بررسی اثر مهاری (*Staphylococcus equorum*) بر رشد (*Aeromonas dhakensis*) جداشده از روده ماهی سیم دریای خزر (*Abramis brama orientalis*) در شرایط آزمایشگاهی

نرگس مورکی*[۱]
عباس اخوان سپهی[۲]
سیده فلور مظهر[۳]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲، ۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*** مسئول مکاتبات:**
Nargess_Mooraki@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۵
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۲۰۱۶۴
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی می‌باشد.

چکیده

در این تحقیق اثر *Staphylococcus equorum* بر مهار رشد *Aeromonas dhakensis* جداشده از لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر بررسی شد. مطالعه فلور میکروبی روده می‌تواند در راستای مقاوم‌سازی ماهی در برابر بیماری‌ها، شناسایی باکتری‌های سودمند برای بهبود هضم و جذب غذا و تعریف ارتباط بین باکتری‌های سیستم گوارش و محیطزیست و غذای مصرفی سودمند باشد. فلور میکروبی روده دارای نقش مهم و اختصاصی در فرآیندهای متابولیک، غذایی و عملکردهای محافظتی دارد. *Aeromonas dhakensis* به‌طور طبیعی در ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر یافت می‌شود. به‌طورکلی سویه‌های متعلق به جنس *Aeromonas* به‌عنوان عوامل بیماری‌زا برای ماهیان شناخته می‌شوند. ازجمله باکتری‌هایی با پتانسیل کاربرد به‌عنوان سویه‌های پروبیوتیکی، سویه‌های متعلق به جنس *Staphylococcus* می‌باشند. از این گروه می‌توان به گونه *Staphylococcus equorum* اشاره نمود. به‌منظور بررسی اثر مهاری، ابتدا از باکتری‌ها کشت خالص تهیه گرد ید، سپس این تأثیر با بررسی شکل رشد پس از تلقیح باکتری *S. equorum* و باکتری روده‌ای *A. dhakensis* در محیط کشت BHI بررسی شد. علاوه بر آن تعداد کلنی‌های باکتری *A. dhakensis* تلقیح شده بر روی محیط کشت TSA در حضور *Staphylococcus equorum* نیز شمارش گردید. نتایج نشان داد که باکتری *Staphylococcus equorum* می‌تواند سبب کاهش رشد *Aeromonas dhakensis* بیماری‌زا گردد اما این کاهش معنی دار نسیت ($P> ۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: *Staphylococcus equorum*، *Aeromonas dhakensis*، اثر مهاری، ماهی سیم دریای خزر.

مقدمه

ماهی سیم با نام علمی *Abramis brama orentalis* یکی از ماهیان با ارزش اقتصادی دریای خزر است که در حوضه جنوبی دریای خزر و دلتای اکثر رودخانه‌هایی که به دریای خزر می‌ریزند ازجمله ولگا، اورال، ترک، کورا و رودخانه‌های کوچک سواحل لنکران و همچنین در تالاب انزلی و رودخانه‌های ورودی و خروجی آن و در رودخانه سفیدرود از مصب سد سنگر مشاهده می‌شود (کازانچف، ۱۳۷۱؛ عبدالملکی، ۱۳۸۳؛ عباسی و همکاران، ۱۳۸۷). این ماهی نیمه مهاجر متعلق به راسته کپور ماهی شکلان و خانواده کپور ماهیان می‌باشد

Archive of SID
www.SID.ir

(عباسی و همکاران، ۱۳۸۷). مطابق با آمار سازمان خواروبار جهانی (۲۰۱۲) صید جهانی این ماهی در سال ۱۹۹۹، ۴۶/۴۷۶ تن بوده که در سال ۲۰۱۰ به ۶۰/۱۴۳ تن رسیده است؛ از سوی دیگر در همین فاصله زمانی پرورش آن از میزان ۳۴۷ به ۱۷۸ تن بالغ شده است. با توجه به آمار ارائه‌شده، اتخاذ راهکاری به‌منظور کاهش سهم صید از منابع آبی و افزایش سهم تولید از طریق پرورش امری ضروری به نظر می‌رسد. با اذعان به این مطلب که ماهی سیم یکی از ماهیان مهم تجاری دریای خزر به شمار می‌آید و با توجه به سهم متوسط چربی در آنالیز شیمیایی آن، ماده اولیه مناسبی برای تولید فرآورده‌های کنسروی و دودی محسوب می‌شود (Sidrova, 2012; Anon, 2012). از سوی دیگر دخالت‌های انسانی و فعالیت‌های صنعتی ازجمله صید بی‌رویه این ماهی، آلودگی‌های رودخانه‌ای، از بین رفتن مکان‌های تخم‌ریزی سبب شده که ذخایر طبیعی این ماهی روبه کاهش رود (عبدالملکی، ۱۳۸۳). از راهکارها و اقدامات حفاظتی برای جلوگیری از کاهش ذخایر طبیعی می‌توان به رها کرد بچه‌ماهیان سیم و پرورش این ماهیان در استخرها اشاره نمود . در راستای این اهداف تغذیه مناسب و مقاوم‌سازی ماهی از اهمیت خاصی برخوردار است.

مطالعه فلور میکروبی روده می‌تواند در راستای مقاوم‌سازی این ماهی در برابر بیماری‌ها، شناسایی باکتری‌های سودمند مؤثر در بهبود هضم و جذب و تعریف ارتباط بین باکتری‌های سیستم گوارش و محیطزیست و غذای مصرفی سودمند باشد . همان‌طور که گفته شد فلور میکروبی روده دارای نقش مهم و اختصاصی در فرآیندهای متابولیک، غذایی و عملکردهای محافظتی دارد (Denev *et al*., 2000; Guarner and Malagelada, 2003). فلور میکروبی طبیعی و ساکن در لوله گوارش به‌طور جمعی فیزیولوژی روده میزبان را منتفع می‌نمایند. برخی از این اثرات مثبت شامل شرکت مؤثر در هضم و جذب مواد مغذی، شرکت در ایجاد کلنی مقاوم و فعالیت متضاد علیه عوامل بیماری‌زا و تعدیل سیستم ایمنی می‌باشد (Denev1996; Denev *et al*., 2000). از این رو ایجاد یک فلور میکروبی سالم نقش مهمی در ایجاد تنظیمات ایمنی و فیزیولوژیکی از طریق علائم بسیار مهم برای تکامل و بقا سیستم ایمنی دارد (Salminen *et al*., 2005). درک چگونگی واکنش کلی ماهی به فلور میکروبی تشکیل‌شده در لوله گوارش می‌تواند پایه مهمی برای تنظیم و کنترل ترکیب میکروبی هدف باشد. از این رو اتخاذ استراتژی‌های مناسب برای جلوگیری از بیماری و بهبود ماهیان با تأکید بر فلور میکروبی حائز اهمیت است (Gomez and Balcazar, 2008). با توجه به موارد ذکرشده در طول ده سال گذشته، میکروفلور ماهیان پرورشی نیز با هدف شناخت سویه‌های باکتریایی بازدارنده بیماری (پروبیوتیک‌ها) مورد مطالعه قرار گرفته است (Sugita *et al*., 1987; Onarheim and Raa, 1990; Westerdahl *et al*., 1991; Ringo *et al*., 1995). از جمله باکتری‌هایی با پتانسیل کاربرد به‌عنوان سویه‌های پروبیوتیکی، سویه‌های متعلق به جنس *Staphylococcus* می‌باشند. از این گروه می‌توان به گونه‌های *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. equorum* اشاره نمود که دارای خاصیت پروبیوتیکی می‌باشند (Soares *et al*., 2011). در تحقیقی که توسط مورکی و همکاران (۱۳۹۱) انجام شد مشخص گردید که سویه *Aeromonas dhakensis* به‌طور طبیعی در ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر یافت می‌شود. به‌طورکلی سویه‌های متعلق به جنس *Aeromonas* به‌عنوان عوامل بیماری‌زا برای ماهیان شناخته می‌شوند (Soto-Rodriguez *et al*., 2013; Burr *et al*., 2012) از این‌رو در این تحقیق هدف بررسی اثر کاربرد سویه *Staphylococcus equorum* بر مهار جمعیت سویه *Aeromonas dhakensis* موجود در فلور طبیعی لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماهیان سیم به تعداد ۱۰ عدد با میانگین وزن ۰/۲۶ ± ۳/۲۳ از حوضچه‌های ۱۱۰ لیتری مرکز تحقیقات سفیدرود واقع در استان گیلان در خرداد ماه ۱۳۹۱ به‌طور کاملاً تصادفی تهیه و به آزمایشگاه با رعایت اصول تطبیقی منتقل شدند. سپس سطح بدن ماهیان با استفاده از الکل اتانول ۷۰ درصد و بتادین استریل شده و لوله گوارش با ایجاد شکاف طولی در سطح شکمی جدا گردید . سپس محتویات لوله گوارش (روده‌ها) به‌منظور همگن‌سازی به هاون چینی استریل منتقل شد. پس از همگن‌سازی نمونه با استفاده از محلول نمکی استریل (سرم فیزیولوژی استریل) رقت سریالی از 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه گردید. از رقت‌های فوق در شرایط استریل حجمی معادل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و

