پاتوژن های باکتریایی غالب مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور

محمد افشارنسب*[۱]، شاپور کاکولکی[۱]، محمدرضا مهرابی[۱]، سیدرضا سیدمرتضائی[۲]، عقیل دشتیان‌نسب[۳]، بهروز قره‌وی[٤]، آرمین عابدیان[٥]

چکیده

هدف از انجام این مطالعه شناسائی و پراکنش باکتری‌های مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور بوده است. در این مطالعه که طی سالهای ۱۳۸٦ لغایت ۱۳۸۹ از یازده مرکز تکثیر میگوی کشور و شانزده استخر پرورشی ازهشت مزرعه در استان‌های خوزستان، بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان از مراکز تکثیر از مولدین، ناپلی، زوا، مایسیس و پست لارو و از مزارع پرورش در ابتدا و انتهای فصل انجام شد تعداد ده میگو برای بررسیهای باکتریائی نمونه گیری گردید. برای شمارش تعداد باکتری‌های کل در محیط TSA و جهت شمارش تعداد ویبریوها از محیط TCBS استفاده گردید و نهایتا شمارش کلونیهای رشد کرده با استفاده از تستهای بیوشیمیایی از طریق شناسایی تفریقی باکتری‌ها اقدام گردید. در استان خوزستان ۱۵ جنس و گونه باکتری جدا گردید که مهمترین آنها ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو پروتئولتیکوس، ویبریو اسپلندیدوس و در استان بوشهر ١٤گونه ویبریو که مهمترین آنها شامل ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو ولنیفوکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو هارویی و ویبریو فلاویالیس می‌باشد. در استان هرمزگان ۷ گونه باکتری شناسایی شده‌اند که مهمترین آنها ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو ولنیفوکوس و ویبریو آلژینولتیکوس می‌باشد و در استان سیستان و بلوچستان ١٤ گونه باکتری جداسازی شده که مهمترین آنها عبارتند از ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو ولنیفوکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس، و ویبریو فیشریز می‌باشد. تفاوت در باکتری‌های شناسائی شده استان‌های مختلف در جنوب کشور می‌تواند به عوامل متعددی از جمله تغییرات شوری، pH، درجه حرارت و میزان اکسیژن آب و مدیریت مزارع مرتبط باشد که کنترل این عوامل در پیشگیری از بروز بیماری‌های ناشی از این باکتریها موثر خواهد بود.

واژگان کلیدی: *باکتری ، مراکز تکثیر، مزارع پرورش، میگو، شناسائی*

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۵

مقدمه

یکی از چالش‌های اصلی در تولید آبزیان بالاخص در پرورش میگو موضوع بهداشت وبیماری‌ها بوده، بطوریکه سالیانه میلیون‌ها دلار از ناحیه بیماری‌ها به پرورش دهندگان میگو خسارت وارد شده و یکی از موضوعات مهم در توسعه این صنعت محسوب می‌شود. در خانواده سخت پوستان بالاخص میگو تاکنون حدود ۲۰ بیماری ویروسی، ٤ بیماری باکتریائی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی انگل گزارش شده است که باعث ایجاد بیماری و خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو می‌شوند(١٤).

تولید انبوه لارو یا میگوی بالغ منجر به شیوع بیماری‌های عفونی و غیر عفونی می‌شود. ازمهمترین عوامل عفونی، باکتری‌ها بالاخص ویبریوها می‌باشند که در همه جای دنیا وجود داشته، تمام سخت پوستان و میگوها به این باکتری حساس بوده و موجب بروز بیماری ویبریوزیس می‌شوند. این بیماری توسط بسیاری از گونه‌های ویبریو از جمله ویبریو هارویی، ویبریو ولنیفیکوس(V. Vulnificus)، ویبریو پاراهمولیتیکوس(V. Parahaemolyticus)، ویبریو آلجینولتیکوس(V. Alginolyticus)، ویبریو پناسیدا ایجاد می-شود(١٢).

یکی از مهاجم‌ترین ویبریوها، ویبریو هارویی می‌باشد، برخی محققین پیشنهاد کرده‌اند ویبریو هارویی و برخی دیگر از سویه‌های ویبریو به عنوان پاتوژن واقعی هستند و به صورت اولیه ایجاد بیماری می‌کنند. از سویه‌های پاتوژن؛ ویبریو هارویی، ویبریو ولنیفیکوس و ویبریو پاراهمولتیکوس اپیدمی‌های وسیعی در بسیاری نقاط جهان از جمله تایلند، فیلیپین، چین، مالزی، اندونزی و آمریکا گزارش شده است (۹).

در ایران مطالعاتی بر روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های جنس ویبریو از میگوهای پرورشی و دریایی در کشور انجام شده است. مجیدی‌نسب(٤) و سلطانی (۱۷) گونه‌های ویبریو پارا همولتیکوس، ویبریو هارویی، ویبریو آلجینو لتیکوس، ویبریو آنگوئیلاروم را به صورت غالب در میگوها گزارش کرده‌اند.

