

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

نرجس مورکی^{۱*}
عباس اخوان سپهی^۲
سیده فلور مظہر^۳

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. 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 *Aeromonas dhakensis* بر مهار رشد *Staphylococcus equorum* در جداسهده 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 متabolیک، غذایی و عملکردی محفوظی دارد. *Aeromonas dhakensis* به طور طبیعی در ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر یافت می‌شود. به طور کلی سویه‌های متعلق به جنس *Aeromonas* به عنوان عوامل بیماری‌زا برای ماهیان شناخته می‌شوند. از جمله باکتری‌هایی با پتانسیل کاربرد به عنوان سویه‌های پروپیوتیکی، سویه‌های متعلق به جنس *Staphylococcus* می‌باشد. از این گروه می‌توان به گونه *Staphylococcus equorum* اشاره نمود. به منظور بررسی اثر مهاری، ابتدا از باکتری‌ها کشت خالص تهیه گردید، 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 کلی‌های باکتری *A. dhakensis* تلقیح شده بر روی محیط کشت TSA در حضور *Aeromonas* نیز شمارش گردید. نتایج نشان داد که باکتری *Aeromonas dhakensis* می‌تواند سبب کاهش رشد *Staphylococcus equorum* بیماری‌زا گردد اما این کاهش معنی دار نسبت ($P < 0.05$).

واژگان کلیدی:

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

مقدمه

ماهی سیم با نام علمی *Abramis brama orientalis* یکی از ماهیان با ارزش اقتصادی دریایی خزر است که در حوضه جنوبی دریای خزر و دلتای اکثر رودخانه‌هایی که به دریای خزر می‌ریزند از جمله ولگا، اورال، ترک، کورا و رودخانه‌های کوچک سواحل لنگران و همچین 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.

(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 ۱۴۳/۶۰ 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 ارائه شده، 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 فرآوردهای کنسروی و دودی محسوب می‌شود (Sidrova, 2012; Anon, 2012). از سوی دیگر دخالت‌های انسانی و فعالیت‌های صنعتی از جمله صید بی‌رویه این ماهی، آلودگی‌های رودخانه‌ای، از بین رفتن مکان‌های تخریزی 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 بچه ماهیان سیم و پرورش این ماهیان در استخراجها اشاره نمود. در راستای این اهداف تقدیمه 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 به طور جمعی فیزیولوژی روده میزان را متسع 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 (Denev 1996; 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 تشکیل شده در لوله گوارش می‌توان پایه مهمنی برای تنظیم و کنترل ترکیب میکروبی هدف باشد. از این رو اتخاذ استراتژی‌های مناسب برای جلوگیری از بیماری و بیمار ماهی با تأکید بر فلور میکروبی حائز اهمیت است (Gomez and Balcazar, 2008). با توجه به موارد ذکر شده در طول ده سال گذشته، میکروفلور ماهیان پرورشی نیز با هدف گافتن سویه‌های باکتریایی بازدارنده بیماری (پروپیوتیک‌ها) مورد مطالعه قرار گرفته است (Sugita *et al.*, 1987; Onarheim and Raa, 1990; Westerdahl *et al.*, 1991; Ringo *et al.*, 1995) پروپیوتیکی، سویه‌های متعلق به جنس *Staphylococcus* می‌باشند. از این گروه می‌توان به گونه‌های *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. equorum* (Soares *et al.*, 2011) اشاره نمود که دارای خاصیت پروپیوتیکی می‌باشند (Aeromonas dhakensis) به طور طبیعی در ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی سیم دریای خزر یافت می‌شود. به طور کلی سویه‌های متعلق به جنس *Aeromonas* به عنوان 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* 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 $0/26 \pm 0/23$ از حوضچه‌های ۱۱۰ لیتری مرکز تحقیقات سفیدرود واقع در استان گیلان در خرداد ماه ۱۳۹۱ به طور کاملاً تصادفی تهیه و به آزمایشگاه با رعایت اصول تعییقی 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 محتويات 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 $1/0$ میلی‌لیتر برداشته و

به پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI براحت، 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 باکتری‌ها در هر یک از پلیت‌ها بر حسب 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 به‌گونه‌ای که پس از شمارش تعداد کلنی‌ها، به تفکیک از روی محیط کشت جدا شده و مجدداً بر روی محیط کشت MRS آگار به‌صورت چهار مرحله‌ای کشت داده شدند و تهییه کشت خالص از کلنی‌ها صورت گرفت و در نهایت به‌منظور بررسی خصوصیت میکروسکوپی نمونه‌ها، از آن‌ها گسترش تهییه 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 *Salmonella Shigella* SS (Xylose Lysine Desoxycholate) XLD آگار، کشت در محیط SIM (Sulfid-Indol-Motility) صورت گرفت. همچنین لامهای تهییه شده از کلنی‌ها خالص نیز به‌منظور بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. ویژگی‌های مورد بررسی عبارتند بودند از اندازه کلنی، شکل، حاشیه، رنگ، شفافیت، قوام. سپس برای حصول اطمینان از تأیید تشخیص *Aeromonas dhakensis* تعیین ترافق 16S rDNA نمونه‌ها انجام گرفت.

