

آنالیز فیلوزنیک و تعیین الگوی آنتی‌بیوتیکی استرین‌های اشریشیا کلی جدادشده از سواحل منطقه گناوه

چکیده

اشرشیاکلی متعلق به گروهی از باکتری‌ها به نام گروه کلی فرم هستند که آن‌ها عضوی از خانواده انتروباکتریا سه می‌باشند. این باکتری برای سال‌ها به عنوان شاخص مدفعی برای سلامت عمومی در نظر گرفته شده است. اشرشیاکلی به عنوان یک ارگانیسم اصلی در انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی شناخته شده است. بر همین اساس هدف از تحقیق حاضر جداسازی سویه‌هایی از این باکتری از سواحل بندر گناوه و رسوبات آن است که به وسیله روش کلمونت از نظر ژنتیکی طبقه‌بندی گردد و به دنبال آن الگوی آنتی‌بیوتیکی و آزمیمی جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. در تحقیق حاضر تعداد ۶۰ نمونه (۳۰ آب و ۳۰ نمونه رسوبات بندر گناوه) در طول خرداد تا شهریور ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. سپس بیشترین تعداد احتمالی نمونه‌ها ارزیابی گردید و نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک‌کانکی و ائوزین متیلن بلو کشت داده شدند و به کمک رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز و اکسیداز مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس طبقه‌بندی گروه‌های فیلوزنیک سویه‌های اشرشیاکلی با استفاده از پرایم‌های اختصاصی *yjaA*, *chuA* و قطعه TSP4.C2 انجام شد و الگوی آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها ارزیابی گردید. از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۶ مورد اشرشیاکلی جداسازی گردید که ۵ نمونه مربوط به آب دریا و ۱ مورد مربوط به رسوبات بود. بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام تمامی جدایه‌ها به جنتامایسن، سفتراکسون و سفوتابکسیم با میزان ۱۰۰ درصد حساس بوده و شایع ترین گروه‌های فیلوزنیک شناسایی شده D, B2 و A بودند. بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گرفت که مؤثرترین آنتی‌بیوتیک بروی سویه‌های اشرشیاکلی جدادشده از این منطقه آنتی‌بیوتیک‌های سفتراکسون و سفوتابکسیم بود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در کنار سایر روش‌های درمانی بهتر است از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از اشرشیاکلی در این منطقه استفاده شود.

واژگان کلیدی: اشرشیا کلی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تریپلکس PCR، سواحل بندر گناوه.

مقدمه

اشرشیاکلی فلور نرمال مجاری گوارشی بیشتر جانوران و نیز انسان به شمار می‌آید. اغلب سویه‌های اشرشیاکلی بیماری‌زا نیستند، اما بعضی از سویه‌های پاتوژنیک آن می‌تواند باعث انواع بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای مانند سپتی سمی، منژیت نوزادی، گاستروانتریت، عفونت‌های زخمی و ادراری شوند (Gordon *et al.*, 2003).

آنالیز فیلوزنیک و تعیین الگوی آنتیبیوتیکی استرین‌های اشريشیا کلی جداشده از سواحل منطقه گناوه / سرداری و بهادر