Archive of SID
www.SID.ir

به پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI براث، BHI آگار، MRS آگار و MRS براث به ترتیب برای تشکیل کلنی و سپس شمارش و افتراق احتمالی باکتری‌های اسیدلاکتیک منتقل گردید. پلیت‌های فوق به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و سپس تعداد باکتری ها در هر یک از پلیت ها برحسب لگاریتم واحد کلنی (تعداد کلنی شمارش شده × عکس ضریب رقیق‌سازی = CFU) در هر گرم روده شمارش شدند . پس از اتمام دوره گرمخانه گذاری پلیت‌های حاوی محیط‌های جامد بررسی گردید بگونه‌ای که پس از شمارش تعداد کلنی ها، به تفکیک از روی محیط کشت جدا شده و مجدداً بر روی محیط کشت MRS آگار به‌صورت چهار مرحله‌ای کشت داده شدند و تهیه کشت خالص از کلنی‌ها صورت گرفت و در نهایت به‌منظور بررسی خصوصیت میکروسکوپی نمونه‌ها، از آن‌ها گسترش تهیه و رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت.

به‌منظور شناسایی باکتری *Aeromonas dhakensis* ابتدا با توجه به خصوصیات بیوشیمیایی، کلنی‌های خالص کشت یافته به محیط‌های کشت افتراقی منتقل و آزمون‌های TSI (Triple Sugar Iron)، تولید اندول ، تیل رد، تجزیه سیترات، اوره آز، کاتالاز، اکسیداز، آزمون VP (Voges-Proskauer)، تولید H_2S، کشت در محیط SS (*Salmonella Shigella*) آگار، کشت در محیط XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) آگار، آزمون آرژنین دکربوکسیلاز، لیزین دکربوکسیلاز و شناسایی حرکت سویه‌ها در محیط SIM (Sulfid-Indol-Motility) صورت گرفت. همچنین لام‌های تهیه شده از کلنی‌ها خالص نیز به‌منظور بررسی خصوصیات ریخت شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. ویژگی‌های مورد بررسی عبارتند بودند از اندازه کلنی، شکل، حاشیه، رنگ، شفافیت، قوام . سپس برای حصول اطمینان از تائید تشخیص *Aeromonas dhakensis* تعیین ترادف 16S rDNA نمونه‌ها انجام گرفت.

جهت استخراج DNA، انجام PCR و تعیین توالی DNA نمونه‌ها ابتدا کلنی‌های خالص شده در محیط LB (Lactose Broth) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و سپس با سانتریفوژ g× ۴۰۰۰ (R ۵۸۱۰Eppendorf) به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. DNA با استفاده از کیت استخراج ژنوم DNA باکتریایی شرکت سیناژن بر اساس پروتکل ارائه‌شده استخراج گردید. در این روش استخراج ۱۰۰ میکرو لیتر از هر نمونه سرم را با ۴۰۰ میکرو لیتر از محلول لیز کننده مخلوط کرده و برای ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شد. در این مرحله نمونه به‌طور کامل به‌صورت محلول یک دست درآمد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول رسوب دهنده را به مخلوط اضافه کرده و به وسیله حرکت دورانی به مدت ۳ تا ۵ ثانیه مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس در دور g× ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و به آرامی با وارونه کردن لوله و قرار دادن آن بر روی کاغذ برای ۲ الی ۳ ثانیه آن را خالی کرده و یک میلی‌لیتر بافر شستشو به رسوب حاصل اضافه و برای ۵-۳ ثانیه با چرخاندن مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دور g × ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس بافر شستشو را به‌طور کامل خالی کرده و برای ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. ماده تهنشین در ۳۰ میکرو لیتر از بافر حل کننده به وسیله تکان دادن آرام و قرار دادن در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه به‌طور کامل حل شد. مواد غیر محلول با سانتریفوژ به مدت ۳۰ ثانیه در دور g× ۱۲۰۰۰ ته نشین شد. ماده شناور رویی حاوی DNA خالص است. غلظت DNA با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

پس از جداسازی DNA نسبت به ازدیاد قطعه خاصی از ژنوم مطابق با آغازگر الیگونوکلوتیدی با توالی B1: 5´ AGAGTTTGATCCTGGCTTAG3´ B2: 5´ AAGGAGGTGATCCAGC3´ اقدام گردید. تکثیر ژن منتخب در محلولی با حجم ۵۰ میکرو لیتر صورت پذیرفت. در ادامه میکروتیوب‌ها در دستگاه Flexigene PCR مدل TECHNE (ساخت کشور آمریکا) قرار گرفت. دوره دمایی این آزمایش عبارت بود از ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه ۳۰ دور (Denaturation)، در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Annealing)، ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه (Extension) و پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه. محصولات به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تعیین توالی به شرکت Seq Lab آلمان ارسال شد. داده‌های حاصل از توالی یابی با استفاده از نرم‌افزارهایGeneRunner، BioEdit و انجام Blasting آنالیز شدند و ابتدا و انتهای

Archive of SID
www.SID.ir

قطعات مورد نظر مشخص و میزان شباهت آن با سایر توالی‌های مشابه موجود در بانک جهانی ژن NCBI (جدول ۱) بررسی شد (Altschul *et al.*, 1990).

برای تهیه سویه *Staphylococcus equorum* نیز به ترتیب بالا، تهیه کشت خالص از پروبیوتیک ترکیبی Bactocell، خریداری شده از شرکت Lallemand فرانسه صورت گرفت و سپس شناسایی سویه با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی و سپس تعیین ترادف 16S rDNA روی نمونه‌ها انجام شد.

جدول ۱: سویه‌های باکتریایی جدا و شناسایی‌شده به روش 16S rDNA مورد استفاده در تحقیق حاضر.

گروه فیلوژنتیک	نزدیک ترین قرابت	درصد دقت	طول نوکلوتید	شماره دسترسی
Staphylococcaceae	*Staphylococcus equorum*	۹۹/۹	۱۴۵۶	AB009939
Aeromonadaceae	*Aeromonas dhakensis*	۱۰۰	۱۴۱۶	AJ508765

جهت بررسی شکل رشد دو سویه باکتری به‌طور جداگانه ابتدا به تعداد لازم محیط کشت BHI براث با میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، آماده و اتوکلاو گردید. آب مقطر به میزان ۱۰ میلی‌لیتر برای تهیه مک‌فارلندهای مورد نظر (۰/۵، ۱، ۲ و ۳) استفاده شد و میزان کدورت دو سویه باکتری مورد سنجش قرار گرفت. بدین ترتیب که به‌طور جداگانه از سویه‌های *Staphylococcus equorum* و *Aeromonas dhakensis* کشت ۲۴ ساعته تهیه گردید؛ سپس به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط مایع از باکتری‌های مورد نظر با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند به میزان ۲ میلی‌لیتر در ارلن تلقیح گردید و سپس به فاصله هر ۳ ساعت یک‌بار میزان رشد باکتری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. آزمایش با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند و میزان تلقیح ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر در ارلن‌های مورد نظر به ترتیب بالا انجام گردید. همچنین در ادامه حجم‌های متفاوت تهیه شده ۱، ۲ و ۳ مک‌فارلند نیز با همان میزان تلقیح، به‌طور مجزا برای هر باکتری بررسی شد.

