵ [a]
V. vulnificus	۱۰	$۱۰^{۶}$	۴۰	۱۰	$۱۰^{۷}$	۴۰	۱۰	$۱۰^{۸}$	۶۰	۴۶/۵ [a]
V. splendicus	۱۰	$۱۰^{۶}$	۴۰	۱۰	$۱۰^{۷}$	۶۰	۱۰	$۱۰^{۸}$	۴۰	۳۳/۳ [a]
V. harveyi	۱۰	$۱۰^{۶}$	۰	۱۰	$۱۰^{۷}$	۴۰	۱۰	$۱۰^{۸}$	۶۰	۶/۶ [b]
V. alginalytias	۱۰	$۱۰^{۶}$	۰	۱۰	$۱۰^{۷}$	۲۰	۱۰	$۱۰^{۸}$	۰	۰ [b]
V. ordalii	۱۰	$۱۰^{۶}$	۰	۱۰	$۱۰^{۷}$	۰	۱۰	$۱۰^{۸}$	۰	۳۳/۳ [a]
V. carchariae	۱۰	$۱۰^{۶}$	۴۰	۱۰	$۱۰^{۷}$	۲۰	۱۰	$۱۰^{۸}$	۴۰	۶/۶ [b]

جدول ۳- اثر آنتی گونیستی ویبریوهایی که در این تحقیق نقش پروبیوتیکی دارند.

	اثر پروبیوتیکی															
	گونه انگوئیلاروم		گونه الجینولتیکوس		گونه کارکاریا		گونه هاروئی		گونه اوردالی		گونه ولنیفیکوس		گونه اسپلندیدوس	
	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)	بازدارندگی رشد	قطر بازدارندگی رشد(میلی‌متر)
انگوئیلاروم	–	۰	+	۶	+	۱	+	۴	–	۰	–	۰	+	۳
الجینولتیکوس	–	۰	–	۰	–	۰	+	۱	–	۰	–	۰	+	۱
کارکاریا	–	۰	+	۲	–	۰	+	۲	–	۰	–	۰	+	۱
هاروئی	–	۰	+	۳	–	۰	–	۰	–	۰	–	۰	–	۰
اوردالی	–	۰	+	۴	–	۰	+	۲	–	۰	–	۰	+	۱
ولنیفیکوس	–	۰	+	۵	–	۰	+	۳	–	۰	–	۰	+	۲
اسپلندیدوس	–	۰	+	۱	–	۰	+	۱	–	۰	–	۰	–	۰

شود. در حالیکه در گروه کنترل بقای ماهی ها به ترتیب ۴۶/۶، ۴۳/۳ و ۵۳/۳ درصد بود. ویبریو هاروئی بعنوان پروبیوتیک در مقادیر مختلف توانست ۸۶/۶، ۹۰و ۹۳/۳ در صد موجب بقای ماهی ها و ویبریو اسپلندیدوس ۹۳/۳، ۹۶/۶و ۹۳/۳ درصد موجب بقاء ماهی ها در مواجهه با ویبریوهای بیماریزا شود. نتایج حاصله نشان داد تعداد باکتری از ۱۰۷ تا ۱۰۹ در اثر پروبیوتیکی این باکتری ها تفاوت معنی داری ندارد (P< ۰/۰۵)(جدول ۴).

نتایج حاصله از فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژهای بافت کلیه شکل ۱ ماهی های قزل آلایی که در تغذیه آنها از پروبیوتیک استفاده شده بود نشان داد *V. alginoleticus* در مقایسه با گونه اسپلندیدوس و هاروئی بطور معنی داری در صد فعالیت فاگوسیتوزی را افزایش داده است. شاخص فاگوسیتوزی در استفاده از تمام پروبیوتیک ها نیز بطور معنی داری افزایش یافته بود (جدول ۵).