جهت استخراج DNA، انجام PCR و تعیین توالی DNA نمونه‌ها ابتدا کلنی‌های خالص شده در محیط (Lactose Broth) LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و سپس با سانتریفیوژ $\times 4000$ (R ۵۸۱۰ Eppendorf) به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. DNA با استفاده از کیت استخراج ژنوم DNA باکتریایی شرکت سیناژن بر اساس پروتکل ارائه شده استخراج گردید. در این روش استخراج ۱۰۰ میکرو لیتر از هر نمونه سرمه را با ۴۰۰ میکرو لیتر از محلول لیز کننده مخلوط کرده و برای ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتكس 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 $\times 12000$ سانتریفیوژ $\times 10$ 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 ۳-۵ ثانیه با چرخاندن مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دور $\times 12000$ سانتریفیوژ شد. سپس بافر شستشو را به‌طور کامل خالی کرده و برای ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. ماده تهشیزی 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 سانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه در دور $\times 12000$ ته نشین شد. ماده شناور رویی حاوی DNA خالص است. غلاظت DNA با اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد.

پس از جداسازی DNA نسبت به ازدیاد قطعه خاصی از ژنوم مطابق با آغازگر الیگونوکلوتیتی با توالی B1: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTTAG3' B2: 5' AAGGAGGTGATCCAGC3' محلولی با حجم ۵۰ میکرو لیتر صورت پذیرفت. در ادامه میکروتیوب‌ها در دستگاه TECHNE Flexigene PCR مدل (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 نرم‌افزارهای BioEdit، GeneRunner و انجام Blasting آنالیز شدند و ابتدا و انتهای

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 به استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی و سپس تعیین ترادف 16S rDNA روی نمونه‌ها انجام شد.

جدول ۱: سویه‌های باکتریایی جدا و شناسایی شده به روش 16S rDNA ۱۶S مورد استفاده در تحقیق حاضر.

شماره دسترسی	طول نوکلوتید	درصد دقت	نژدیک ترین قرابت	گروه فیلوزنیک
AB009939	۱۴۵۶	۹۹/۹	<i>Staphylococcus equorum</i>	Staphylococcaceae
AJ508765	۱۴۱۶	۱۰۰	<i>Aeromonas dhakensis</i>	Aeromonadaceae

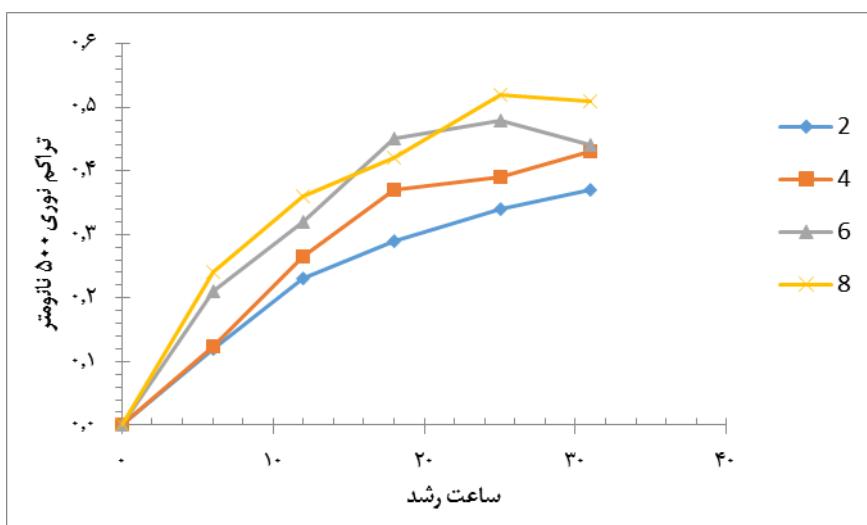
جهت بررسی شکل رشد دو سویه باکتری به طور جداگانه ابتدا به تعداد لازم محیط کشت BHI براحت با میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر در اrlen‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، آماده و اتوکلاو گردید. آب مقطار به میزان ۱۰ میلی‌لیتر برای تهیه مکفارلندهای مورد نظر (۳، ۲، ۱، ۰/۵) استفاده شد و میزان کدورت دو سویه باکتری مورد سنجش قرار گرفت. بدین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