۱*- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ایران mafsharnasab@yahoo.com
۲- عضو هیئت علمی پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، ایران
۳-عضو هیئت علمی پژوهشکده میگوی کشور، ایران
٤- عضو هیئت علمی پژوهشکده آکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، ایران
٥- عضو عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آب‌های دور، چآب‌ها، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

بیماری‌های باکتریایی میگو ممکن است باعث ایجاد طیف وسیعی از مشکلات از قبیل مرگ و میر گروهی تا کاهش رشد و مرگ و میر انفرادی شوند. گونه‌های ویبریو قسمتی از میکروفلور طبیعی میگوهای وحشی و پرورشی بوده و هنگامی که مکانیزم دفاع طبیعی مختل می‌شود بصورت پاتوژن فرصت طلب درمی‌آید. برخی از گونه های ویبریو یا سویه‌های آنها به عنوان پاتوژن اولیه شناسایی شده‌اند (۹). تراکم‌های بالای ذخیره‌سازی میگو، مواد آلی فراهم شده از طریق تغذیه، میگوهای مرده و تغییرات آب و هوائی باعث ایجاد استرس در میگوها شده و جمعیت باکتریایی را از وضعیت عادی خارج کرده و باعث تحریک رشد باکتریایی فرصت‌طلب در استخرها و تانک‌های پرورشی میگو می‌گردند. باکتری‌های فرصت طلب باعث ایجاد خسارت‌های جدی در تولید میگو گردیده و اثرات بخصوصی مثل مرگ و میر میگو، آسیب بافتی (نکروز)، تغییر شکل بدن، کندی رشد و تغییر شکل لارو را به همراه دارند. همچنین این باکتری‌ها به دستگاه گوارش هجوم آورده و عفونت‌های مشخصی را در لارو در تمام سیستم دستگاه گوارش بوجود می‌آورند (۱۱).

گونه‌های باکتری ویبریو می‌توانند از بین زخم‌ها در اسکلت خارجی از راه منافذ وارد شوند. آبشش‌ها حساس به نفوذ باکتری می‌باشند، چون توسط اسکلت خارجی نازکی پوشیده شده‌اند. ولی سطح آنها توسط دستگاه برونشی تمیز می‌شوند. لوله گوارش میانی که متشکل از غدد هضمی و بدنه لوله گوارش میانی هستند، توسط اسکلت خارجی پوشیده نشده‌اند و در نتیجه به نظر می‌رسد، محل نفوذ پاتوژن‌هایی که با آب، غذا و رسوبات حمل می‌شوند، باشند(٦).

مهمترین گونه‌هائی که در میگو موجب بروز بیماری می‌شوند عبارتند از ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو ولنیفوکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو هاروئی که به ترتیب فراوانی در هچری‌ها ایجاد بیماری می‌کنند. در مزارع بیشتر گونه‌ها، ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو هاروئی و ویبریو ولنیفوکوس به ترتیب ایجاد بیماری می‌کنند. در پاره‌ای مواقع ویبریو دامسلا و ویبریو فلاویالیس نیز موجب بروز بیماری می‌شوند(١٤).

ویبریوها یک باکتری گرم منفی، اکسیداز مثبت، استوانه‌ای و متحرک می‌باشند. این باکتری غیرهوازی اختیاری بوده و حرکت آنها توسط تاژک صورت می‌گیرد. معمولاً در محیطهای آبی بالاخص درمیان سخت پوستان و درسطح پوست و اندامهای داخلی سخت پوستان به ظاهر سالم، همچنین در رسوبات و در ستون‌های آب جدا شده و در محیط‌هایی که آلودگی بالا یا شوری بالا داشته باشد، بالاترین میزان شیوع را دارا هستند (۷).

بیشتر اپیدمی‌های ویبریوزیس در میگوی مونودون در منطقه مرکزی اقیانوسیه، میگوی پنئوس ژاپونیکوس در ژاپن، میگوی پنئوس وانامی در اکوادور، پرو، کلمبیا و آمریکای مرکزی گزارش شده است (١٤). در هند چندین مطالعه گزارش شده است که ویبریو هارویی مرتبط با تلفات انبوه پست لارو مونودون پرورشی در هچری بوده است (۱۳). در این تحقیق، جداسازی و میزان شیوع باکتری‌های مختلف بالاخص ویبریوها مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور به دلیل اهمیت اپیدمی‌های ایجاد شده در ایران بررسی و مطالعه شده است.

مواد و روش کار

این تحقیق طی سالهای ١٣٨٦ تا ١٣٨٩ و به منظور شناسائی گونه‌های غالب باکتری‌های بیماریزای میگو در مراکز تکثیر و پرورش استان‌های خوزستان، بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان انجام گردیده است. با توجه به گستردگی مراکز تکثیر و مزارع پرورش، مقرر گردید در هر استان از دو مرکز تکثیر و سه سایت پرورشی واقع در استان و در هر سایت پرورشی دو مزرعه و از هر مزرعه دو استخر در اوایل و اواخر دوره پرورش نمونه‌برداری شود (نگاره ۱). نمونه‌گیری از میگو در ظروف استریل انجام شد و آزمایش‌های باکتری شناسی بر روی نمونه انجام گرفت. جدول ۱ تعداد مراکز تکثیر و پرورش به انضمام تعداد استخرها را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

در مراکز تکثیر از مولدین، ناپلی، زوا، مایسیس و پست لارو نمونه‌گیری شده و در مزارع پرورش نیز در ابتدای فصل و انتهای فصل از میگوهای موجود در مزارع نمونه‌گیری گردید. همچنین چنانچه در فصول تکثیر و پرورش میگو در استان‌های جنوبی کشور مرگ و میر یا بیماری گزارش می‌شد نمونه‌برداری انجام گردید.