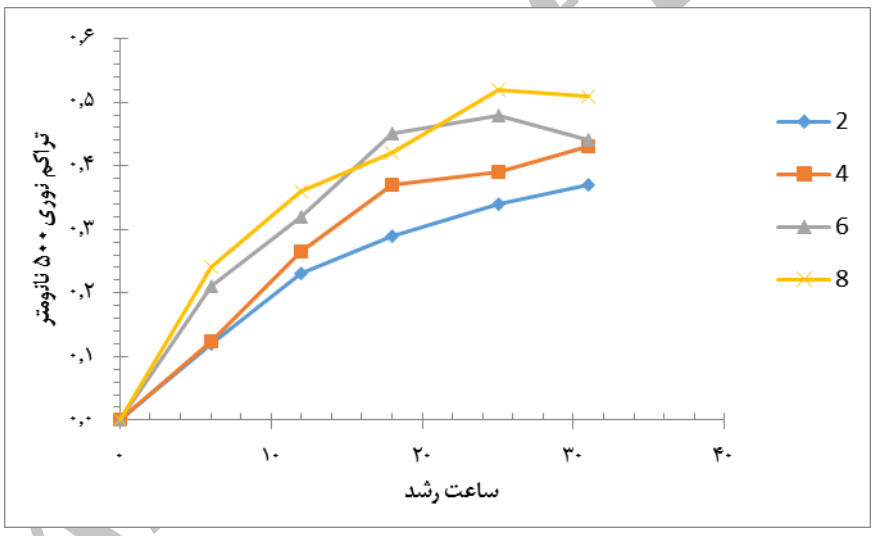
به‌منظور بررسی شکل رشد پس از تلقیح باکتری *S. equorum* و باکتری روده‌ای *A. dhakensis* بر محیط کشت ابتدا در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر به میزان ۷۵ میلی‌لیتر محیط کشت BHI برای تهیه گردید؛ ابتدا ۴ ارلن برای هرکدام از حجم‌های (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مک‌فارلند) مورد بررسی برای دو سویه مورد مطالعه تهیه شد. پس از اتوکلاو شدن محیط‌های مورد نظر از هرکدام از باکتری‌های تهیه شده به میزان ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مک فارلند به میزان ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر به محیط کشت BHI برای در کنار شعله تلقیح شد و به فاصله هر ۳ ساعت یک‌بار میزان اثر سویه *S. equorum* بر باکتری روده‌ای با دستگاه اسپکتوفتومتری (هیتاچی مدل U-2000) در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. قابل ذکر است برای بررسی اثر سویه *S. equorum* بر باکتری *A. dhakensis* جداشده از روده ماهی از کشت ۴۸ ساعت استفاده شد (Austin and Austin, 1987; Austin, 1988; Austin and Austin, 1989). برای شمارش تعداد کلنی‌های باکتریایی *S. equorum* و *A. dhakensis* تلقیح شده بر روی محیط کشت TSA، کلنی‌های کشت یافته و خالص شده دو سویه *S. equorum* و *A. dhakensis* که در مراحل قبلی مورد استفاده قرار گرفته بود، بر روی محیط کشت TSA آگار به‌طور همزمان در شرایط استریل با رقت ۲ مک‌فارلند و حجم تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس تعداد باکتری‌ها در هر یک از پلیت‌ها برحسب لگاریتم واحد کلنی (logCFU/g) با توجه به شکل کلنی‌ها، شمارش شدند (Austin and Austin, 1987; Austin, 1988; Austin and Austin, 1989). تعداد باکتری‌های حاصل از شمارش بر روی محیط کشت TSA مربوط به دو سویه *S. equorum* و *A. dhakensis* با توجه سه مرتبه انجام شدن هر کشت در حجم تلقیح‌های مشخص شده در بخش قبل وارد محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ گردید. پس از محاسبه مقدار میانگین و انحراف از معیار داده‌ها، نرمال بودن پراکنش داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov Smirnov بررسی گردید و به لحاظ نرمال بودن پراکنش،

Archive of SID
www.SID.ir

به‌منظور بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین تعداد باکتری‌های رشد یافته در رقت‌های مختلف از آزمون One-Way ANOVA و آزمون تکمیلی Bonferoni در سطح معنی‌داری P < ۰/۰۵ استفاده گردید.

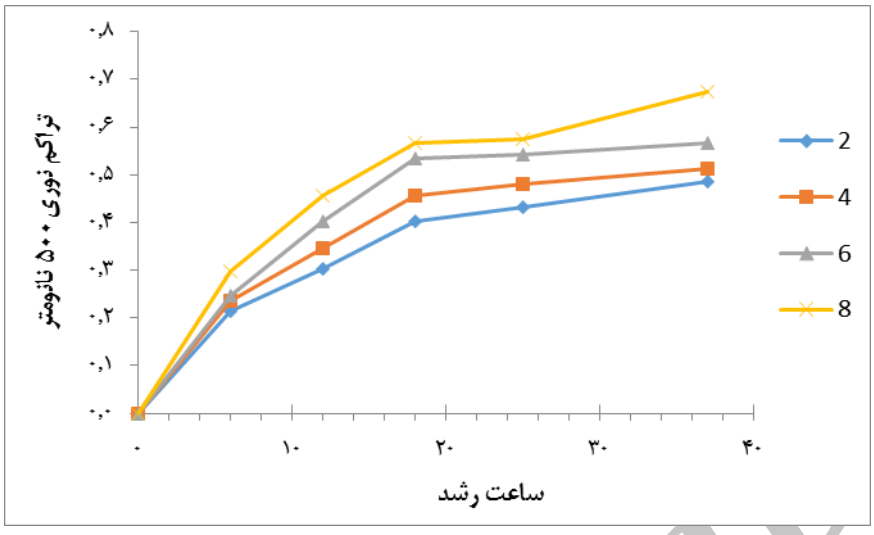
نتایج

بررسی شکل رشد سویه *Staphylococcus equorum* با رقت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مک‌فارلند و حجم تلقیح‌های متفاوت در شکل ۱ تا ۴ نشان داده شده است. با توجه به منحنی رشد این باکتری می‌توان استنباط نمود که هر چقدر میزان تلقیح باکتری از ۲ میلی‌لیتر به سمت ۸ میلی‌لیتر افزایش می‌یابد، میزان رشد باکتری افزا یش و در زمان طولانی‌تری به فاز سکون می‌رسد. به‌طورکلی با توجه به منحنی تمام تلقیح‌ها سویه در حدود بیست ساعت به حداکثر رشد خود رسیده‌اند. میزان تلقیح ۸ میلی‌لیتر کمی دیرتر از سایر میزان تلقیح‌ها به فاز سکون رسیده است و این را می‌توان استنباط نمود که هر چه تعداد باکتری بیشتری باشد زمان فعالیت باکتری نیز افزایش می‌یابد و هر چه میزان باکتری کمتر باشد تعداد سلول‌های باکتری از تراکم کمتری برخوردار می‌باشد و در نتیجه میزان کدورت در حجم تلقیح بالاتر بیشتر بوده است.



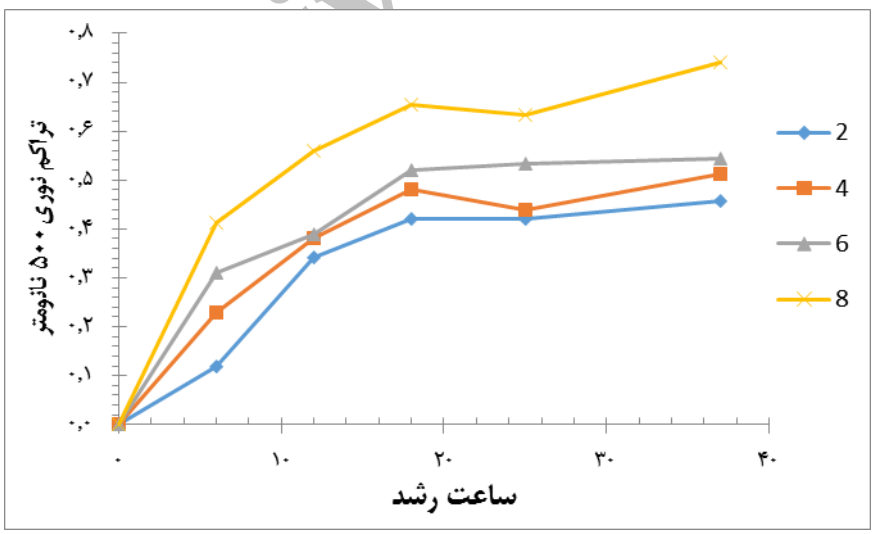
شکل ۱: میزان رشد باکتری *S. equorum* بتلقیح کدورت ۰/۵ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر(۱۳۹۱).

www.SID.ir



شکل ۲: میزان رشد باکتری *S. equorum* با تلقیح کدورت ۱ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر(۱۳۹۱).