به منظور بررسی شکل رشد پس از تلقیح باکتری *S. equorum* و باکتری روده‌ای *A. dhakensis* بر محیط کشت ابتدا در اrlen‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر به میزان ۷۵ میلی‌لیتر محیط کشت BHI برای تهیه گردید؛ ابتدا ۴ اrlen برای هر کدام 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 هر کدام از باکتری‌های تهیه شده به میزان ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ مکفارلند 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 اسپکتروفوتومتری (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 کلی‌های باکتریایی *A. dhakensis* و *S. equorum* TSA تلقیح شده بر روی محیط کشت، کلی‌های کشت یافته و خالص شده دو سویه *S. equorum* که در مراحل قبلی مورد استفاده قرار گرفته بود، بر روی محیط کشت TSA آغاز به طور همزمان در شرایط استریل با رفت 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 بر حسب لگاریتم واحد کلری (logCFU/g) با توجه به شکل کلی‌ها، 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 *A. dhakensis* و *S. equorum* 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،

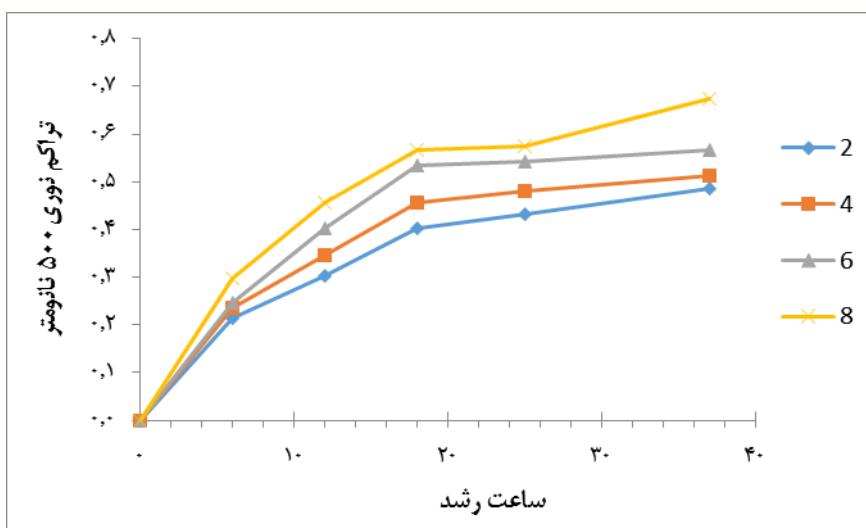
به منظور بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین تعداد باکتری‌های رشد یافته در رقت‌های مختلف از آزمون One-Way ANOVA و آزمون تکمیلی Bonferroni در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ استفاده گردید.

نتایج

بررسی شکل رشد سویه *Staphylococcus equorum* با رقت‌های ۵/۰، ۲، ۶ و ۸ مکفارلندر 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 افزايش و در زمان طولانی‌تری به فاز سکون می‌رسد. به‌طور کلی با توجه به منحنی تمام تلقیح‌ها سویه در حدود بیست ساعت به حد اکثر 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.

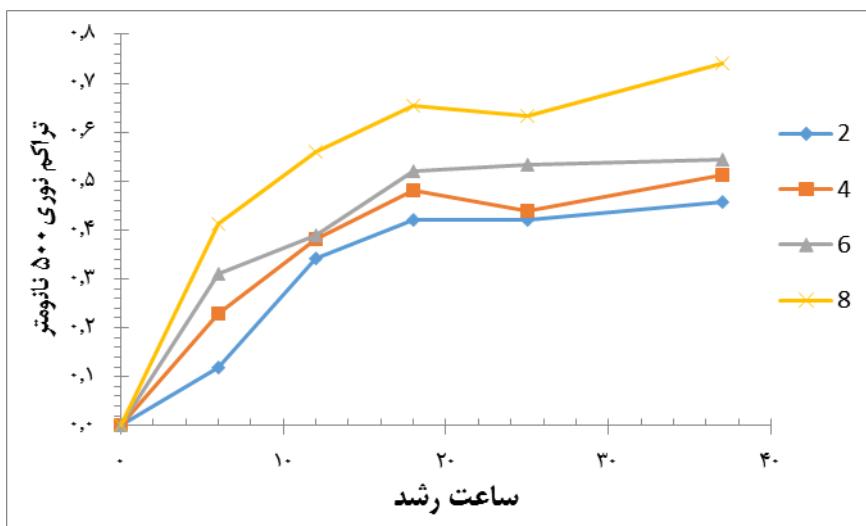


شکل ۱: میزان رشد باکتری *S. equorum* مبتلقیح کدورت ۵/۰ مکفارلندر و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).