جمع‌آوری نمونه‌ها در مراکز تکثیر

در چهار استان جنوبی کشور جمعاً در ۱۱ مرکز تکثیر کار نمونه‌برداری انجام گردید. در استان خوزستان بعد از بروز بیماری لکه سفید در سال ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ عملیات تکثیر و پرورش میگو طی سه سال متوقف و در سال ۱۳۸۷ مجدداً فعالیت سایت چوئیبده و مراکز تکثیر آن انجام و کار نمونه‌برداری آغاز گردید (جدول ۱).

نگاره ۱ـ محل جمع‌آوری نمونه‌ها در استان‌های ساحلی جنوب

جدول۱ـ مراکز تکثیر و مزارع پرورشی نمونه‌برداری شده در استان‌های مختلف

نام استان	تعدا نمونه‌ها	سال۱۳۸٦	سال۱۳۸۷	سال۱۳۸۸	سال۱۳۸۹
خوزستان	مراکز تکثیر	–	۱	۱	۱
	مراکز پرورشی	–	۱	۱	۱
بوشهر	مراکز تکثیر	۳	۳	۳	۳
	مراکز پرورشی	۳	۳	٤	٤
هرمزگان	مراکز تکثیر	۲	۲	۲	۲
	مراکز پرورشی	۳	۳	۳	۳
سیستان و بلوچستان	مراکز تکثیر	۵	۵	۵	۵
	مراکز پرورشی	۱	۱	۱	۱

نمونه‌برداری در مراکز تکثیر از مراحل لاروی آغاز گردیده و از هر مرکز تکثیر ۱۰ عدد مولد، ۵۰قطعه ناپلی، ۵۰ قطعه زوآ، ۵۰ قطعه مایسیس و ۵۰ قطعه پست لارو ۱۲ نمونه‌گیری و برای آزمایشات مختلف استفاده گردید. از مولدین هر کارگاه بعد از پایان تخم کشی و با موافقت رئیس کارگاه، نمونه‌برداری انجام شد. در مزارع پرورش از دو استخر و از هر استخر ۱۰ نمونه میگو برداشت و برای آزمایشات مختلف باکتری شناسی مورد استفاده قرار گرفت.

در کلیه مراحل نمونه‌برداری نام محل نمونه‌برداری، تاریخ نمونه‌برداری، نوع نمونه (پست لارو، مراحل لاروی یا میگوی بالغ) بر روی ظروف نمونه‌برداری ثبت شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به چند قسمت تقسیم نموده وبا توجه به آزمایش‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش‌های باکتری شناسی نمونه‌های مراکز تکثیر

کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده در مراکز تکثیر (تخم، ناپلی، زواء، مایسس و مولدین) به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل

Archive of SID
www.SID.ir

شدند. بعد از ضد عفونی نمونه‌های تخم، ناپلی، زواء و مایسیس را هموژن نموده و در محیط TCBS به منظور شمارش کلنی باکتری‌های ویبریو و در محیط کشت TSA کشت و شمارش کلی باکتری‌ها صورت گرفت. مولدین جمع‌آوری شده نیز بعد از ضد عفونی ابتدا توسط سرنگ، همولنف آنها اخذ و برای شمارش تعداد باکتری‌ها از محیط های کشت TSA و جهت شمارش تعداد ویبریوها از محیط TCBS استفاده شد. سپس از قسمت‌های مختلف آبشش و هپاتوپانکراس آنها نیز در محیط TCBS و TSA کشت داده و به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در انکوباتور و در دمای ٣٥°C قرار گرفته و پس از رشد باکتری‌ها، کلنی باکتری‌ها به کمک دستگاه شمارش کلنی و از روش Lightner (١٩٩٦) شناسایی و ثبت گردیدند (١٤). برای شناسایی باکتری‌های شمارش شده نیز بعد از جداسازی کلنی‌های مختلف، جداسازی شده در محیطهای غنی کننده شامل TSB ، BHIB کشت مجدد شدند. آنگاه این کلنی‌ها بوسیله رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی شده و با انجام تست‌های شیمیایی شامل تست تحمل نمک با درصدهای مختلف (٠٪، ٣٪، ٦٪، ٨٪، ١٠٪)، تست‌های دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه (اورنیتین، آرژنین و لیزین)، تست‌های تخمیر قندها (گلوکز، لاکتوز، سوکروز، سلوبیوز، اینوزیتول و مانیتول) سیمون سیترات، احیای نیترات، ژلاتیناز، MR-VP و ٠/١٢٩ شناسایی گردیدند.