کشورها به شمار می‌آید و اشريشیا یکی از ارگانیسم‌های مهم است که از طریق بلع غذای دریابی آلوده می‌تواند عامل عفونت گوارشی باشد که بروز این ارگانیسم در غذا مستقیماً وابسته به آلوگی مدفوعی و ارتباط آن با آب است (Faber *et al.*, 2010). بر همین اساس کیفیت ماهی قویاً در ارتباط با میکروارگانیسم‌های درگیر کننده آن است. بر همین اساس در سامانه‌های آبی جداسازی و شمارش تمامی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به دلیل تنوع بالای بیماری‌زاها، عدم دسترسی به روش‌های ساده و کم‌هزینه بسیار مشکل بوده، بنابراین جهت مانیتور نمودن روتین سامانه‌های آبی از باکتری‌های شاخص مدفوعی جهت ارزیابی آلوگی آبی استفاده می‌شود؛ بنابراین باور بر این است که فراوانی این گروه از باکتری‌ها می‌تواند در ارتباط با تراکم باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ مدفوعی باشد. امروزه اشريشیا کلی و انتروکوک های رودهای به عنوان معمول‌ترین شاخص آلوگی آب مطرح می‌باشند و در مطالعات اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Fewtrell and Bartram, 2001; Edberg *et al.*, 2000؛ گزارش‌ها مبنی بر آن است که رسوبات اطراف محیط‌های آبی حاوی باکتری‌های شاخص مدفوعی می‌باشند، به‌طوری‌که طی سالیان مختلف وجود این ارگانیسم‌ها در رسوبات جویبارها و دریاها) (Craig *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2008)، دریاچه‌ها (An *et al.*, 2002) و مناطق خلیجی (Roslev *et al.*, 2008) گزارش شده است. تحقیقات نشان داده است که اختلافات ژنتیکی فاحشی بین استرین‌های مختلف اشريشیا کلی وجود دارد بطوریکه Clermont و همکاران در سال ۲۰۰۰ آن‌ها را در چهار گروه شامل A, B1, B2, D دسته‌بندی نموده است. پس از آن در سال ۲۰۱۱ آن‌ها را از نظر ژنو تیبی به ۷ گروه دسته‌بندی نمود که بر اساس این روش ژنو تیبی ساده و سریع، پاتوتیپهای اشريشیا گروه‌بندی می‌شوند (Clermont *et al.*, 2011)؛ بنابراین با توجه به اهمیت این موضوع تحقیق حاضر برای اولین بار اقدام به جداسازی اشريشیا کلی از مناطق آبی و رسوبی بندر گناوه پرداخته که وضعیت این جدایه‌ها را از نظر ژنو تیبی در منطقه تعیین نماید و با ارزیابی الگوی فیلوزنیکی جدایه‌های به دست آمده سویه‌های بیماری‌زا تعیین هویت شوند و به دنبال آن بتوان هشداری به مردم منطقه داد.

مواد و روش‌ها

استان بوشهر یکی از جنوبی‌ترین استان‌های کشور است که در جنوب غربی و در فاصله ۲۷ درجه و ۱۸ دقیقه عرض جغرافیایی و ۵۰ درجه و ۵۸ دقیقه تا ۵۷ درجه و ۵۷ دقیقه طول جغرافیایی قرار دارد. بندر گناوه در شمال غرب این استان واقع شده است که دارای ۱۱۰ کیلومتر مرز آبی با خلیج فارس است (شکل ۱)؛ بنابراین مکان نمونه‌گیری شامل بخش‌هایی از آب دریای شهرستان گناوه و رسوبات ساحلی آن در نظر گرفته شد، بطوریکه نمونه‌برداری بیانگر کیفیت آب در مناطق تفریحی و شنا بوده و با توجه به مناطقی که دارای بیشترین تعداد شناگر هستند، صورت گرفت.



شکل ۱: تصویر ماهواره‌ای دریای شهرستان گناوه.