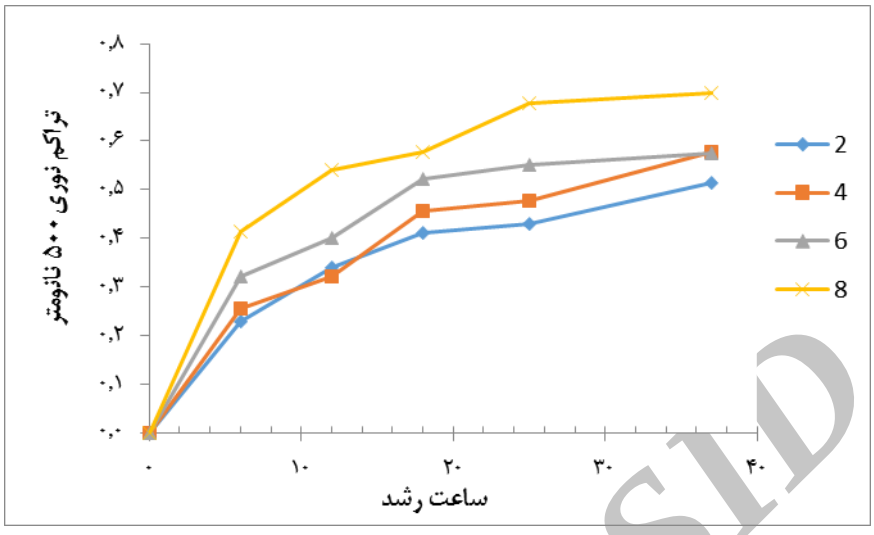
در کدورت ۱ مک‌فارلند منحنی رشد باکتری با افزایش میزان تلقیح باکتری افزایش‌یافته ولی تمام تلقیح‌های انجام‌شده تقریباً در بین ساعت ۱۸ به فاز سکون رسیده است، مشخص است که افزایش میزان تلقیح از ۲ میلی‌لیتر به ۸ میلی‌لیتر در کدورت و رشد باکتری اثر داشته است؛ اما زمان سکون شیب سایر میزان تلقیح‌ها بوده است؛ بنابراین می‌توان عنوان نمود که زمان فاز رشد و فاز سکون و فاز ثانویه در کلیه تلقیح‌ها یکسان بوده و این نشان می‌دهد فعالیت باکتری با میزان تلقیح رابطه مستقیم ندارد، بلکه جدای از حجم تلقیح، باکتری به رشد خود ادامه می‌دهد و میزان افزایش تلقیح تنها بر میزان کدورت باکتری اثر دارد.



شکل ۳: میزان رشد باکتری *S. equorum* با تلقیح کدورت ۲ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر(۱۳۹۱).

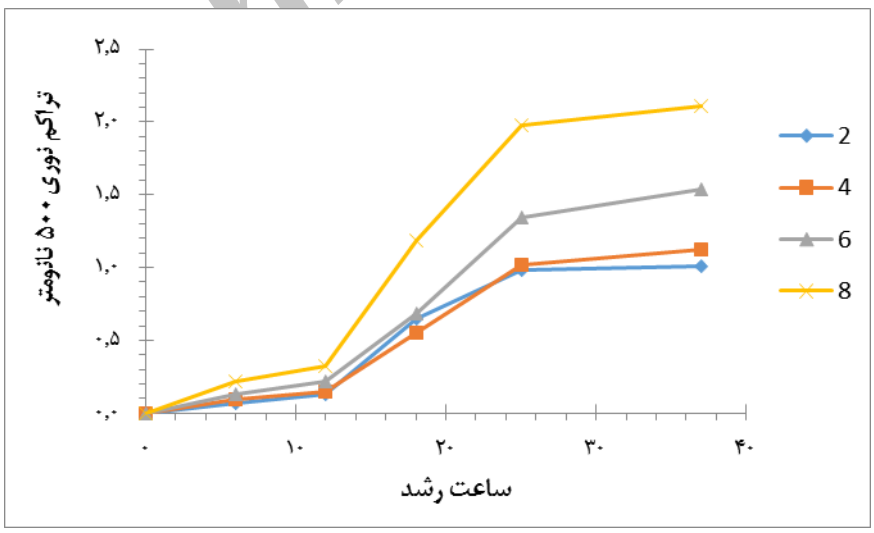
در شکل ۳ و ۴ نیز مشخص است که افزایش کدورت مک‌فارلند در زمان رسیدن باکتری به فاز رشد و فاز سکون و فاز ثانویه اثری نداشته و تنها بر میزان کدورت باکتری اثرگذار است و باکتری‌ها با میزان تلقیح‌های متفاوت به‌طور مشابه در زمان ۱۸ ساعت به حد بیشتری از رشد رسیده‌اند و مانند سایر نمودارها افزایش حجم تلقیح بر زمان رشد باکتری اثر نداشته است.

www.SID.ir



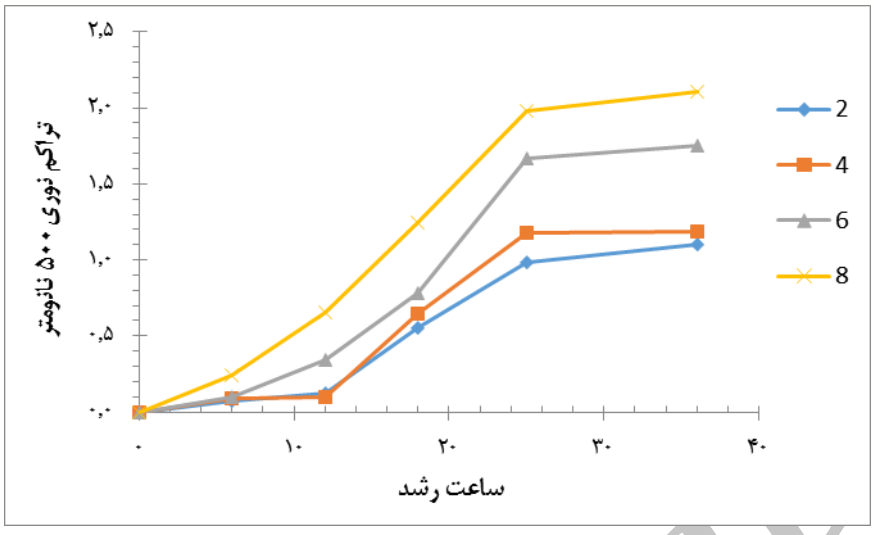
شکل ۴: میزان رشد باکتری *S. equorum* با تلقیح کدورت ۳ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر.

بررسی شکل رشد سویه *Aeromonas dhakensis* با رقت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مک‌فارلند و حجم تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ در شکل‌های ۵ تا ۸ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۵ در رابطه با رشد باکتری جداشده از رود ماهی، زمان آغازی رشد باکتری حدود ۱۲ الی ۱۳ ساعت به طول انجامیده است و میزان افزایش ، تلقیح باکتری بر این زمان اثری نداشته و پس از ۱۲ ساعت باکتری وارد فاز رشد شده و شیب رشد افزایش یافته که البته در تلقیح‌های ۶ و ۸ میزان شیب افزایش ولی میزان زمان رشد در تمام تلقیح‌های حاصل از باکتری ثابت مانده است و زمان رسیدن به فاز سکون نیز در تمام تلقیح‌ها ثابت بوده، ولی میزان کدورت افزایش یافته است. میزان کدورت بر زمان آغاز رشد، فاز رشد، فاز سکون و فاز ثانویه اثری نداشته است.



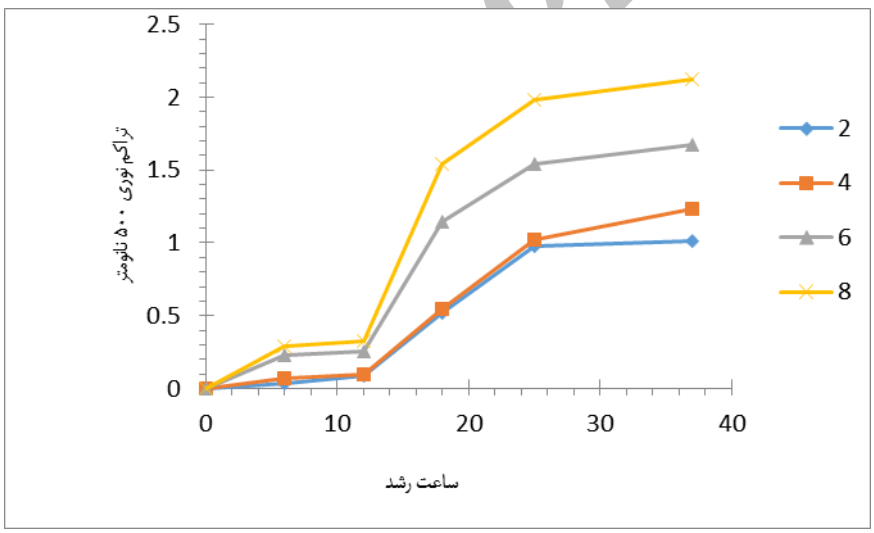
شکل ۵: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۰/۵ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

www.SID.ir



شکل ۶: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۱ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