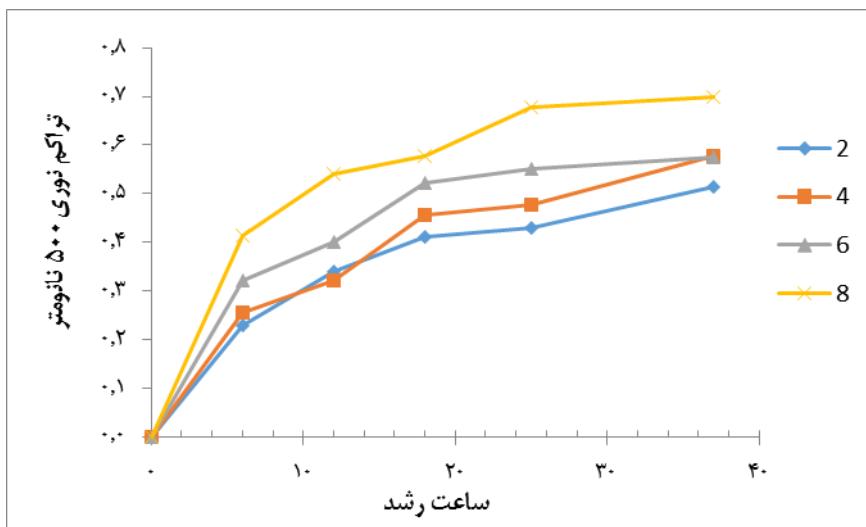
شکل ۲: میزان رشد باکتری *S. equorum* با تلکیح کدورت ۱ مکفارلند و میزان تلکیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی لیتر (۱۳۹۱).

در ک دورت ۱ مکفارلند منحنی رشد باکتری با افزایش میزان تلکیح باکتری افزایش یافته ولی تمام تلکیح‌های انجام شده تقریباً در بین ساعت ۱۸ به فاز سکون رسیده است، مشخص است که افزایش میزان تلکیح از ۲ میلی لیتر به ۸ میلی لیتر در ک دورت و رشد باکتری اثر داشته است؛ اما زمان سکون شمع شایر میزان تلکیح‌ها بوده است؛ بنابراین می‌توان عنوان نمود که زمان فاز رشد و فاز سکون و فاز ثانویه در کلیه تلکیح‌ها یکسان بوده و این نشان می‌دهد فعالیت باکتری با میزان تلکیح رابطه مستقیم ندارد، بلکه جدای از حجم تلکیح، باکتری به رشد خود ادامه می‌دهد و میزان افزایش تلکیح تنها بر میزان ک دورت باکتری اثر دارد.



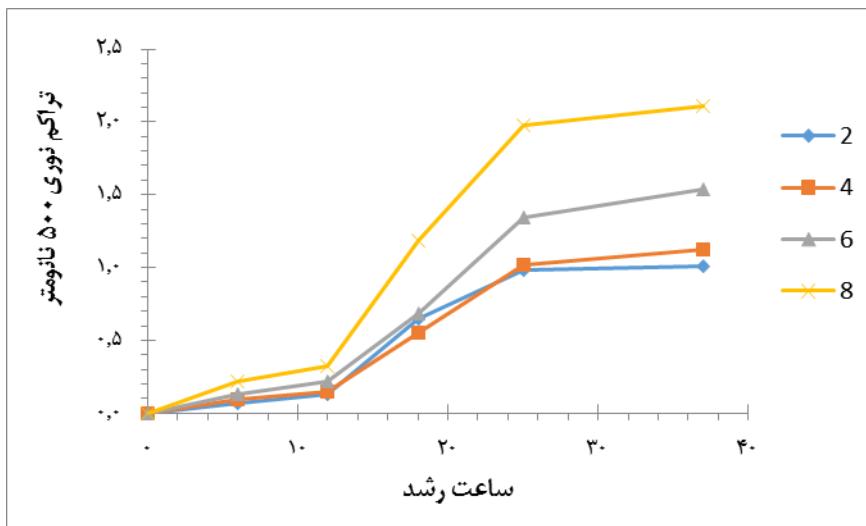
شکل ۳: میزان رشد باکتری *S. equorum* با تلکیح کدورت ۲ مکفارلند و میزان تلکیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی لیتر (۱۳۹۱).