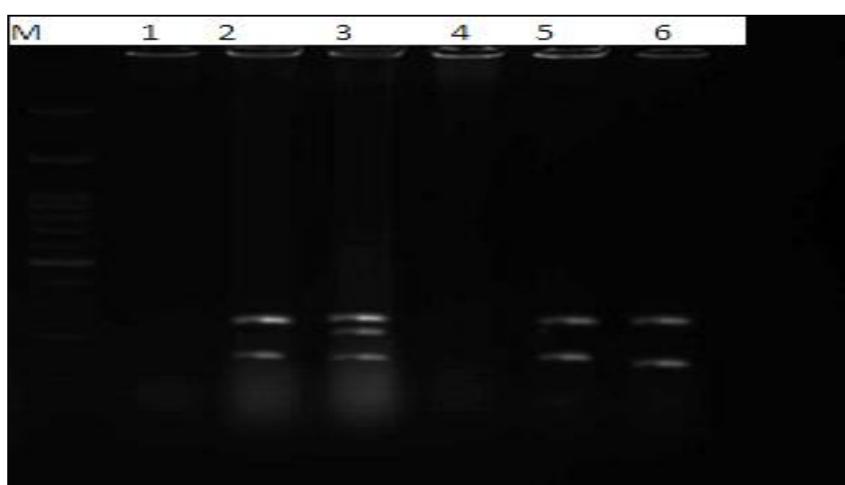
نمونه‌برداری از عمق ۱-۱/۵ متری آب که نشان‌دهنده بیشترین تعداد شناگر و استفاده‌کننده از آب صورت گرفت. همچنین نمونه‌برداری از عمقی که قوزک پا را می‌پوشاند و مختص مناطقی است که توسط بچه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد نیز صورت گرفت. نمونه‌ها از عمق ۲۰-۳۰ سانتی‌متری سطح آب (۳۰ نمونه) برداشت شدند و نمونه‌های رسوب (۳۰ نمونه) ساحل با استفاده از قاشق استریل از عمق ۱۰-۵ سانتی‌متری در ظروف شیشه‌ای استریل در محدوده زمانی ۱۰ تا ۱۱:۳۰ صبح هر دو هفته یکبار بین ماههای خداد تا شهریور ۱۳۹۴ انجام گرفت. پس از انجام فرآیند نمونه‌برداری، تمامی نمونه‌ها بروی بخ به آزمایشگاه منتقل شدند (Ramesh and Mathivanan, 2009). جهت جداسازی باکتری از نمونه‌های رسوب رقت سازی انجام گرفت و نمونه‌ها بر روی محیط کشت مک کانکی آگار منتقل گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس کلنی‌های تخمیرکننده لاکتوز به محیط کشت ائوژین متیلن بلاآگار منتقل گردید و کلنی‌های شاخص با ویژگی جلای فلزی به کمک رنگ آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز مورد شناسایی اولیه قرار گرفت (باسری و بهادر، ۱۳۹۱). سپس نمونه‌های اشرشیاکلی خالص شده را به منظور بررسی و ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به محیط کشت مولر-هیبتون آگار بروه شد و با استفاده از سواب به صورت سفره ابی کشت داده شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از انتشار دیسک‌های دیفیوژن مطابق دستورالعمل CLSI بروی آنتی‌بیوتیک‌های استریپ‌تومایسین (۱۰ میکروگروم-S)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگروم AM)، جنتامایسین (۱۰ میکروگروم GM)، سفتراکسون (۳۰ میکروگروم CRO) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگروم) انجام شد و سپس محیط مولر-هیبتون آگار حاوی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به مدت ۲۴ ساعت در محدوده دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس انکوبه گردید و پس از این مدت قطره‌های تشکیل شده (حساس بودن) و عدم تشکیل هاله (مقاوم بودن) در اطراف دیسک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (Forbes and Sahm., 2007). علاوه بر این فرضیه تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر باکتری‌های جداسده از محیط آب و رسوب به کمک آزمون‌های ناپارامتری کروسکال والیس به کمک نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج ثبت گردید. در نهایت کلیه ایزولهای شناسایی شده به منظور تایپینگ و گروه‌بندی فیلوزتیک با استفاده از روش مالتی پلکس PCR تعیین هویت شدند. جهت استخراج DNA ابتدا چند کلنی خالص از ارگانیسم در ۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطع استریل به صورت سوسپانسیون درآورده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس قرار داده شد. سپس نمونه‌ها سریعاً بر روی بخ به مدت ۵ دقیقه انتقال داده شد و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتی‌فورز گردید و سوپرناتنت جهت آمپلی فیکاسیون مورد استفاده قرار گرفت. طبقه‌بندی فیلوزتیک جدایه‌ها با استفاده از سه جفت پرایمر مار کر شامل chuA, yjaA TspE4C2 انجام پذیرفت (جدول ۱). آمپلی فیکاسیون در حجم ۲۵ میکرو لیتر با چرخه‌های دمایی دناتوراسیون اولیه در ۹۶ درجه سلیسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۵ ثانیه در ۹۴ درجه و ۱۰ ثانیه در ۵۷ درجه طی ۳۰ سیکل و طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. در نهایت محصول آمپلی فیکاسیون بر روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم برومید برده شد چاھک‌ها به سمت قطب منفی قرار گرفته و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. سپس عکس‌برداری از ژل در زیر نور ماورا بنفس انجام پذیرفت و نتایج به کمک مارکرها مورد آنالیز قرار گرفت (Abdallah et al., 2011).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR (Clermont et al., 2007)