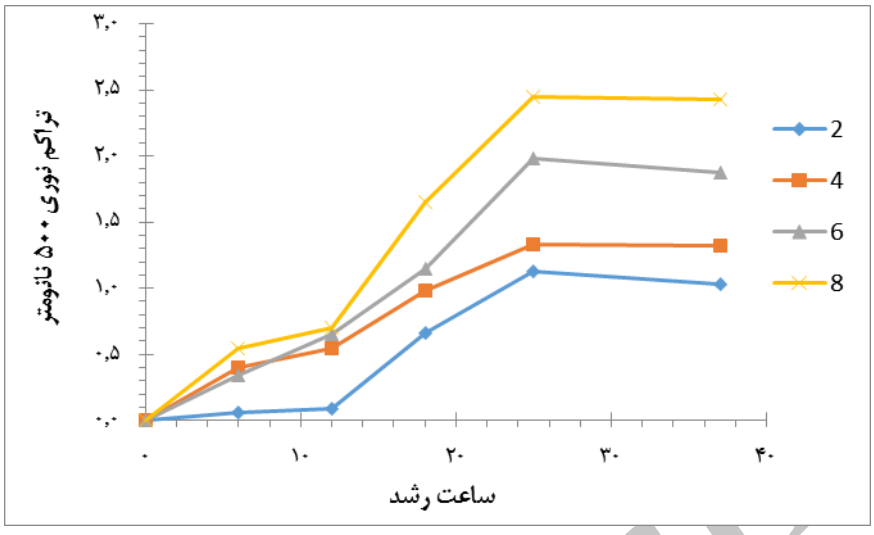
در شکل ۶ نیز مانند سایر اشکال کلیه تلقیح‌ها از زمان‌های ثابتی برخوردار بوده و فقط میزان شیب رشد با افزایش تلقیح افزایش یافته است.



شکل ۷: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۲ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

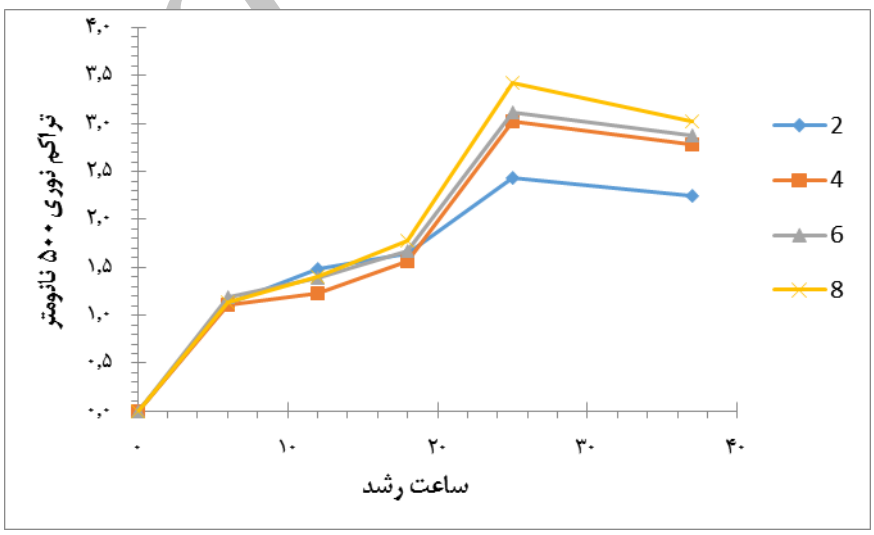
با توجه به اشکال ۷ و ۸ می‌توان چنین استنباط نمود که زمان آغاز رشد حدود ۱۲ الی ۱۳ ساعت به طول انجامیده و در این فاصله میزان افزایش تلقیح بر افزایش زمان اثری نداشته است و پس از گذشت ۱۳ ساعت باکتری وارد فاز رشد شده است و تا حدود ساعت ۲۶ الی ۲۷ زمان رشد باکتری به طول انجامیده که در این بین شیب رشد باکتری با افزایش تلقیح افزایش یافته ولی بر زمان رشد اثری نداشته است.

www.SID.ir



شکل ۸: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۳ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

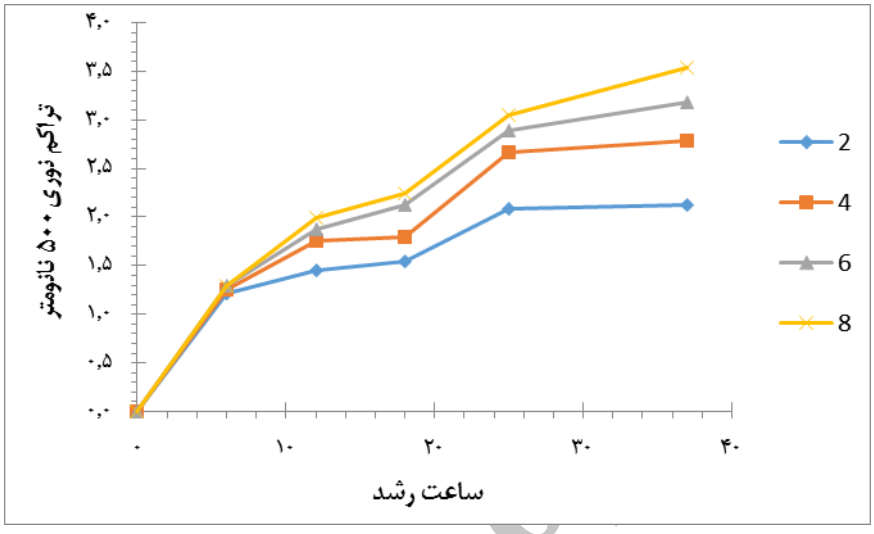
بررسی اثر مهاری باکتری *Staphylococcus equorum* بر روی شکل رشد *Aeromonas dhakensis* در اشکال ۹ تا ۱۲ نشان داده شده است. با توجه به منحنی رشد باکتری (*A. dehakensis*) جدا شده از روده ماهی سیم و باکتری (*S. equorum*) می‌توان چنین استنباط نمود که زمان آغاز به رشد باکتری به‌شدت کاهش یافته و باکتری سریع‌تر وارد فاز رشد شده است و شیب فاز رشد نیز نسبت به منحنی‌های رشد جداگانه باکتری‌های موردنظر کاهش یافته است و سپس باکتری وارد فاز سکون گردیده بدین معنی که پس از گذشت ۵ ساعت از تلقیح ، باکتری تا ساعت ۲۰ وارد فاز سکون شده است که این بیانگر مختل شدن میزان رشد طبیعی باکتری بوده و باکتری سریع‌تر وارد فاز سکون گردیده و سویه (*S. equorum*) دارای اثر مهارکنندگی می‌باشد و از رشد باکتری جلوگیری کرده است.



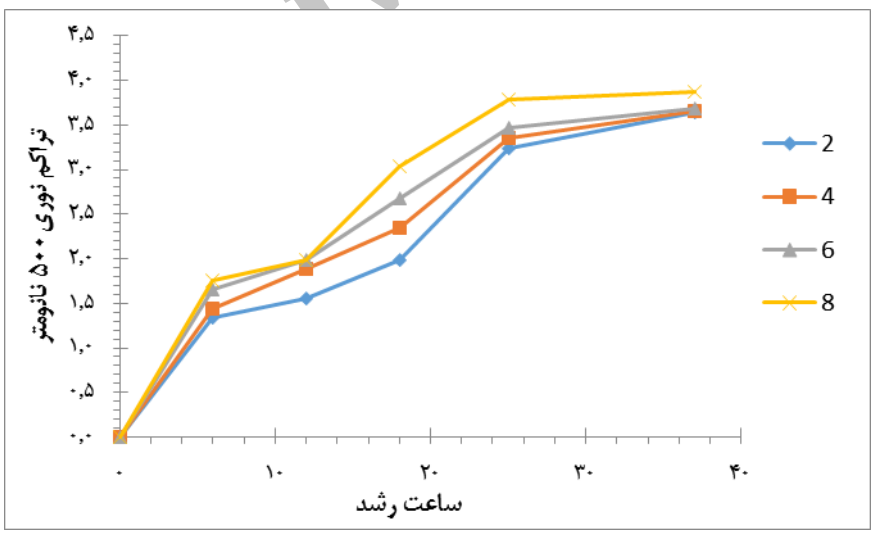
شکل ۹: میزان رشد باکتری *A. dhakensis* در حضور سویه *S. equorum* با تلقیح کدورت ۰/۵ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

www.SID.ir

با توجه به شکل ۱۰ نیز می‌توان چنین استنباط نمود که باکتری (*A. dehakensis*) با افزایش میزان مک‌فارلند و میزان افزایش رقت تلقیح از رشد کمتری برخوردار بوده و میزان افزایش تلقیح با کمترین میزان از نظر عملکرد یکسان بوده است و نقش مهاری بر باکتری مورد آزمایش مشهود است و باکتری سریع‌تر وارد فاز سکون شده است.