اجرای آزمایش‌های باکتری شناسی در نمونه‌های جمع‌آوری شده مزارع پرورش

برای آزمایشات باکتری شناسی از نمونه میگوهای جمع‌آوری شده از مزارع پرورش در ابتدای دوره (١٠ تا ٢٠ روز پس از ذخیره‌سازی) و آخر دوره (١٠٠ تا ١٢٠ روز پس از ذخیره سازی نمونه‌برداری صورت پذیرفت. برای این منظور از میگوهایی که در سینی های غذادهی بوده و از هر استخر ١٠ عدد نمونه میگو جهت آزمایشات باکتری شناسی استفاده شد(١٤) . این نمونه‌ها به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل و در آزمایشگاه پس از ضدعفونی وسایل و محیط، میگوها توسط دستمال کاغذی خشک و پوسته خارجی آنها بوسیله الکل ضدعفونی گردید، آنگاه با قطع کردن پاهای شنا همولنف آنها خارج و در محیطهای کشت TSA و TCBS تلقیح شدند. بعد از طی مراحل انکوباسیون (٢٤ تا ٤٨ ساعت در ٣٥°C) نسبت به رنگ‌آمیزی و شمارش کلونی‌های رشد کرده اقدام و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی (رنگ کلنی، آزمایش گرم، تحمل نمک ٠ تا ١٠ ٪، اورنیتین، دکربوکسیلاز، لیزین دکربوکسیلاز، اکسیداز، سوکروز، سلوبیوز، اینوزیتول، مانیتول، سیمون سیترات، نیترات، ژلاتیناز، MR-VP، 0/129 و نورافشانی) نسبت به شناسایی تفریقی باکتری‌ها اقدام گردید. (١٤). همچنین از آبشش و هپاتوپانکراس میگوهای فوق نیز کشت و نسبت به شناسایی آن اقدام گردید. این آزمایش برای میگوهای برداشت شده از سایتهای مختلف استان‌ها در مراحل آخر دوره پرورش (١٠٠ تا ١٢٠ روزگی) نیز انجام گردید (١٧و ١٤).

نتایج

باکتری‌های شناسائی شده در استان‌های مختلف

نتایج بررسی‌های صورت گرفته در زمینه شناسائی باکتری‌ها در مزارع پرورشی استان‌های جنوبی کشور و براساس آزمایش‌های مختلف شیمیائی در جدول ٢ بیان شده است. همچنین شیوع و پراکنش باکتری‌ها در استان‌های مختلف در مزارع پرورش در جدول٣ و در مراکز تکثیر در جدول ٤ ارائه گردیده است. همانگونه که در جدول ٣ و ٤ مشاهده می‌شود بیشترین تعداد گونه های ویبریو شناسائی شده دراستان خوزستان با ١٥ گونه و کمترین در استان هرمزگان با هفت گونه می‌باشد. استان‌های بوشهر و سیستان و بلوچستان با ١٤ گونه در رتبه‌های دوم و سوم قرار دارند. نکته حائز اهمیت شناسائی دو باکتری آئروموناس هیدروفیلا در استان‌های خوزستان و بوشهر و پلسیموناس شیگلا در استان خوزستان می‌باشد. باکتری‌های جداسازی شده در مراکز تکثیر در جدول٤ نشان داده شده

www.SID.ir

است. با توجه به نتایج ارائه شده سه باکتری ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس و ویبریو آنگوئیلارم در مراکز تکثیر کلیه استان‌های جنوبی گزارش و گونه‌های دیگر در برخی از استان‌ها یاد شده است.

جدول ۲ـ نتایج آزمایش‌های بیوشیمیائی برای شناسائی باکتری‌های مختلف مراکز تکثیر و پرورش

آزمایش	*V. harveyei*	*V.anguillarum*	*V. damsela*	*V. alginolyticus*	*V.natrigenes*	*v.gazogenes*	*V. vulnificus*	*V.mimicus*	*V.flavialis*	*V.neeris*	*V.fischeri*	*V.campbelli*	*V.spelendidus*	*V.parahemolyticus*	*V.proteolyticus*	*hydrophila Aeromonas*	*shigelloides Plesimoanas*
آزمایش گرم	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-
رنگ کلنی در TCBS	G	Y	G	Y	Y	Y	G	Y	Y	G	G	Y	Y	G	G	Y	G
تحمل نمک ۰٪	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
تحمل نمک ۳٪	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
تحمل نمک ٦٪	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
تحمل نمک ۸٪	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
تحمل نمک۱۰٪	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
اورنیتین دکربوکسیلاز	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
آرژنین دکربوکسیلاز	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
لیزین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوز	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
سوکروز	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
سلوبیوز	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
اینوزیتول	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
مانیتول	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
سیمون سیترات	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
نیترات	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ژلاتیناز	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	V	-	-	+
MR-VP	-	+	+	+	-	V	+	-	-	-	+	-	-	V	-	+	_
0/129	_	+	+	+	+	+	-	-	_	-	+	+	-	-	-	-	_
نورافشانی	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

واکنش مثبت =+ ، واکنش منفی= – ، واکنش متغیر=V

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳ـ پراکندگی باکتری‌های شناسایی شده در مزارع پرورش استان‌های جنوبی کشور

نام باکتری	استان خوزستان	استان بوشهر	استان هرمزگان	استان سیستان و بلوچستان
V.alginolyticus	✓	✓	✓	✓
V.proteolyticus	✓	✓		✓
V.parahemolyticus	✓	✓	✓	✓
V.spelendidus	✓	✓	✓	✓
V.mimicus	✓	✓		
V.flavialis	✓	✓		✓
V. harveyi	✓	✓	✓	✓
V.nereis	✓			✓
V. anguilarum	✓	✓	✓	✓
V.fischeris	✓	✓		✓
V.damsela	✓	✓		✓
V.vulnificus	✓	✓	✓	✓
V.gazogenes		✓		✓
V.natrogenes		✓	✓	✓
V.campbelli	✓			✓
shigelloides Plesimoanas	✓			
hydrophila Aeromonas	✓	✓		