	F	ChuA.1 (5'-GACGAACCA ACGGTCAGGAT-3')
۱	R	ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACC AAAGACA-3'), 279bp
	F	YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCAAGGAGACGCT G-3')
۲	R	YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTCTCAAC-3'), 211bp
	F	TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCGGGGCATTC-3')
۳	R	TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'), 152bp

نتایج

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر بیانگر آن است که در مجموع ۶ جدایه از منابع آبی منطقه مذکور جداسازی گردید که متعلق به سه گروه بوده است. با توجه به آنالیز انجام شده بر اساس روش Clermont و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۶ گروه به دست آمده متعلق به گروه A, B2, D است. در این میان، سه گروه D2، دو گروه زیر گروه A0 و یک گروه متعلق به B2₃ بوده است که هر یک از قطعه‌های ۲۷۹، ۲۱۱ و ۱۵۲ جفت بازی به ترتیب مربوط به ژن‌های *yjaA*, *chuA* و *TspE4C2* ارزیابی شده در شکل ۲ نشان داده شده است. علاوه بر این بر اساس نتایج آزمودن آنتی‌بیوگرام به دست آمده از ۶ نمونه اشريشیا کلی شناسایی شده و همچنین مقایسه با استانداردهای (CLSI ۲۰۱۱) بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین با میزان ۱۶/۶ درصد بود و از سوی دیگر بیشترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامايسین، سفترياکسون و سفوتاکسیم با ۱۰۰ درصد بوده است (جدول ۲).