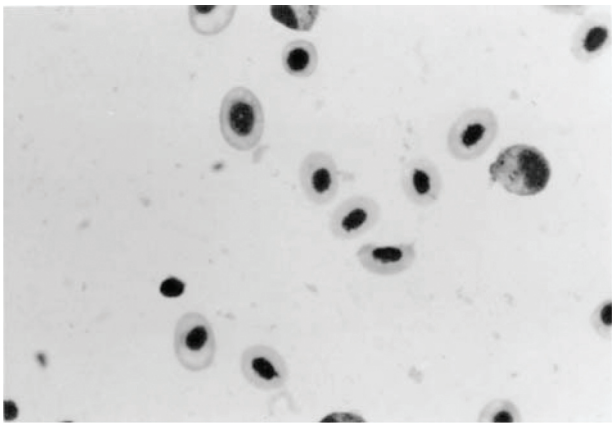
نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها نشان داد *V.alginoleticus* و *V.splendicus* در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری باعث افزایش فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها شده اند (P< ۰/۰۵). این افزایش در استفاده از ویبریو هاروئی به عنوان پروبیوتیک کمتر بود اگر چه بطور معنی داری با دو ویبریوی پروبیوتیک دیگر تفاوت معنی داری داشت لیکن بطور معنی داری از گروه کنترل بیشتر بود

جدول ۴- مقایسه اثر استفاده از پروبیوتیک های ویبریو علیه ویبریوهای بیماریزا در ماهی قزل آلای رنگین کمان (هر گروه از ماهی ها ۱۰ قطعه) که با تعداد و درصد بقاء نشان داده شده است (حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند (P< ۰/۰۵).

پروبیوتیک / باکتری بیماریزا	گونه الجینولتیکوس					گونه هاروئی					گونه اسپلندیدوس					سرم فیزیولوژی			
	تعداد باکتری در هر گرم غذا					تعداد باکتری در هر گرم غذا					تعداد باکتری در هر گرم غذا								
	$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۸}$	$۱۰^{۹}$	درصد بقاء		$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۸}$	$۱۰^{۹}$	درصد بقاء		$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۸}$	$۱۰^{۹}$	درصد بقاء		$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۸}$	$۱۰^{۹}$	درصد بقاء
	بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی					بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی					بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی					بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی			
V.alginalyticus ($۱۰^{۸}$ باکتری در محلول حمام)	۹	۱۰	۸	۹۰ [a]		۸	۱۰	۸	۸۶/۶ [a]		۹	۱۰	۹	۹۳/۳ [a]		۶	۵	۳	۴۶/۶ [b]
V.splendidus ($۱۰^{۸}$ باکتری در محلول حمام)	۸	۹	۸	۸۳/۳ [a]		۸	۱۰	۹	۹۰ [a]		۹	۱۰	۱۰	۹۶/۶ [a]		۵	۵	۳	۴۳/۳ [b]
V.harveyi ($۱۰^{۸}$ باکتری در محلول حمام)	۹	۱۰	۱۰	۹۶/۶ [a]		۹	۹	۱۰	۹۳/۳ [a]		۱۰	۹	۹	۹۳/۳ [a]		۵	۶	۵	۵۳/۳ [b]

جدول ۵- اثر اســتفاده از پروبیوتیک های ویبریو بر فعالیت فاگوســیتوزی و شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل های ماهی قزل آلای رنگین کمان (حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند (P <۰/۰۵).

	میانگین فعالیت فاگوسیتوزی(درصد)		شاخص فاگوسیتوزی (ضریب)		فعالیت انفجار تنفسی(جذب نوری)	
باکتری پروبیوتیک به تعداد $۱۰^{۷}$ در ماهی غذا	پروبیوتیک	کنترل	پروبیوتیک	کنترل	پروبیوتیک	کنترل
گونه الجینولتیکوس	۴ ± ۶۲[a]	۳ ±۴۸[d]	۲/۵ [e]	۱/۲ [g]	۰/۰۴۴±۰/۱۱۵ [h]	۰/۰۱۶ ±۰/۰۶۵ [j]
گونه اسپلندیدوس	۵± ۵۶[b]	۲ ±۴۶[d]	۲/۴ [e]	۱/۱ [g]	۰/۰۲۲± ۰/۱۰۲ [h]	۰/۰۱۲ ±۰/۰۷۲ [j]
گونه هاروئی	۳± ۵۵[b]	۱ ±۵۱[d]	۱/۸ [f]	۱/۲ [g]	۰/۰۰۹ ±۰/۰۸۲ [i]	۰/۰۱۸ ۰±/۰۶۸ [j]



شکل ۱- یک ماکروفاژ بافت کلیه که سه سلول مخمر را فاگوسیت کرده است (سمت راست تصویر)(رنگ آمیزی گیمسا × ۱۰۰۰).