جدول٤ـ پراکندگی باکتری‌های شناسایی شده در مراکز تکثیر استان‌های جنوبی کشور

نام باکتری	استان خوزستان	استان بوشهر	استان هرمزگان	استان سیستان و بلوچستان
V.alginolyticus	✓	✓	✓	✓
V.parahemolyticus	✓	✓	✓	✓
V.spelendidus			✓	
V.flavialis				✓
V. harveyi		✓		✓
V.fisheri	✓		✓	
V. anguilarum	✓	✓	✓	✓
V.splendicus			✓	✓
V,vulnificus	✓	✓		

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه صورت گرفته در مراکز تکثیر و پرورش استان‌های جنوبی جمعاً ۱۷ گونه باکتری جدا گردید که از بافت‌های آبشش، هپاتوپانکراس و میگوی هموژن (میگوهای زیر ۲g و میگوهای مراحل لاروی) شناسایی گردید. مهمترین باکتری‌های جدا شده از میگوها شامل ویبریو آلژینولیتکوس، ویبریو پرتئولیتکوس، ویبریو اسپلندیدوس، ویبریو میمیکوس و آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. بر اساس جدول ۵ بیشترین تعداد باکتری‌ها در بافت هپاتوپانکراس و همولنف گزارش گردیده و سپس در بافت آبشش بیشترین فراوانی را می‌توان دید. برخی از باکتری‌ها مثل آئروموناس هیدروفیلا و پلسیموناس شیگللا فقط در استان خوزستان و بوشهر گزارش گردیدند.

جدول ۵ـ مهمترین باکتری‌های جدا شده از میگوهای پرورشی در سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۹در بافت‌های مختلف

نام باکتری	آبشش (٪)	همولنف(٪)	عضلات (٪)	هپاتوپانکراس(٪)
V. alginolyticus	۲۶/۰۵	۲۸/۷۲	–	۲٤/۷۵
V. proteolyticus	۱۱/٦	۸/۲۸	–	۷/۸
V.parahemolyticus	۹/۲	۸/۸۵	–	۸/۲
V. spelendidus	–	۱٤/۷	–	۱۰/٦
V. mimicus	-	۷/٤	–	۱۱/٦
V. flavialis	–	۸/۹	–	۵/۳۹
V. harveyi	۵/٦	۳/۱۵	–	–
V. nereis	۱۰/۷	–	–	۵/۵٦
V. anguilarum	-	۷/۱۷	–	۱۰/٦
V. fischeris	۷/۷	–	–	۱۲/۲
V. damsela	۱۲/۵٤	۸/۱٤	–	۱۰/۲۵
V. vulnificus	۷/۳	۲/۷	–	۱۰/۱۱
V. gazeogenes	۲/۳	۳/۱	-	
V. natrogenes	۳/۲	۷/۲	-	۵/٦
V. campbelli	–	٦/٤	–	۷/۳
Plesimoanas shigelloides	۳/۲	۲/۲	–	۱/۳
Aeromonas hydrophila	۵/٦	۵/۸	–	۵/۲

مهمترین باکتری‌های جدا شده در مراکز تکثیر

نتایج حاصله از آزمایشات باکتری شناسی در مراکز تکثیر میگوی کشور نشان می‌دهد که بیشترین تنوع در بین گونه های ویبریو جداسازی شده مربوط به گونه های جداسازی شده در مرحله پست لاروی بوده و ۵۰ مورد آلودگی با این باکتری‌ها مشخص گردیده است .کمترین مورد آلودگی باکتریائی مربوط به مرحله تخم می‌باشد که ۱۷ مورد گزارش می‌شود. بیشترین آلودگی مربوط به باکتری ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس و ویبریو آنگوئیلارم می‌باشد در حالیکه کمترین باکتری‌های گزارش شده مربوط به باکتری‌های ویبریو اسپلندیدوس (یک مورد)، ویبریو فیشریز (دو مورد) و ویبریو دامسلا (سه مورد) بوده است (جدول ٦).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ٦ـ مهمترین باکتری‌های جداسازی شده در مراحل مختلف لاروی در استان‌های مختلف در مراکز تکثیر(بر اساس ٪)

نام باکتری	تخم	ناپلی	زئوآ	مایسیس	پست لارو
V.alginolyticus	٥	٦	٣/٥	٧/٥	٦
V.parahemolyticus	١٠	٣/٥	٦/٥	٥	٤/٥
V.spelendidus	٠	٠	٠	٠/٥	٠
V.flavialis	٠/٥	٠	٠	٠/٥	٢/٥
V. harveyi	٠	١/٥	٠	١٠	٢/٥
V.fisheri	٠	٠	٠	٠/٥	٠/٥
V. anguilarum	٥/٥	٣/٥	٢	٣	٤
V.damsela	٠	٠	٠/٥	٠/٥	٠/٥
V,vulnificus	٠/٥	٠	٠	٠	٠/٥

جدول ٧ـ واکنش باکتری‌هائی که اورنیتین منفی، آرژنین منفی و لیزین مثبت می‌باشند.