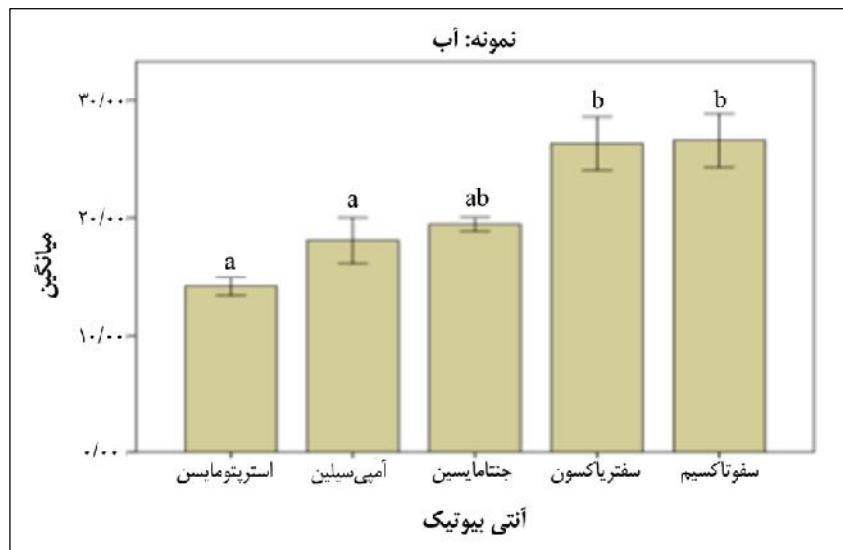


شکل ۲: تعیین فیلوزنی اشريشیا کلی‌های جداشده از آب و رسوبات به روش کلرومونت با استفاده از مولتی پلکس PCR. آنالیز از چپ به راست: مار کر (۱۰۰ bp) ستون ۱: نمونه ۱۶ (گروه A، عدم حضور ژن)، ستون ۲: نمونه ۱۷ گروه D, ۲۷۹ bp, ۱۵۲ bp, ۲۱۱ bp, ۲۷۹ bp, B2، ستون ۳: نمونه ۱۸ (گروه D، ۱۵۲ bp, ۲۷۹ bp, ۱۵ bp)، ستون ۴: نمونه ۱۹ (گروه A)، ستون ۵: نمونه ۲۰ (گروه D, ۲۷۹ bp, ۱۵۲ bp, ۲۷۹ bp, ۱۵ bp)، ستون ۶: نمونه ۲۱ (گروه D, ۲۷۹ bp, ۱۵۲ bp, ۲۷۹ bp, ۱۵ bp).

جدول ۲. درصد فراوانی الگوی آنتی‌بیوگرام باکتری اشريشیا کلی جداشده از نمونه‌های آب دریا و رسوب.

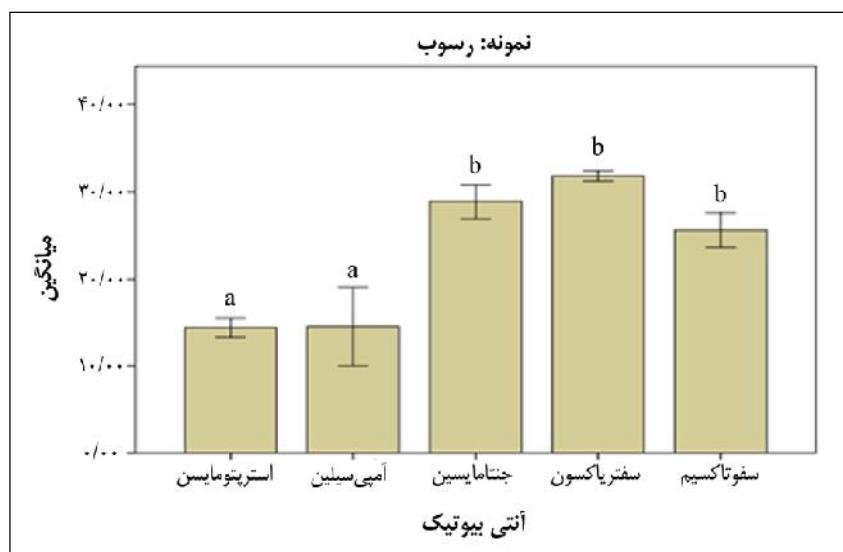
آنالیز	مقاآم و میانگین قطره‌های ایزووله‌های	درصد فراوانی، تعداد ایزووله‌های نسبتاً	درصد فراوانی تعداد ایزووله‌های	درصد فراوانی ایزووله‌های
استریتومايسین	-	-	-	-
آمپیسیلین	۱۰، ۱، ۱۶/۶ (درصد)	۸۲/۳، ۱۳.۵/۳	۱۶/۶ (درصد)	-
جنتامايسین	-	-	-	-
سفترياکسون	-	-	-	-
سفوتاکسیم	-	-	-	-

شکل ۳: تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی میانگین حاصل از اثر آن بر جدایه‌های بهدست‌آمده از آب



*حروف مشترک تفاوت معنی‌داری بین داده‌ها موجود نمی‌باشد.

شکل ۴: تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی میانگین حاصل از اثر آن بر جدایه‌های بهدست‌آمده از رسوبات



*حروف مشترک تفاوت معنی‌داری بین داده‌ها موجود نمی‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

آب‌گی آب‌های سطحی به دنبال میزان بالایی از انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها و پروتوزواها صورت می‌پذیرد. منشأ اصلی این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مدفوع انسان و حیوانات خونگرم می‌باشد که از طریق فاصلاب، راش خاک و سطح به محیط‌های