(جدول ۵). نمونه گیری از مدفوع ماهی هایی که در غذای آنها پروبیوتیک گونه الجینولیتیکوس، اسپلندیدوس و هاروئی استفاده شده بود نشان داد که امکان جداسازی این ویبریو ها بر روی محیط تی سی بی اس یکروز پس از شروع تغذیه با آنها و برای سه گونه ذکر شده بترتیب تا ۲۲ روز، ۱۸ روز و ۱۵روز پس از قطع پروبیوتیک وجود داشت.

بحث

در تحقیق جاری نقش مفید پروبیوتیک ها در کنترل بیماری ویبریوزیز در آبزی پروری نشان داده شده است. گونه الجینولیتکوس، ویبریو هاروئی و ویبریو اسپلندیدوس در غذای ماهی های قزل آلای رنگین کمان توانستند به میزان های مختلف از بیمار شدن ماهی های مورد چالش پیشگیری نموده و درصد تلفات را کاهش دهند (جدول ۴). نتایج بدست آمده در خصوص نقش پروبیوتیکی *V.alginlyticus* در این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر که نقش این پروبیوتیک در کنترل بیماری ناشی ا ز *V.anaguillarum*، *A.salmonicida* و *V.ordalii* در ماهی را داشته است مطابقت دارد (۴). پروبیوتیک های ویبریو معرفی شده در این تحقیق می‌توانند تحریک ایمنی غیر اختصاصی را از طریق، افزایش فاگوسیتوز ماکروفاژهای کلیه و افزایش فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها که همگی نقش افزایش قدرت دفاع بدن ماهی در مقابل بیماری زاها ایجاد می نماید را به عهده بگیرند. چنین افزایش فعالیت ایمنی در مقابل عوامل بیماریزائی همچون آئروموناس سالمونیسیدا در ماهی قزل آلای رنگین کمان نیز گزارش گردیده است (۱۱). چنانچه ملاحظه بر استفاده از باکتری های زنده در غذای ماهی مطرح باشد و حساسیت برای این که ممکن است گونه های پروبیوتیک معرفی شده بتوانند بیماریزا واقع شوند باید اذعان داشت که براساس تحقیقات انجام شده ویبریوهای پروبیوتیک معرفی شده در این تحقیق یا برای ماهی بیماریزا نبوده و یا کمترین بیماریزایی را داشته اند (۳،۲).

در این تحقیق از باکتری های گونه های الجینولیتکوس، هاروئی و اسپلندیدوس به عنوان پروبیوتیک در هر گرم غذای ماهی علیه ویبریوهای بیماریزا در ماهی قزل آلای رنگین کمان استفاده شد که نتایج حاصل اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان داد لیکن تفاوت معنی داری را با توجه به دوز 10^{7}تا 10^{9} پروبیوتیک استفاده شده در مقاومت ماهی ها در مقابل بیماری نشان نداد ($P< 0/05$). دلیل این امر را می توان استقرار باکتری پروبیوتیک و تزاید آن در سطح مخاطی روده ماهی قزل الای رنگین کمان دانست که بسرعت ازدیاد یافته و توانسته اند در مواجهه با ویبریوهای بیماریزا از استقرار آنها جلوگیری نمایند، مواد آنتی بیوتیکی تولید نموده و رشد آنها را متوقف سازند و همچنین با تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی میزبان از بیمار شدن میزبان پیشگیری نمایند. استفاده از مقادیر بیشتر از این مقدار پروبیوتیک استفاده شده و احیاناً کمتر از آن چنانچه بتواند نتایج را دچار تغییر نمایند احتیاج به بررسی بیشتر دارد. در نتایج بدست آمده از کاربرد *Lactobacillus ramnosus* در تحریک ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان داده شده است که افزایش مقدار پروبیوتیک در غذا نتوانست تغییری در اثر پروبیوتیکی این باکتری علیه بیماری نشان دهد (۱۵). همچنین تمام دوزهای 5×10^{5}، 5×10^{7} و 5×10^{9} باکتری *L.delbrukei* زیر گونه بولگاریکوس بعنوان پروبیوتیک در غذای این ماهی توانستند باعث افزایش فعالیت کمپلمان، لیزوزیم و سطح ایمنوگلوبولین های خون شوند (۲۴).