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

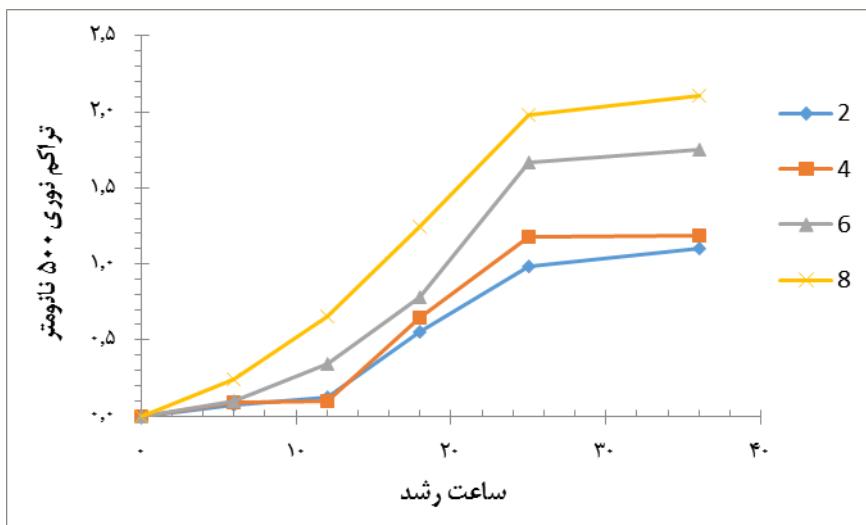


شکل ۴: میزان رشد باکتری *S. equorum* با تلقیح کدورت ۳ مکفارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر.

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 جداسده 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 شبی رشد افزایش یافته که البته در تمام تلقیح‌های ۶ و ۸ میزان شب 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.

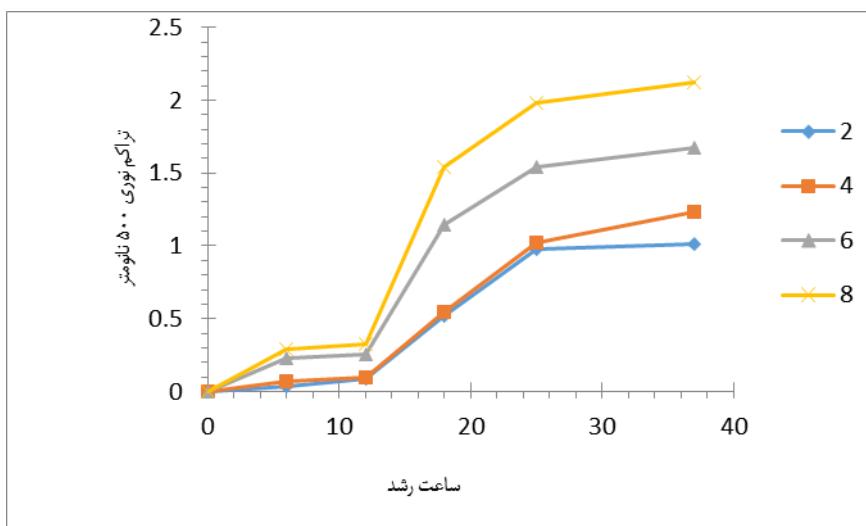


شکل ۵: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۰/۵ مکفارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).



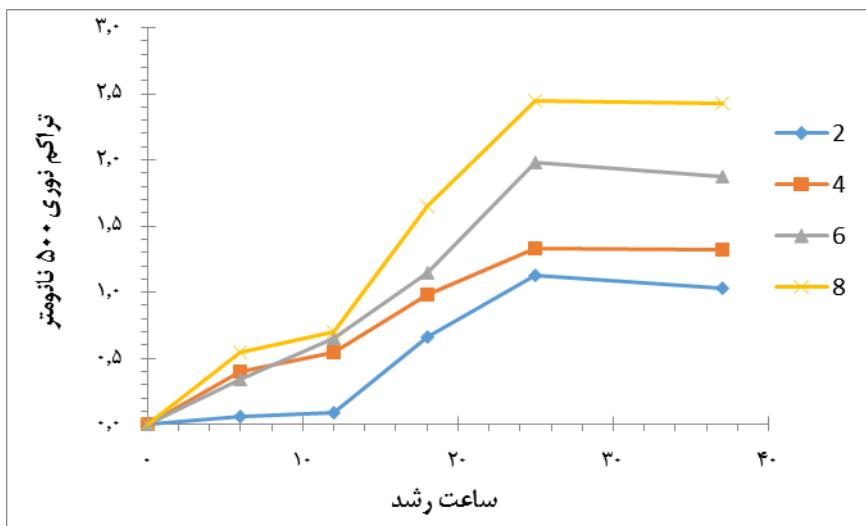
شکل ۶: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۱ مکفارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

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.