شکل ۱۰: میزان رشد باکتری *A. dhakensis* در حضور سویه *S. equorum* با تلقیح کدورت ۱ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

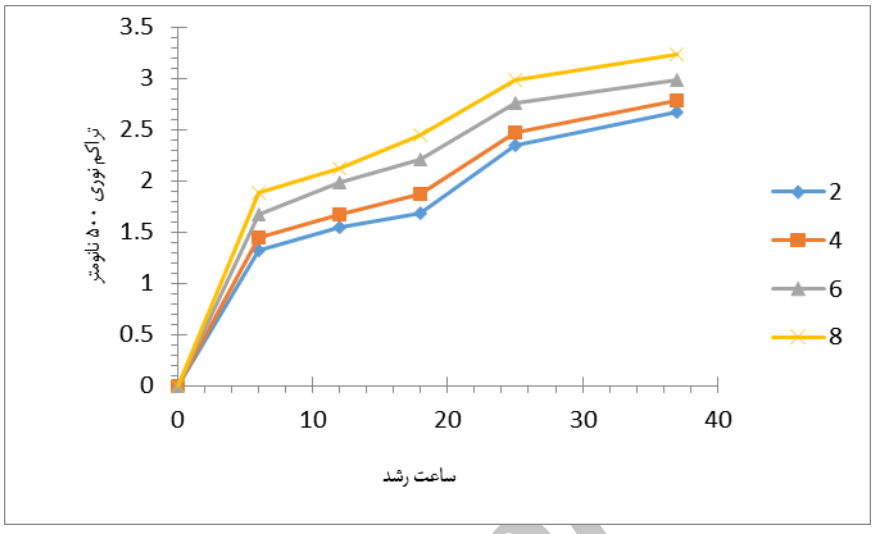


شکل ۱۱: میزان رشد باکتری *A. dhakensis* در حضور سویه *S. equorum* با تلقیح کدورت ۲ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

در اشکال ۱۱ و ۱۲ نیز مانند سایر نمودارها باکتری *S. equorum* اثر مهاری بر *A. dehakensis* داشته و از میزان رشد طبیعی باکتری جداشده از روده ماهی اثر منفی داشته و باکتری سریع‌تر وارد فاز سکون گردیده است. باکتری که در فاز سکون باشد از قدرت تکثیر و

www.SID.ir

افزایش تعداد سلول‌ها برخوردار نخواهد بود و وارد فاز مرگ می‌شود. در فاز ثانویه باکتری بیشتر از نقطه‌نظر تولید متابولیت‌ها حائز اهمیت می‌باشد و میزان تعداد سلول‌ها ثابت می‌ماند.



شکل ۱۲: میزان رشد باکتری *A. dhakensis* در حضور سویه *S. equorum* با تلقیح کدورت ۳ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته *A. dhakensis* بر روی محیط TSA در حضور سویه *S. equorum* به شرح جدول ۲ می‌باشد.

جدول ۲: نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته *A. dhakensis* بر روی محیط TSA در حضور سویه *S. equorum* با تلقیح کدورت ۳ مک‌فارلند و میزان تلقیح‌های ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

حجم تلقیح (میلی‌لیتر)	میانگین (انحراف معیار) کلنی (logCFU/g) *A.dhakensis**
۰	۷/۴۶±۰/۱
۲	۵/۱۱±۰/۰۲
۴	۵/۰۲±۰/۰۱
۶	۴/۹۲±۰/۰۳
۸	۴/۳۵±۰/۰۶

*: تعداد کلنی‌های *A. dhakensis* در حضور *S.equorum* کاهش یافته است اما این کاهش اختلاف معنی‌داری (P>0/05) را نشان نمی‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

Archive of SID
www.SID.ir

از دیدگاه زیست‌شناسی داشتن فلور میکروبی با ثبات ساکن لوله گوارش، در مقاومت طبیعی ماهی در برابر بیماری‌ها بسیار حائز اهمیت است. یکی از مسائل قابل‌توجه در خصوص میکروفلور لوله گوارش در ماهی تنوع و تعدد است، هرچند نقش انفرادی میکروب‌ها در سلامتی و تغذیه ماهیان هنوز چندان مورد مطالعه واقع نشده است. از این‌رو تحقیقات پیرامون فلور میکروبی روده برای پرورش ماهیان بسیار حیاتی و حائز اهمیت است . در این راستا تحقیقات زیادی بر روی فلور باکتریایی لوله گوارش ماهیان در سال‌های گذشته صورت پذیرفته است . بسیاری از گزارش ها نشان دادند که باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و گرم منفی نظیر *Acinetobacter, Alteromonas, Aeromonas, Bacteroides, Cytophaga, Flavobacterium, Achromobacter/Alcaligenes, Micrococcus, Moraxella, Pseudomonas, proteobacterium and Vibrio Spp.* و عضو غالب فلور میکروبی با منشأ درونی گونه‌های متنوعی از انواع ماهیان دریایی می‌باشند (Cahill, 1990; Onarheim *et al*., 1994; Blanch *et al*., 1997; RingØ *et al*., 2006; Brunvold *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2009). برخلاف ماهیان آب‌شور، فلور میکروبی با منشأ درونی گونه‌های ماهیان آب شیرین به‌صورت غالب متعلق به جنس‌های *Flavobacterium, Bacillus, Acinetobacter, Aeromonas, Pseudomonas, Plesiomonas, Esherichia, Klebsiella, Proteus, Staphylococcus,* Bacteroides (Obligate anerobic representatives) و *Clostridium, Fusobacterium,* می‌باشد (Sakata, 1990; Huber *et al*., 2004; Kapetanovic *et al*., 2005; Hovda *et al*., 2007; Kim *et al*., 2007). جمعیت‌های متفاوتی از جنس Aeromonas در طبیعت و مزارع پرورش ماهیان آب شیرین و همچنین لب‌شور دیده شده است (Liu *et al*., 2010; Burr *et al*., 2012). بسیاری از گونه‌های متعلق به این جنس به‌عنوان عوامل بیماری‌زا برای ماهیان شناخته می‌شوند (Soto-Rodrigues *et al*., 2013). برای مثال سویه *A. salmonisida sensu stricto* سبب ابتلا آزادماهیان به بیماری فورانکلوزیس می‌شود. گونه‌های مزوفیل این جنس نظیر *A. hydrophila* و *A. vernoii* سبب بروز بیماری‌های مشابهی در ماهیان نظیر عفونت اول‌سراتیو، بیماری دهان قرمز، سپتی سمی آیروموناس متحرک در کپور، تیلاپیا، سوف، گربه‌ماهی، آزادماهی، کاد و گوپی می‌گردد (Joseph and Caarnahan, 1994). سویه *Aeromonas dhakensis* یک سویه متحرک گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت با قابلیت تخمیر گلوکز و قابل‌شناسایی و رشد بر روی محیط‌های کشت TSA، BHI agar و MacConkey می‌باشد. این سویه قادر به تولید آنزیم‌های لیپاز، ژلاتیناز، DNAase، همولیز می‌باشد. این سویه به‌طور گسترده در کشورهایی با آب و هوای گرم انتشار دارد. همان‌طور که اشاره شد یک سویه بیماری‌زا بوده و از مارماهی اروپایی مبتلا به بیماری سپتیسمیای خون‌ریزی کننده (Estere and Alcaide, 2009)، از ماهیان زینتی و آکواریومی (Martinez-Murcia *et al*., 2008) و از مدفوع و لوله گوارش ماه‌طلایی رودخانه‌ای (Aravena-Roman *et al*., 2011; Esteve *et al*., 2012) جداشده است. بیماری‌زایی این باکتری به دلیل تولید فاکتورهای سمی شامل آنزیم‌های ترشح‌شده (Lui *et al*., 2010)، انتروتوکسین‌ها (Chopra *et al*., 1993; Stone *et al*., 1998)، همولیزین‌ها (Lijungh *et al*., 1981)، سیدروفور (Barghouthi *et al*., 1989)، آیرولیزین‌ها (Howard and Buckley, 1985) می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط Wu و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که جنس *Aeromonas* در محتویات و موکوس روده گربه‌ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) حضور دارد. گونه *Aeromonas dhakensis* شناسایی‌شده در این تحقیق، سبب مرگ بیش از ۴۰ درصد جمعیت تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) گردیده است (Soto-Rodriguez *et al., 2013*)، همچنین در تحقیق دیگری مشخص گردید که چنانچه متابولیت‌های خارجی تولید شده توسط این سویه به ماهی تیلاپیا نیل تزریق شود ، علائمی چون تورم شکم، تیره شدن رنگ پوست، خونریزی، شنا با حرکات لرزشی دیده شده و پس از گذشت ۱۲ ساعت مرگ صددرصد ماهیان مشاهده می‌شود. با توجه به پتانسیل بیماری‌زایی این گونه باکتری و حضور آن در فلور باکتریایی لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر و همچنین وجود گزارش‌های بسیار در خصوص ابتلا ماهیان پرورشی در ایران به این سویه باکتریایی و بروز خسارت‌های اقتصادی و از سوی دیگر با توجه به رویکرد کلی در صنعت آبزی‌پروری به استفاده از سویه‌های مفید باکتریایی (پروبیوتیک) به‌عنوان جایگزین مناسب و مؤثر آنتی‌بیوتیک‌ها (Balcazar *et al*., Weber *et al*., 1994)، در این تحقیق مشخص گردید که سویه *Staphylococcus equorum*