آبی منتقل می‌گردند (Quattara *et al.*, 2011) بنابراین حضور این ارگانیسم‌ها در منابع آبی و انتقال آن به انسان می‌تواند زمینه‌ساز بیماری‌های مختلفی باشد. استرین‌های اشريشیا کلی در چهار گروه فیلوزنیکی دسته‌بندی می‌شوند که هر یک می‌تواند نشانگر جایگاه خاص اکولوزیکی و تمایل آن به روند بیماری باشد (Walk *et al.*, 2007); بنابراین علم به این طبقه‌بندی می‌تواند در درک، پیش‌بینی و اپیدمیولوژی عامل بیماری‌زا کمک نماید. تحقیقات نشان داده است که استرین‌های D جز انتروپاتوژن‌ها بوده و گروه B2 پاتوتیپ‌هایی را که باعث بیماری‌های خارج روده‌ای می‌شوند دربرمی‌گیرد (Sabarinath *et al.*, 2011). استرین‌های اشريشیا کلی که باعث منتزیت نوزادی و سپتی سمی می‌شوند نیز در گروه D2 و B2 می‌باشند؛ بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر و سویه‌های شناسایی شده که در سه گروه مهم قرار دارند توجه به حضور این ارگانیسم‌ها در منطقه حاضر حائز اهمیت می‌باشد، چنان‌که می‌توانند به عنوان مهمترین عامل در عفونت‌های ادراری نیز به حساب آیند (Bingen *et al.*, 2002). از طرف دیگر ضمن تحقیقی که Quattara و همکاران طی سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۸ بر بستر رودخانه ایی شدت فرانسه و رسوبات اطراف انجام دادند و مقایسه انجام شده بر روی حضور اشريشیا کلی بیانگر آن بود که باکتری در مناطق آبی و رسوبی جداسازی شده بود، اما میزان آن در بخش آبی به مراتب کمتر از رسوبی بوده است درحالی که در تحقیق حاضر رسوبات حاصله فاقد استرین‌های مختلف اشريشیا بوده است و اکثر استرین‌ها متعلق به نمونه‌های آبی است. قابل توجه است که Fujioka و همکاران نیز به وجود این ارگانیسم در مناطق گرم‌سیری و سایر باکتری‌های پاتوژن می‌دانستند (Fujioka *et al.*, 1981). همچنین سایر محققین به حضور آن‌ها در مناطق گرم‌سیری و نیمه گرم‌سیری اشاره کرده بودند (Desmarais *et al.*, 2002) که می‌تواند زمینه‌سازی جهت حضور این ارگانیسم در خاک‌های آلوهه باشد و با خروج از سیستم گوارشی فرد و ایجاد تغییراتی در فیزیولوژی خود مانند تحمل مواد مغذی ناکافی، دمای بالا و نور توانایی بقا را کسب نماید (McLellan *et al.*, 2010) که شرایط ذکر شده با توجه به منطقه جغرافیایی کارشده در تحقیق حاضر نیز در ارتباط است و می‌تواند تأییدی بر آن باشد. از طرف دیگر غذاهای دریایی به‌ویژه انواع مختلف ماهیان دارای ارزش تغذیه‌ای زیادی بوده و در دهه اخیر مصرف آن‌ها در برخی از کشورهای جهان از جمله ایران رو به افزایش بوده است. البته به موازات افزایش مصرف ماهیان، میزان بیماری‌های ناشی (Feldhusen, 2000) از مصرف این فراورده‌ها در اثر آلوهگی به عوامل بیماری‌زا نیز افزایش یافته است. همچنین گزارش‌ها زیادی از وقوع سالمونلوز، شیگلوز، لیستریوز، ویبریوز و عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک آرئوس و اشريشیاکلی (Hosseini and Cheraghali, 2004) کلی در اثر مصرف غذاهای دریایی به‌ویژه ماهیان شور، دودی و میگوی آلوهه در ایران وجود دارد. به‌طوری که حسن‌زاده و همکاران نیز در سال ۱۳۹۲ قادر به جداسازی ویبریو از اسفنج‌های ماهیان شور، دودی و میگوی آلوهه شده از اسکله شهید حقانی بندرعباس شدند و ویبریو آجینولیتیکوس به عنوان گونه غالب در منطقه مذکور معرفی گردید (حسن‌زاده و همکاران ۱۳۹۳). همچنین راهیابی فاضلاب‌ها به منابع آبی محیط‌زیست امکان آلوهگی آب به باکتری‌هایی بیماری‌زا نظری سالمونلا، اشريشیاکلی و استافیلوکوک آرئوس را فراهم می‌سازد که آلوهگی به کلی فرم‌های مدفعی در غذاهای دریایی نظیر ماهی شور و دودی از اهمیت زیادی برخوردار است و سایر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که آلوهگی ماهیان (Sindayiaga and Debevere, 989) پرورشی به باکتری‌های بیماری‌زا بیش از ماهیان دریایی است.