آزمایش	*V. harveyei*	*V.anguillarum*	*V. vulnificus*	*V.mimicus*	*V.campbelli*
اورنیتین دکربوکسیلاز	−	-	-	−	-
آرژنین دکربوکسیلاز	-	−	−	−	-
لیزین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	+

جدول ٨ـ واکنش باکتری‌های اورنیتین منفی، آرژنین مثبت و لیزین مثبت

آزمایش	*V. damsel*	*V. alginolyticus*	*V.flavialis*	*V.neeris*	*V.proteolyticus*
اورنیتین دکربوکسیلاز	−	−	−	−	−
آرژنین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	+

جدول٩ـ باکتری‌های لیزین، آرژنین و اورنیتین منفی

آزمایش	*V. natrogenae*	*V. gazogenase*	V. splendidus
اورنیتین دکربوکسیلاز	−	−	−
آرژنین دکربوکسیلاز	−	−	−
لیزین دکربوکسیلاز	−	−	−

بطوری‌که پنج باکتری ویبریو هاروئی، ویبریو آنگویلاریوم، ویبریو ولنیفوکس، ویبریو میمیکوس و ویبریو کامپبلی در تشخیص شیمیائی دارای خصوصیت اورنیتین منفی، آرژنین منفی و لیزین مثبت می‌باشند (جدول ٧). در صورتیکه دسته دوم باکتری‌هائی هستند که علاوه بر لیزین به آرژنین نیز واکنش مثبت نشان می‌دهند و شامل باکتری‌های ویبریو دامسلا، ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو پروتئولتیکوس، ویبریو نرئیس و ویبریو فلاویالیس می‌باشد (جدول ٨). همچنین ویبروهای نیتروژنز، گازئوژنز و اسپلندیدوس در مقابل هرسه واکنش منفی نشان می‌دهند(جدول ٩).

بحث

بر اساس جدول ٢و ٣ مهمترین باکتری‌های شناسایی شده در چهار استان جنوبی با هم متفاوت می‌باشند. در استان هرمزگان مهمترین باکتری‌ها از خانواده ویبریوسیس بوده و شامل گونه‌های ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو آنگوئیلارم و ویبریو آلژینولتیکوس می‌باشد. در حالیکه در استان بوشهر مهمترین گونه‌های ویبریو، علاوه بر گونه‌های ذکر شده در استان هرمزگان گونه‌های دیگر شامل ویبریو هاروئی، ویبریو میمیکوس و ویبریو دامسلا نیز می‌باشد.

در استان خوزستان مهمترین گونه باکتری‌های شناسایی شده

Archive of SID

www.SID.ir

عبارتند از ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو پروتئولتیکوس، ویبریو اسپلندیدوس بوده در حالیکه در منطقه گواتر استان سیستان و بلوچستان گونه های ویبریو آلژینولتیکوس، ویبریو ولنیفوکوس، ویبریو پاراهمولتیکوس، ویبریو نیتروژنز و ویبریو گازئوژنز می‌باشد.

تفاوت در فلور باکتریایی مناطق مختلف در جنوب کشور به عوامل متعددی از جمله تغییرات شوری، pH، درجه حرارت و میزان اکسیژن آب بستگی دارد. همچنین بر اساس گزارش Lokare (۱۹۹۵) تفاوت در نوع غذای مصرفی نیز می‌تواند در فلور باکتریایی گونه‌های آبزی از جمله میگو تأثیر گذار بوده و باعث تغییر شود. از جمله عوامل مهمی که در ظهور بیماریزای ویبریو می‌تواند مؤثر باشد وجود استرس است. در صنعت تکثیر و پرورش میگو عوامل متعددی در بروز استرس دخالت داشته، که استرس ناشی از حمل و نقل، استرس ناشی از افزایش تراکم، استرس ناشی از تغییر شدید فاکتورهای محیطی از مهمترین آنها می‌باشند. بروز استرس موجب تضعیف سیستم ایمنی میگوها شده و در نهایت باعث بروز بیماری می‌شود(۱۵). بنابراین یکی از راه‌های کنترل بیماری باکتریایی ویبریوزیس در میگوها پیشگیری از بروز استرس می‌باشد. همچنین آلودگی ناشی از ویبریو که یک باکتری عفونت‌زای فرصت‌طلب می‌باشد و در محیط‌های دریایی و آب‌های لب شور یافت می‌شود، یکی از مهمترین و جدی ترین بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگو بوده و میتواند باعث ضرر و زیان بالا و مرگ و میر ۱۰۰٪ شود. بعنوان نمونه آلودگی با گونه ویبریو نقش مهمی در مرگ و میر میگوها در تایوان طی سالهای ۸۸-۱۹۸۷ داشته است(۱۶). در بررسی میگوهای مناطق مختلف استان‌های جنوبی کشور، سفید شدن هپاتوپانکراس و عضلات، وجود رنگدانه‌های سیاه در قسمت کاراپاس، آبشش و همچنین وجود نکروز در مقاطع آسیب‌شناسی که می‌تواند نشانه‌هایی از بروز بیماری ویبریوزیس در میگوها باشد، مشاهده نگردید. این بیماری بالاخص با گونه ویبریو هاروئی که موجب حالت نورافشانی (Luminescent) در هنگام شب در میگوها می‌شود، در میگوهای جوان و بالغ استخرهای پرورشی شناسائی شده است(۱٤). بیماری ویبریوزیس ناشی از ویبریو هاروئی توسط برخی از محققین ایرانی نیز در مزارع پرورش میگو گزارش گردیده است (۵) ولی در این تحقیق موردی مشاهده نگردید.