استفاده از پروبیوتیک می تواند احتمالاً در وضعیت تغذیه ای، تولید ویتامین ها و افزایش رشد تاثیر فراوان و همچنین در بهبود وضعیت ایمنی ماهی علیه میکرواورگانیسم ها موثر باشد (۱۲). مطالعه دیگری که از باکتری های طبیعی محیط تفریخگاه در غذای لارو صدف استفاده نمودند توانست رشد لاروها را بهبود بخشد (۱۹). با استفاده از باکتری گرم مثبت به عنوان پروبیوتیک در غذای لاروهای ماهی های دریایی بقای و هم اندازه بودن اندازه لاروها و رشد آنها بهبود داده شده است (۱۲).

اخیراً از آئروموناس سوبریای دستگاه گوارش ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان پروبیوتیک استفاده گردیده و با تعداد ۱۰۷ باکتری در هر گرم غذای این ماهی به مدت ۱۴ روز، ماهی های قزل آلای رنگین کمانی که از این پروبیوتیک استفاده نکردند در مقابل بیماری استرپتوکوکوزیز و لاکتوکوکوزیس ۱۰۰-۷۵ درصد تلفات دادند در حالی که ماهی هایی که پروبیوتیک برای آنها استفاده گردید فقط ۶-۰ درصد تلفات دادند که نشانگر تأثیر بسزای این باکتری بعنوان پروبیوتیک در پیشگیری و درمان بیماری

استرپتوکوکوزیز و لاکتوکوکوزیس می باشد (۵).

بطور کلی می تـوان نتیجه گیری نمود که گونـه های الجینولتیکوس، هاروئی و اسپلندیدوس بکار رفته شده در این تحقیق نسبتاً از نقش پروبیوتیکی برخـوردار بوده و توانسـتند بیمـاری را کنترل نمـوده و کاربـرد آنها برای ماهی هایی که در معـرض بیماریزایی ویبریوهای پاتوژن از جمله گونه های انگوئیلاروم، ولنیفیکوس و اوردالی قرار می گیرند می تواند نقش بازدارندگی بجـا بگذارد لـذا اهمیت پروبیوتیکی آنها در آبزی پروری از جمله در کشـور مـا در پـرورش ماهی های قزل آلای رنگین کمان در آب لب شـور و شـور در اسـتان هایی که به صورت فصلی و یا در تمام سـال اقدام به پرورش این گونه ماهی می نمایند و همچنین پرورش ماهی در قفس های دریای که در شـمال و جنوب کشـور ما در حال توسعه می باشد می تواند مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات بیشـتر در خصوص نقش پروبیوتیک ها در شرایط مزرعه در کنترل و پیشگیری از بیماری ویبریوز توسط ویبریوهای بیماریزا و آزمایشات تکمیلی بیشـتر در خصوص شـاخص ایمنی غیراختصاصـی و اختصاصی از زمینه های تحقیقی برای پژوهش های بعدی می باشند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح های مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز و حمایت های مالی آن معاونت محترم به انجام رسیده است همچنین کارکنان بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، آزمایشگاه مرکزی و بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز مساعدت فراوانی را در اجرای این پژوهش نمودند که بدینوسـیله سپاسگزاری بعمل می آید. سرکار خانم دکتر انصاری لاری دانشیار محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز در انجام آزمون های آماری همکاری فراوانی مبذول داشتند.

پاورقی ها

1- Thiosulphate- cirate- bile salts- sucrose (Oxoid)
2- Brain hearth infusion agar (Merck)
3- Tryptic soy broth (Merck)
4- Double-agar layer method

منابع مورد استفاده

۱-غاضی س. و اخلاقـی م. (۱۳۷۶). پادتن های ضد باکتری ویبریو انگوئیلاروم در سـرم خون ماهی های قزل آلای رنگین کمان پرورشـی. مجله علمی شیلات ایران. سال ششم صفحات ۴۷-۵۹.