بنابراین یکی از مهم‌ترین وظایف مسئولین بهداشتی در هر کشور اطمینان از سلامت مواد غذایی مصرفی توسط مردم جامعه است که برای نیل به این هدف از روش‌های مختلفی استفاده می‌گردد. به‌طوری که گزارش‌های متعددی در ارتباط با آلوهگی (Iwamoto *et al.*, 2010) آبزیان و حضور باکتری‌های اشريشیا کلی هموراژیک و انتروگریگاتیو ثبت و تائید شده است از طرف دیگر سویه‌های به دست آمده نسبت به آنتیبیوتیک‌های جنتامايسین، سفتریاکسون و سفوتاکسیم ۱۰۰ درصد حساس بوده و این درحالی که است که بیشترین مقاومت مربوط به آنتیبیوتیک آمپیسیلین با میزان ۱۶/۶ درصد می‌باشد. مقاومت باکتری‌های خانواده انتروباکتریا به عوامل ضد میکروبی مختلف به علت مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی، بسیار متغیر است. مقاومت اکتسابی درنتیجه مواجه با عوامل ضد میکروبی

به دست می‌آید و این خانواده که جز مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا به شمار می‌روند عموماً نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند که یکی از علتهای آن سو استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی و حوزه دامداری است که اغلب باعث (Gengoue *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2005) تغییرات فنوتیپی و نیز جهش‌های کروموزومی می‌گردد بر همین اساس با توجه به اهمیت موضوع و ارزآجایی که منطقه مورد ارزیابی در بخشی از سال موردنویجه گردشگران زیادی است و گروه‌های مختلف بیماری‌های روده‌ای و غیر روده‌ای در این منطقه به اثبات رسیده است، توجه به این اقلیم و حفاظت آن بسیار مهم بوده و می‌توان در تحقیقات بعدی به تعیین توزیع فراوانی و الگوی آنتی‌بیوتیکی این جدایه‌ها در زمان‌های مختلف سال پرداخت.

منابع

- باقری، م. و بهادر، ن. ۱۳۹۱. باکتری‌شناسی تشخیصی، انتشارات نوید.
- حسن‌زاده، ی.، بهادر، ن. و باصری صالحی، م. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی فنوتیپی ویبرو آجینولیتیکوس به صورت همزیست با اسفنج‌های خلیج‌فارس به وسیله کیت Api 20NE. مجله علمی پژوهشی زیست‌دریا، ۶(۲۳): ۸۸-۶۱.
- Abdallah, K. S., Cao, Y. and Wei, D. J., 2011.** Epidemiologic Investigation of Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) based on PCR phylogenetic group and fimH single nucleotide polymorphisms (SNPs) in China. International Journal of Molecular Epidemiology and Genet, 2: 339- 353.
- An, Y. J., Campbell, D. H. and Briedenbach, G. P., 2002.** *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediment at lake marinas. Environmental Pollution, 120(3): 771–778.
- Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., LoukilCh, Barraud D. and Bingen E. 2002.** Phylogenetic analysis and prevalence of Urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. Infection and Immunity, 70: 3216-3226.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. 2000.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied journal of Environmental Microbiology, 66: 4555-58
- Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S.T. and Denamur, E., 2011.** Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. Environmental Microbiology, 13:2468-2477.
- Craig, D. L, Fallowfield, H. J. and Cromar, N. J. 2002.** Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: Evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. Journal of Applied Microbiology, 93(4): 557–565
- Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Motamedifar, M., Motamedi, A., Bahadori, M. and, Naziri, Z., 2013.** Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. Molecular Biology Research Communications, 2(4):143-149
- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. and Palmer, C. J., 2002.** Influence of soil of fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. Applied journal of Environmental Microbiology, 68:1165-1172.
- Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J. and Allen, M. J., 2000.** *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, 88: 106S–116S.
- Faber, T. A., Hernot, D. C., Parsons, C. M., Swanson, K. S., Smiley, S., Bechtel, P. J. and Fahey, Jr., 2010.** Protein digestibility evaluations of meat and fish substrates using laboratory, avian, and ileal cannulated dog assays. Journal of Animal Science, 88: 1421-1432.