در یک بررسی در استان هرمزگان نشان داده شده که برای تنظیم شوری در استخرهای پرورشی آب استخرها مرتباً تعویض شده و این تعویض آب استخرهای پرورشی ازعوامل مهم است که موجب حفظ کیفیت آب ودرنهایت کاهش تراکم باکتری‌های ویبریو می‌گردد (۳).

مجیدی‌نسب (۱۳۷٤) بیشترین آلودگی ویبریو را در بافت هپاتوپانکراس و شایع‌ترین (۱۷) آلودگی را در میگوی ببری سبز، ویبریو پاراهمولتیکوس گزارش کرده است(٤). این یافته‌ها با نتایج حاصل از این تحقیق مشابهت دارد. بر اساس گزارشات سازمان خواربار و کشاورزی (فائو) وجود باکتری ویبریو پارا همولیتیکوس درمزارع پرورشی می‌تواند موجب بروز بیماری سندرم مرگ زودرس (Early mortality syndrome) در مزارع پرورشی تازه ذخیره دار شده گردد و از این نظر ردیابی این باکتری در مزارع پرورشی حائز اهمیت می‌باشد. این باکتری با تولید سم و انتقال آن به باکتریوفاژها موجب بروز بیماری فوق می‌شود(۱۰).

وجود دو گونه باکتری ویبریو نیتروژنز و ویبریو گازئوژنز در استان‌های بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان گزارش گردیده است. براساس گزارش Thompson و همکاران (۲۰۱۰) این دو باکتری فقط در محیط‌های باتلاقی یا لجنزار وجود داشته و با ۲٪ نمک رشد می‌کنند(۱۸). با توجه به اینکه مرکز پرورش میگو در استان خوزستان تا قبل از سال ۱۳۸٦ تعطیل بوده است و در سایر استان‌ها مراکز فعال بوده اند به نظر میرسد شرایط محیطی برای رشد این دو باکتری در آن محل وجود نداشته ولی در سایر استان‌ها این دو باکتری گزارش گردیده است. همچنین این دو باکتری می‌توانند نقش مهمی در تولید

Archive of SID

www.SID.ir

پروبیوتیک در مزارع پرورش میگو نیز داشته که نیازمند تحقیق بر روی این دو گونه در شرایط آب و هوائی ایران کاملا محسوس است.

بر اساس این گزارش در استان هرمزگان کمترین تعداد باکتری از مزارع پرورشی و مراکز تکثیر گزارش گردیده است. همچنین در بافتهای مختلف میگوهای بالغ و پست لاروها نیز در مقایسه با سایر استان‌ها کمترین میزان باکتری مشاهده گردید. باتوجه به اینکه دراین استان تاکنون بیماری‌های دیگر از جمله بیماری لکه سفید که یک بیماری ویروسی می‌باشد گزارش نگردیده است و در سایر استان‌ها گزارش شده است (۲) می‌توان استان هرمزگان را یکی از پاکترین استان‌ها برای تولید میگو اعلام نمود. یکی از دلایل اینکه بیماری‌های ویروسی دراین استان تا کنون گزارش نشده و یا اینکه در این استان پراکنش باکتری‌های مختلف کمتر از بقیه استان‌ها می‌باشد می‌تواند ناشی از پایدار بودن شرایط آب و هوائی در این استان دانست. زیرا در این استان میزان تغییرات درحه حرارت درمقایسه با سایر استان‌ها کمترین است.

در این تحقیق علیرغم شناسایی گونه‌های مهم بیماری‌زا در مراکز تکثیر و پرورش کشور، تلفات یا مرگ و میر شدیدی ناشی از این ویبریوزیس گزارش نگردید. یکی از مهمترین دلایل آن را می توان به کاهش تراکم یا به عبارت دیگر تعادل تراکم در استخرهای پرورش میگو نسبت داد. زیرا همانگونه که ذکر گردید افزایش تراکم باعث بروز استرس و تلفات در میگوها می‌شود. همچنین رعایت مسائل بهداشتی از جمله استفاده از آهک به منظور تنظیم pH می‌تواند از عوامل مهم و تأثیر گذار در کاهش تلفات ناشی از این بیماری باشد.

براساس تست‌های تشخیصی باکتری‌های ویبریو جداسازی شده مطابق جدول ۲ در برابر دکربوکسیلاسیون اورنیتین، آرژنین و لیزین واکنش‌های را نشان می‌دهند که می‌توان آنها را در گروه‌های کوچکتری قرار داد.