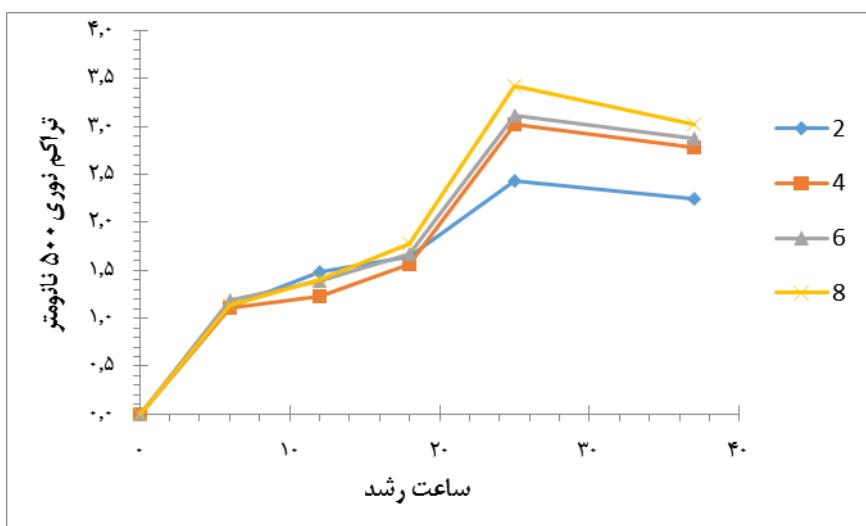
شکل ۷: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۲ مکفارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

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.



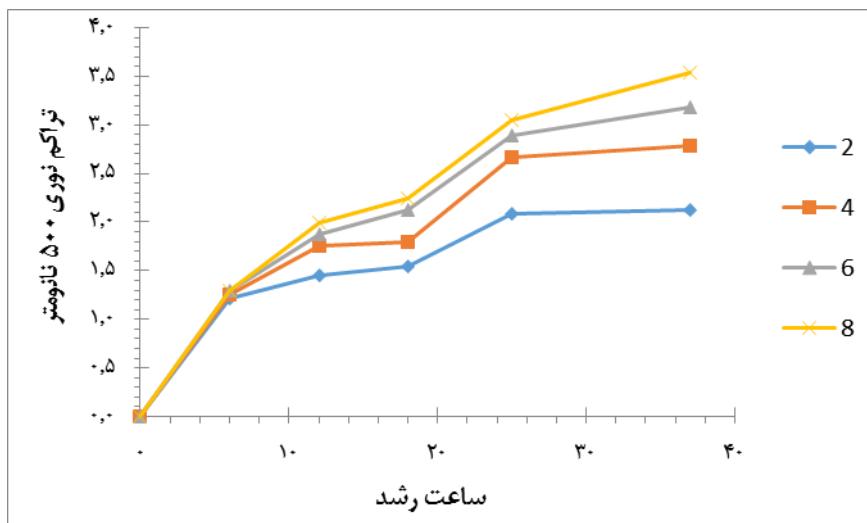
شکل ۸: میزان رشد باکتری *A. dehakensis* با تلقیح کدورت ۳ مکفارلندر و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

بررسی اثر مهاری باکتری *Aeromonas dhakensis* بر روی شکل رشد *Staphylococcus equorum* 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 شبی فاز رشد نیز نسبت به منحنی‌های رشد جدایانه 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.

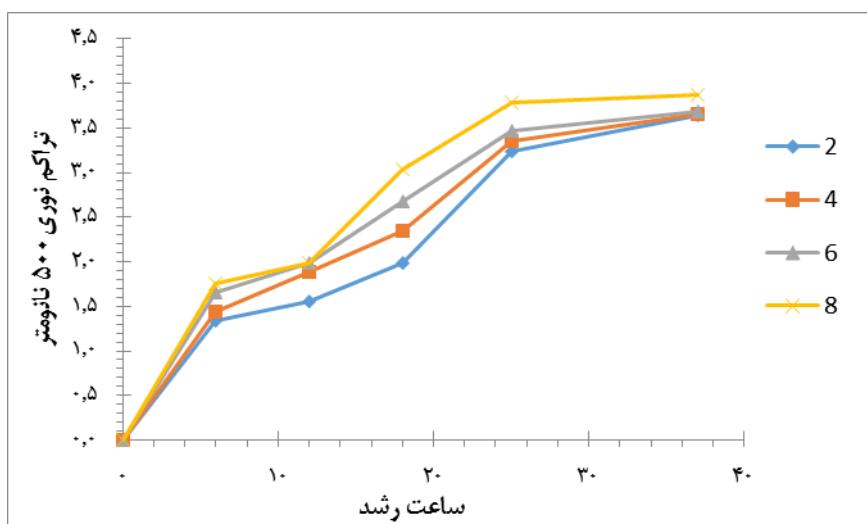


شکل ۹: میزان رشد باکتری *A. dhakensis* در حضور سویه *S. equorum* با تلقیح کدورت ۵/۰ مکفارلندر و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

با توجه به شکل ۱۰ نباید می‌توان چنین استنباط نمود که باکتری (A. dehakensis) با افزایش میزان مکفارلند و میزان افزایش رفت 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.