2- Actis LA; Tolmasky ME; Crosa J.H.(1999) *Vibriosis*. In: Fish diseases and disorders, Vol.3, viral, bacterial and fungal infections(eds P.T.K Woo and D.W Bruno). CAB International, London.

3- Austin B; Austin DA.(2007) *Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish,* 4rd ed. Springer, Praxis Publishing, UK.

4- Austin B; Stuckey LF; Roburtson PAW; Effend I; Griffith DRW. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. 18: 93-96.

5- Brunt J; Austin B.(2005) Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Journal of Fish Diseases.* 28: 693-701.

6- Buller NB.(2004) *Bacteria from fish and other aquatic animals, a practical identification manual.* CABI publishing, UK.

7- Depazo CP; Lemos ML; Lodeiros C; Bolinches J; Barja JL; Toranzo AE.(1988) Inhibitory activities of antibiotic- producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*. 65: 97-101.

8- Gatesoupe FJ.(1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.

9- Garrity GM; Holt JG.(2001) *The road map to the manual.* In; Brgey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed, Vol. 1 (eds D.R Boone and R.W Castenbolz). Springer, New York.

10- Gibson LF.(1999) *Bacteriocin activity and probiotic activity of Aeromonas. Journal of Applied Microbiology,* Symposium Supplement. 85: 243-248.

11-Irianto A; Austin B.(2002) Use of probiotics to contral furnculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). *Journal of Fish Diseases.* 25: 333-342.

12- Kennedy SB; Tucker JW; Thoresen M; Sennett DG.(1998) *Current methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae.* Aquaculture 98, World Aquaculture Society. Baton Rouge, p. 286.

13- Kim DH;Austin B.(2006) *Innate immune responses in rainbow trout*(*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum) *induced by probiotics*. Fish & Shellfish Immunology. 21: 513-524.

14- Miranda CD; Zemelman R.(2002) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean farming. *Aquaculture*. 212: 31-47.

15- Nikoskelaineu S; Ouwehand AC; Bulund G; Salminen S; Eas-Matti L.(2003) Immune enhancement of probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 443-452.

16- Olsson JC; Westerdhl A; Conway PL; Kjelleberg S.(1992) Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) of dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum. Applied and Environmental Microbiology*. 58: 551-558.

17- Qstergaard A; Embarek PKB; Wedell-Neergaard C; Huss HH; Gram L.(1998) Characterization of anti-Listerial lactic acid bacteria from Thai fermented fish products. *Food Microbiology.* 15: 223-233.

18- Quinn PJ; Carter ME; Markey B; Carter GR.(1994) *Clinical Veterinary Microbiology.* Wolf Publication, London.

19- Riquelme C; Hayashida G; Araya R; Uchida A; Satomi M; Ishida Y.(1996) Isolation of native bacterial strain the scallop *Argopecten*

coastal animals. *Journal of Marine Biotechnology*. 4: 220-225.

24- Tukmechi A; Morshedi A; Delirezh N.(2007) Changes in intestinal microflora and humoral mmune response following probiotic administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6: 1183-1189.

25- Vander Waaij D; Nord CE.(2000) Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria: an analysis and a new approach to this urgent problem. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 16: 191-197.

26- Vine NG; Leukes WD; Kaiser H; Daya S; Baxter J; Hecht T.(2004) Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases.* 27: 319-326.

27- West PA; Colwell R. R.(1984) *Identification of vibrionacea. An* overview. In: Vibrios in the environment (ed, Colwell). John Wiley Publication, NewYork.

purpuratus with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research.* 15 : 369-374.

20- Sakai M; Kobyashi M; Yoshida T.(1995) Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 110B: 755-759.

21- Stasiack AS; Bauman CP.(1996) Neutrophil activity as a potent indicator for concomitant analysis. *Fish and Shellfish Immunology.* 6: 537-542.

22- Sugita H; Matsuo N; Horose Y; Iwaa M; Deguchi Y.(1997) Vibrio sp.. Strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida. Applied of Environmental Microbiology*. 63: 4986-4989.

23- Sugita H; Matsuo N; Shibuya K; Deguchi, Y.(1996) Antibacterial substance-producing ability of the intestinal bacteria isolated from