- Feldhusen, F., 2000.** The role of seafood in bacterial food-borne diseases. *Microbes and Infection*, Z, 1651-1660.
- Fewtrell, L. and Bartram, J., 2001.** Water quality: Guidelines, standards and health. *World Health Organization Water Series*, London: IWA. 20-21
- Forbes, B. A. and Sahm, D., 2007.** Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsiver, p.194-220
- Fujioka, R. S., Hashimoto, H. H., Siwak, E. B., and Young, R. H. F., 1981.** Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Applied journal of Environmental Microbiology*, 41:690-696.
- Gordon, D. and Cowling, A., 2003.** The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 149: 3575-3586.
- Hosseini, H. and Cheraghali, A. M., 2004.** Incidence of vibrio spp in seafood caught of south coast of Iran. *Food control*, 8(2): 91-98
- Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E. and Swerdlow, D. L., 2010.** Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 23: 399-411.
- McLellan, S. L., Huse, S. M., Mueller-Spitz, S. R., Andreischcheva, E. N., Sogin, M. L., 2010.** Diversity and population structure of sewage-derived microorganism in wastewater treatment plant influent. *Environmental Microbiology*, 12(2):378-392.
- Quattara, N.K., Passerat, J., and Servais P., 2011.** Faecal contamination of water and sediment in the rivers of the Scheldt drainage network. *Environ Monit Assess*. 1918-9.
- Ramesh, S. and Mathivanan, N., 2009.** Screening of marine *Actinomycetes* isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes, *World Journal of Microbiology*, 25(12): 2103-2111.
- Roslev, P., Bastholm, S. and Iversen, N., 2008.** Relationship between fecal indicators in sediment and recreational waters in Danish estuary. *Water Air and Soil Pollution*, 194(1-4): 13-21.
- Sabarinath A., Tiwari, K. P., Deallie, C., Belot, G., Vanpee, G., Matthew, V., Sharma, R. and Hariharan, H., 2011.** Antimicrobial resistance and phylogenetic groups of commensal *Escherichia Coli* isolates from healthy pigs in Grenada. *Webmed Central Veterinary Medicine*, 25:WMC001942
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1998.** In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sindayiaga, E. and Debevere, I. M., 1989.** Microbiological quality of dried and smoked fish from lake Tanganyika, *Sciences des Aliments*, 9(3): 507-516.
- Smith, J., Edwards, J., Hilger, H. and Steck, R. T., 2008.** Sediment can be a reservoir for coliform bacteria released into streams. *Journal of General and Applied Microbiology*, 54(3): 173-179.
- Walk, S. T., Alm, E. W., Calhoun, L. M., Mladonicky, J. M. and Whittam, T. S., 2007.** Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol*, 9: 2274-2288.
- Walsh, C., Duffy, G., O'Mahony, R., Fanning, S., Blain, I. S. and McDowell, D. A., 2005.** Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxigenic *Escherichia coli*- VT/EC. *International Journal of Food Microbiology*, 109(3):173-178.