Archive of SID
www.SID.ir

می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مناسب درمان‌های شیمیایی در مواجه با سویه بیماری‌زای *Aeomonas dhakensis* مطرح باشد. گونه‌های متعلق به جنس *Staphylococcus* تقریباً در همه بخش‌های اکوسیستم انتشار داشته و دارای گونه‌های متعدد با نیچ‌های متنوع اکولوژیک می‌باشد. به‌طور طبیعی بر روی پوست و غشاء موکوسی جانوران خونگرم و انسان یافت می‌شوند و به همین دلیل گفته می‌شود که دارای رابطه هم‌زیستی با میزبان خود می‌باشند (Soares *et al.*, 2011). *Staphylococci* همچنین از طیف وسیعی از مواد غذایی نظیر گوشت، پنیر و شیر و بخش‌های مختلف محیط نظیر خاک، آب و هوا جداسازی گردیده‌اند (Heikens *et al.*, 2005; Kloos and Scheifer, 1986). مشخص شده است که برخی سویه‌ها دارای اهمیت و ارزش تکنولوژیک هستند و به‌طور عمده گونه‌های *S. xylosus*, *S.carnosus* و *S. equorum* را شامل می‌شود که همگی در گروه *Staphylococci* منعقد کننده منفی (CNS) جای می‌گیرند. در گروه CNS سویه *S. equorum* نمونه غالب از نقطه نظر تولید ترکیبات انتروتوکسیژن می‌باشد (Soares *et al.*, 2011). این سویه از نقطه نظر مرفولوژی یک سویه گرم مثبت، کروی شکل، غیر متحرک می‌باشد. Coton و همکاران در سال ۲۰۱۰ و همچنین Even و همکاران در سال ۲۰۱۰ حضور این گونه را در بسیاری از انواع مواد غذایی به مقدار قابل‌توجه گزارش نموده‌اند. در برخی مطالعات نیز مشخص گردیده که از این سویه به‌عنوان استارتر در مواد لبنی مانند پنیر استفاده می‌شود (Irlinger 2008; Bockelmann 2002). Zell و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سویه *S. equorum* قادر به تولید سم بوده و دارای مقاومت قابل‌توجه آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (Even *et al.*, 2010; Resch *et al.*, 2008). عمده مقاومت این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک به سبب تولید بتا- لاکتوماز می‌باشد (Soares *et al.*, 2011). این سویه دارای فعالیت ضعیف آمینوپپتیدازی است که به‌طور ترجیحی اقدام به هیدرولیز ال-متیونین، ال- لوسین و ال-آلانین می‌نماید؛ اما دارای فعالیت قابل‌توجه در برابر استرهای کوتاه زنجیره از اسیدهای چرب می‌باشد. همچنین دارای خاصیت لیپازی نیز می‌باشند (Talon *et al.*, 1995; Rosentein and Gotz, 2000; Sayari *et al.*, 2001). در بررسی نمودارهای رشد باکتری *Aeromonas dhakensis* همان‌طور که مشاهده شد، باکتری بعد از ۱۲ ساعت وارد فاز رشد گردید، یعنی در طول ۱۲ ساعت باکتری در مرحله آغاز رشد قرار دارد که البته زمان ۱۲ الی ۱۳ ساعت برای آغاز رشد به‌طور معمول در کلیه باکتری‌های موجود در طبیعت مشاهده می‌شود و پس از آن، زمان رشد باکتری ۲۰ الی ۲۳ ساعت از زمان آغازی رشد به طول می‌انجامد. پس از آن باکتری وارد فاز سکون شده و بعد وارد مرحله مرگ می‌شود. آنچه که در خصوص استفاده مفید از باکتری مورد نظر است در زمان فاز رشد باکتری قابل جستجو می‌باشد، هر چقدر زمان رشد باکتری طولانی‌تر باشد، باکتری جوان‌تر و بازده باکتری بیشتر است و به‌طور عکس هر چه زمان رشد باکتری کوتاه‌تر باشد، مدت زمان بازده ی باکتری نیز کاهش می‌یابد و باکتری سریع‌تر وارد فاز مرگ شده و میزان عملکرد باکتری محدودتر می‌شود. در منحنی‌های رشد باکتری *Aeromonas dhakensis* به‌تنهایی زمان رشد مناسب مشاهده گردید. ولی در منحنی‌های رشد به‌صورت ترکیب باکتری *Staphylococcus equorum* از زمان رشد طبیعی برخوردار نبوده و م یزان فاز رشد باکتری کاهش یافته است. می‌توان چنین استنباط نمود که باکتری *Staphylococcus equorum* بر میزان رشد سویه *Aeromonas dhakensis* اثر منفی داشته و میزان رشد باکتری را مهار نموده است و از تکثیر و افزایش باکتری‌های جداشده از روده باکتری جلوگیری نموده است. این یافته با توجه به نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی‌های باکتری *A. dhakensis* کشت یافته در حضور باکتری *S. equorum* نیز مشهود است. این بدان معناست که باکتری *Staphylococcus equorum* دارای پتانسیل مهار این سویه بیماری‌زا است و می‌توان از آن به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی استفاده نمود. این خاصیت سویه *Staphylococcus equorum* می‌تواند به سبب تولید محصولات آنزیمی خارج از سلولی نظیر لیپاز، پپتیداز، استراز و تأثیر آن‌ها بر رو سویه *A. dhakensis* باشد که البته پیشنهاد می‌گردد تحقیقاتی در خصوص مکانیزم بازدارندگی آن انجام شود که البته تکمیل کننده تئوری حاضر می‌باشد.

منابع

Archive of SID
www.SID.ir

عباسی رنجبر، ک.، ولی پور، ع. ر.، طالبی حقیقی، د.، سرپناه ع. ن. و نظامی، ش. ع.، ۱۳۸۷. اطلس ماهیان ایران، آب های داخلی گیلان . انتشارات مرکز تحقیقات شیلاتی گیلان، ۱۱۳ ص.

عبدالملکی، ش.، ۱۳۸۳. پویایی جمعیت ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) در سواحل ایرانی دریای خزر در سال ۱۳۸۰-۱۳۷۹. مجله پژوهش و سازنگی در امور دام و آبزیان، شماره ۶۸، صفحات ۱۵ تا ۲۳.

کارانجف، ای. ن.، ۱۹۸۱. ماهیان دریای خزر و حوزه آبریز آن . ترجمه: شریعتی، ا. ۱۳۷۱، سازمان چاپ و انتشارات وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی، تهران، ۱۷۱ ص.

مورکی، ن.، اخوان سپهی، ع. و مظهر، ف.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع زیستی فلور میکروبی ماهی سیم (*Abramis brama oreintalis*) دریای خزر. مجله اکوسیستم آبزی تالاب، در دست چاپ.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403–410.

Anon, S., 2012. Fresh water fishes of Iran. http://www.briancoad.com. Accessed date: 8 August 2012.

Aravena-Roman, M., Harnett, G. B., Riley, T. V., Inglis, T. J. and Chang, B. J., 2011. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. Journal of Clinical Microbiology, 49, 3006–3008.