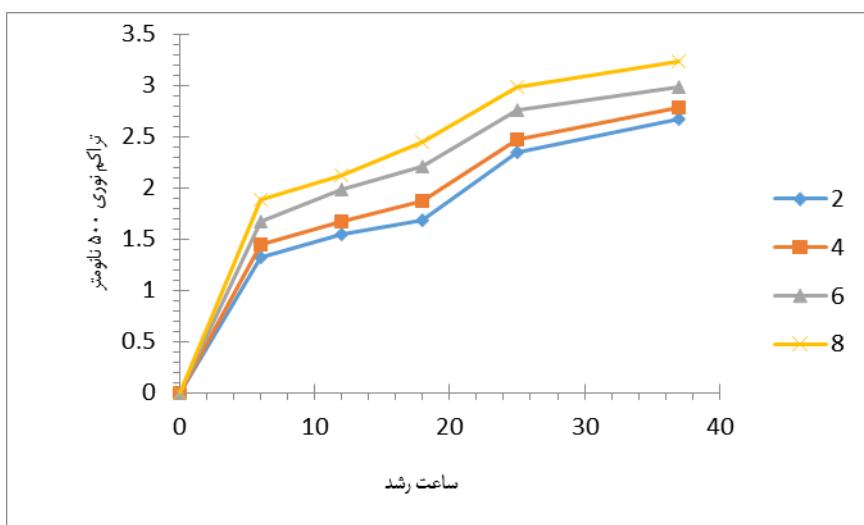
شکل ۱۰: میزان رشد باکتری A. dehakensis در حضور سویه S. equorum با تلقیح کدورت ۱ مکفارلند و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی لیتر (۱۳۹۱).



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

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

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 مکارلن و میزان تلقیح‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌لیتر (۱۳۹۱).

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

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

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

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

بحث و نتیجه‌گیری

از دیدگاه زیست‌شناسی داشتن فلور میکروبی با ثبات ساکن لوله گوارش، در مقاومت طبیعی ماهی در است. یکی از مسائل قابل توجه 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 گزارش‌ها نشان دادند که باکتری‌های بی‌هوایی اختیاری و گرم منفی نظیر *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Achromobacter/Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Vibrio Spp.* و *Moraxella*, *Pseudomonas*, *proteobacterium and Cahill*, 1990; *Onarheim et al.*, 1994; *Blanch et al.*, 1994). در خلاف ماهیان آب‌شور، فلور میکروبی با منشأ درونی گونه‌های متنوعی از انواع ماهیان دریایی می‌باشد (RingØ *et al.*, 2006; Brunvold *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). درونی گونه‌های ماهیان آب شیرین به صورت غالب متعلق به جنس‌های *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Esherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, Sakata, 1990; (Clostridium, *Fusobacterium*, *Bacteroides* (Obligate anaerobic representatives) (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 ۵-ج-نین لب‌شور دیده شده است (Liu *et al.*, 2010; Burr *et al.*, 2012). بسیاری از گونه‌های متعلق به این جنس به عنوان عوامل بیماری‌زا برای ماهیان شناخته می‌شوند (Soto-Rodrigues *et al.*, 2013). برای مثال سویه *A. salmonisida sensu stricto* سبب ابتلاء آزادماهه‌لف به بیماری فورانکلوزیس می‌شود. گونه‌های مزوپلیل این جنس نظیر *A. vernoii* و *A. hydrophila* سبب بروز بیماری‌های مشابهی در ماهیان نظری غ Fonot اول‌سرایی، بیماری دهان قرمز، سپتی سمی آیروموناس متحرک در کپور، تیلاپیا، سوف، گربه‌ماهی، آزادماهی، کاد و گوبی می‌گردد (Joseph and Caarnahan, 1994). سویه *Aeromonas dhakensis* یک سویه متحرک گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت با قابلیت تخمیر گلوكز و قابل شناسایی و رشد بر روی محیط‌های کشت TSA و BHI agar, MacConkey قادر به تولید آنزیم‌های لیپاز، ژلاتیناز، DNAase, همولیز می‌باشد. این سویه به طور 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 زیستی و آکواریومی (Martinez-Murcia *et al.*, 2008) و از مدفعه و لوله گوارش ماهیان رودخانه‌ای شامل آنزیم‌های ترشح شده (Lui *et al.*, 2010)، انتروتوکسین‌ها (Stone *et al.*, 1998)، همولیزین‌ها (Howard and Buckley, 1985)، آیولیزین‌ها (Howard and Buckley, 1985)، سیدروفور (Howard and Buckley, 1985)، Lijungh *et al.*, 1981) در مطالعه انجام شده توسط Wu و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که جنس *Aeromonas* در محتويات و موکوس روده گربه‌ماهی (Pelteobagrus fulvidraco) حضور دارد. گونه *Aeromonas dhakensis* شناسایی شده در این تحقیق، سبب مرگ بیش از ۴۰ درصد جمعیت تیلاپیای نیل (Oreochromis niloticus) (Soto-Rodriguez *et al.*, 2013) گردیده است (Oreochromis niloticus) در تحقیق دیگری مشخص گردید که چنانچه متابولیت‌های خارجی تولیح 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 صدرصد ماهیان مشاهده می‌شود. با توجه به پتانسیل بیماری‌زا این گونه باکتری و حضور آن در فلور باکتریایی لوله گوارش ماهی سیم دریایی خزر و همچنین وجود گزارش‌های بسیار در خصوص ابتلاء 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) به عنوان جایگزین مناسب و مؤثر آنچه بیوتیک‌ها (Balcazar *et al.*, Weber *et al.*, 1994)، در این تحقیق مشخص گردید که سویه *Staphylococcus equorum* که