Austin, B. and Austin D. A., 1989. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 317 P.

Austin, B., 1988. Methods in aquatic bacteriology. John Wiley and Sons Ltd, New York, 425 P.

Austin, B., and Austin, D. A., 1987. Bacterial Fish Pathogens: disease in farmed and wild fish. John Wiley and Sons, New York, 320p.

Balcázar, J. L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L. and Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal micro biota of fish. Aquaculture, 278: 188-191.

Barghouthi, S., Young, R. and Olson, M. O. J., 1989. Amonabactin, a novel tryptophan or phenylalaninecontaining phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. Journal of Bacteriology, 171: 1811–1816.

Blanch, A. R., Alsina, M., Simon, M. and Jofre, J., 1997. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Journal of Applied Microbiology, 82: 729-734.

Bockelmann, W., 2002. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. International Dairy Journal 12: 123–131.

Brunvold, L., Sandaa, R. A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H. and Bergh, Ø., 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Aquaculture, 272: 319-327.

Burr, S. E., Goldschmidt-Clermont, E., Kuhnert, P. and Frey, J., 2012. Heterogeneity of *Aeromonas* populations in wild and farmed perch, *Perca fluviatilis* L. Journal of Fish Disease, 35: 607–613.

Cahill, M. M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. Microbiology Ecology, 19: 21–41.

Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W. and Jin, G. F., 1993. Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. Canadian Journal of Microbiology 39: 513–523.

Coton, E., Desmonts, M. H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., Donnio, P.-Y., Lebert, I. and Talon, R., 2010. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. International Journal of Food Microbiology, 137: 221–229.

Denev, S. A., 1996. Probiotics – Past, Present and Future. Bulgarian Journal of Agricultural Sciences, 2:445-474.

Denev, S. A., Suzuki, I. and Kimoto, H., 2000. Role of Lactobacilli in Human and Animal Health. Animal Science, 71-6: 549-562.

Esteve, C. and Alcaide, E., 2009. Influence of diseases on the wild eel stock: the case of Albufera lake. Aquaculture, 289: 143–149.

Archive of SID

www.SID.ir

Esteve, C., Alcaide, E. and Blasco, M. D., 2012. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean. Spain Microbes Environment, 27: 367–373.

Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N. B., Charcornac, J. P., Lebert, I., Jamet, E., Desmonts, M. H., Coton, E., Pochet, S., Donnio, P. Y., Gautier, M., Talon, R. and Le Loir, Y., 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. International Journal of Food Microbiology, 139: 87–95.

FAO, 2012. Fisheries and Aquaculture department, *Abramis brama* (Linnaeus, 1758).

Gomez, G. D. and Balcazar, J. L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunology Medical Microbiology, 52: 145-154.

Guarner, F. and Malagelada, J. R., 2003. Gut flora in health and disease. The Lancet, 360-8: 512-519.

Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A. and Fluit, A. C., 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Microbiology, 43: 2286–2290.

Hovda, M. B., Lunestad, B. T., Fontanillas, R. and Jan Thomas Rosnes J. T., 2007. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 272: 581-588.

Howard, S.P. and Buckley, J. T., 1985. Activation of the holeforming toxin aerolysin by extracellular processing. Journal of Bacteriology, 163: 336–340.

Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T. and Gram, L., 2004. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 96: 117-132.

Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. International Journal of Food Microbiology, 126: 302–310.

Joseph, S. W. and Carnahan, A., 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. Annual Revision Fish Disease, 4: 315–343.

Kapetanovic, R., Sladic, D., Popov, S., Zlatovic, M., Kljajic, Z. and Gasic, M. J., 2005. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca, Codium dichotonium, Cystoseira adriatica and Fucus virsoides*. Journal Serb Chemistry Society, 70 -12: 1395-1400.

Kim, D. H., Brunt, J. and Austin, B., 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal Applied Microbiology, 102:1654-1664.

Kloos, W. E. and Schleifer, K. H., 1986. Genus IV. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Staphylococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp., 1013–1035.

Liu, P.C., Chuang, W. H., Tu, C. C. and Lee, K. K., 2010. Purification of a toxic cysteine protease produced by pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout. Journal of Basic Microbiology, 50: 538–547.

Ljungh, A., Wretlind, B. and Mollby, R., 1981. Separation and characterization of enterotoxin and two hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. ACTA Pathologica Microbiologica ET Immunologica Scandinavica section B, 89: 387–397.

Mart_ınez-Murcia, A. J., Saavedra, M. J., Mota, V. R., Maier, T., Stackebrandt, E. and Cousin, S., 2008. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. International Journal of System Evolution Bacteriology, 58: 1169–1175.

Onarheim, A. M. and Raa, J., 1990. Characteristics and possible biological significance of an autochronous flora in the intestinal mucosa of sea-water fish. In: Le´sel, R. ŽEd.., Microbiology in Poecilotherms. Elsevier ŽBiomedical Division. Amsterdam, pp. 197–201.

Onarheim, A. M., Wiik, R., Burghardt, J. and Stackebrandt, E., 1994. Characterization and identification of two Vibrio species indigenous to the intestine of fish in cold sea water; description of *Vibrio iliopiscarius* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 17: 370-379.

Resch, M., Nagel, V. and Hertel, C., 2008. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. International Journal of Food Microbiology, 127: 99–104.

Archive of SID
www.SID.ir

Ringø, E., Sperstad S., Myklebust, R., Refstie, S. and Krogdahl, A., 2006. Characterization of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua L*.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. Aquaculture, 261: 829-841.

Ringø, E., Strøm, E., Tabachek, J. A., 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquaculture Research, 26: 773-789.

Rosenstein, R. and Gotz, F., 2000. Staphylococcal lipase: biochemical and molecular characterization. Biochimie, 82: 1005–1014.

Sakata, T., 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. Microbiology in Poecilotherms (Ed. Lesel R.), Elsevier, Amsterdam, pp. 171-176.

Salminen, S. J., Gueimonde, M. and Isolauri, E., 2005. Probiotic that modify disease risk. Journal Nutrition, 135: 1294-1298.

Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S. and Gargouri, Y., 2001. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. Biochimie 83, 863–871.

Sidorva, M. A., 2012. *Abramis brama orientalis*, Berg 1949. CaspNIRKh, Astrakhan, Russia (available at: http://www.caspianenvironment.org) Accessed date: 7 August 2012.

Soares, J. C., Marques, M. R., Tavaria, F. K., Pereira, J. O., Malcata, F. X. and Pintado, M. M., 2011. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. International Journal Food Microbiology, 146(2):123-129.

Soto-Rodriguez, S. A., Cabanillas-Ramos, I., Alcaraz, U., Gomez-Gil, B. and Romalde J. L., 2013. Identification and virulence *of Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselli and Microbacterium paraoxy clans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. Journal Applied Microbiology, 115(3):654-62

Stone, A., Van Fleet-Stalder, V. and Chasteen, T. G., 1998. Following the Headspace Production of Organometalloids Produced by a Facultative Anaerobe Amended with Metalloidal Salts, 215th National ACS Dallas, March 26-April 2, 1998, Dallas, TX; ENVR. 46.

Sugita, H., Fukumoto, M., Tsunohara, M. and Deguchi, Y., 1987. The fluctuation of the fecal flora of gold fish, *carassius auratus.* Nippon suisan Gakkaishi, 53:1443-1442.

Talon, R., Doblet, N., Montel, M. C. and Cantonnet, M., 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. Current Microbiology, 30: 11–16.

Weber, J. T., Mintz, E.D., Canizares, R., Semiglia, A., Gomez, I., Sempertegui, R., Davila, A., Greene, K.D., Puhr, N. D. and Cameron, D. N., 1994. Epidemic cholera in Ecuador: multidrug resistance and transmission by water and seafood. Epidemiology and Infection, 112: 1-11.

Westerdahl, A., Olsson, J. C., Kjelleberg, S. and Conway, P. L., 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum.* Applied Environment Microbiology, **57**: 2223-2228.

Wu, S., Gao, T., Zheng, Y., Wang, W., Cheng, Y. and Wang, G., 2010. Microbial Diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish *(Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture, 303:1-7.

Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Hertel, C. and Götz, F., 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. International Journal of Food Microbiology, 127: 246–251.

Zhou, A., Liu, Y., Shi, P., He, S., Yao, B. and Ringø, E., 2009. Molecular characterization of the autochthonous microbiota in the gastrointestinal tract of adult yellow grouper (*Epinephelus awoara*) cultured in cages. Aquaculture, 286: 184-189.

Archive of SID

www.SID.ir