می‌توان به عنوان یک جایگزین مناسب درمان‌های شیمایی 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 نیچه‌های متنوع اکولوژیک می‌باشد. به طور 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; Heikens *et al.*, 2005; Kloos and Even *et al.*, 2008). مشخص شده است که برخی سویه‌ها دارای اهمیت و ارزش تکنولوژیک هستند و به طور عمدۀ گونه‌های *S. equorum* و *S. xylosus* و *S. carnosus* منعقد کننده منفی (CNS) (Scheifer, 1986). این سویه از نقطه نظر مرفو‌لولی 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 قابل توجه گزارش نموده‌اند. در برخی مطالعات Irlinger 2008; Bockelmann (2002) و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سویه *S. equorum* قادر به تولید سم بوده و دارای مقاومت قابل توجه آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (Even *et al.*, 2010; Resch *et al.*, 2008). عده مقاومت این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک به سبب تولید بتا-لاکتوماز می‌باشد (Soares *et al.*, 2011). این سویه دارای فعالیت ضعیف آمینوپیتیدازی است که به طور ترجیحی اقدام به هیدرولیز ال-متیونین، ال-لوسین و ال-آلائین می‌نماید؛ اما دارای فعالیت قابل توجه در برابر استرهای کوتاه زنجیره از اسیدهای چرب می‌باشد. همچنین دارای خاصیت لیپازی نیز می‌باشد (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 ۲۰ ساعت برای آغاز رشد به طور 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 بلکتری 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 به طور عکس هر چه زمان رشد باکتری کوتاه‌تر باشد، مدت زمان بازده‌ی باکتری نیز کاهش می‌یابد و باکتری سریع‌تر وارد فاز مرگ شده و میزان عملکرد باکتری محدودتر می‌شود. در منحنی‌های رشد باکتری *Aeromonas dhakensis* به تنها یی زمان رشد مناسب مشاهده گردید. ولی در منحنی‌های رشد به صورت ترکیب باکتری *Staphylococcus equorum* از زمان رشد طبیعی برخوردار نبوده و میزان فاز رشد باکتری *Aeromonas* 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 جدنشده از روده باکتری جلوگیری نموده است. این یافته با توجه به نتایج حاصل از شمارش تعداد کلیه‌های 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 به عنوان مکمل پروبیوتیکی استفاده نمود. این خاصیت سویه *Staphylococcus equorum* می‌توان 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

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 (*Aramis brama orientalis*) در سواحل ایرانی دریای خزر در سال ۱۳۷۹-۱۳۸۰. مجله پژوهش و سازنگی در امور دام و آبزیان، شماره ۶۸، صفحات ۱۵ تا ۲۳.

کارانچف، 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 مظہر، ف.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع زیستی فلور میکروبی ماهی سیم (*Aramis brama oreintalis*) دریای خزر. مجله اکویولوژی 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.

- 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 dichotomum*, *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.
- Martinez-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 autochthonous 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.

- 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 suisin 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.