دیگر ویبریوهای جدا شده دراین دسته‌بندی قرار نگرفته بطوریکه ویبریو پاراهمولتیکوس به اورنیتین واکنش مثبت داشته ولی به لیزین و آرژنین واکنش منفی نشان می‌دهد و ویبریو فیشریز به اورنیتن و آرژنین مثبت و به لیزین واکنش منفی نشان می‌دهد. این تقسیم‌بندی باکتری‌های ویبریو می‌تواند روشی ساده برای تشخیص این خانواده باشد. بطوری‌که Lightner (۱۹۹٦) نیز بر اساس واکنش ویبریوها به این آزمایشات آنها را در دسته‌بندی‌های مختلف قرار داده است که تا اندازه‌ای با این دسته بندی متفاوت است(١٤). بر اساس دسته بندی لایتنر کل ویبریوها براساس واکنش لیزین به دو دسته مثبت و منفی تقسیم می‌شوند در حالیکه در این تقسیم‌بندی واکنش لیزین همه ویبریوهای ارائه شده در جدول ۷و ۸ مثبت و فقط ویبریوهای اسپلندیدوس، پاراهمولیتیکوس، گازئوژنز و نیتروژنز لیزین منفی هستند. در این تقسیم‌بندی به عنوان مثال ویبریو هاروئی دارای واکنش لیزین دکربوکسیلاسیون مثبت بوده ولی در تقسیم بندی لایتنر این واکنش برای ویبریو هاروئی منفی گزارش شده است علت این تفاوت می‌تواند ناشی از سویه های مختلفی از این باکتری باشد که در مناطق مختلف جداسازی شده و دارای خصوصیات متفاوت می‌باشد ولی در مابقی آزمایشات بالاخص آزمایش نورافشانی واکنش مثبت از خود نشان می‌دهند.

در میان باکتری‌های شناسائی شده گونه آئروموناس هیدروفیلا به عنوان یکی از گونه های مهم بیماری زا در آبزیان می باشد که عفونت با این باکتری با خونریزی و سپتی‌سمی همراه بوده به همین دلیل بیماری ناشی از این باکتری تحت عنوان سپتی-سمی هموراژیک باکتریائی یا سپتی‌سمی آئروموناس و یا Red Pest (آفت قرمز) نامیده می‌شود، نظر به اهمیت این گونه باکتریائی از نظر بیماری زائی که درانسان نیز ایجاد بیماری می-نماید ضرورت تحقیق بیشتری در این رابطه لازم است. براساس گزارش Alaakareem (۲۰۱۲) این باکتری در مناطقی که دارای آب و هوای گرم می باشند حضور دارد، همچنین در آب‌های شیرین، آب‌های شور مناطق دریایی و آب‌های کلردار و غیر کلردار و همچنین در غذاهای دریائی از جمله میگو یافت می‌شود. آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل پاتوژن در انسان

Archive of SID
www.SID.ir

و آبزیان به عنوان عامل عفونتهای روده ای و غیر روده‌ای در انسان می‌باشد (۵). همچنین گونه پلسیموناس شیگلا نیز که تنها دراستان خوزستان شناسائی شده است یکی از باکتری‌هائی است که موجب عفونت روده‌ای در انسان شده و از طریق آبزیان و سایر موجودات دریائی در محیط گسترش پیدا می‌کند. (۸). بنابراین کنترل این باکتری در محیط نیز حائز اهمیت می‌باشد. این باکتری نیز در خانواده ویبریوناسه قرار دارد و در محیط‌های دارای آب‌های قلیائی بیشتر گزارش شده و با توجه به اینکه آب استخرهای پرورشی دراستان خوزستان معمولا دارای pH قلیائی (۸ تا ۸/۵) می‌باشند (۱). یکی از دلایل گزارش آن در استان خوزستان شاید به دلیل این موضوع باشد. برای اثبات این مهم نیاز به تحقیقات بیشتر ضروری است.

فهرست منابع

۱- افشارنسب، م.، متین‌فر، ع.، محمدی‌دوست، م.، قوام‌پور، ع.، مرتضائی، ر.، سبزعلیزاده، س.، پذیر، خ.، فقیه،خ.، حق‌نجات، م.، قاسمی، ش.(۱۳۸٦): تعین نرخ رشد، میانگین وزن، میزان بقا، ضریب تبدیل غذا و تولید کل در پرورش میگوی وانامی *(L. vannamei)* در ایران. مجله علمی شیلات ایران. سال ۱۳۸٦. شماره ٤.

۲- افشارنسب، م.، معتمدی سده،ف.، دشتیان نسب،ع.، یگانه، و.، میربخش، م.، گنجور، س.(۱۳۸۹). بررسی امکان تهیه واکسن غیرفعال جهت پیشگیری بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روش‌های هسته‌ای و غیر هسته‌ای در میگوی سفید هندی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. شماره فروست ۹۰/۳۱۲.

۳- صالحی، ع. (۱۳۷۸). بررسی وضعیت مدیریت پرورش درمزارع پرورش میگوی منطقه تیاب. گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران. شماره فروست ۲۷٦۸-۱۳۷۸.

٤- مجیدی نسب، ا. (۱۳۷۷). بیماری‌های میگوی های پرورشی، انتشارات نوربخش،: ۲۰۸ .

5- AlaaKareem, N. (2012): Detection of aero gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from shrimp and peeled shrimp samples in local market. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food science. 2012: 2 (2) 634-639.

6- Alday-Sanz, V., Roque, A., Turnbull, J.F. (2002): Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 48:91–99.

7- Austin, B. (2010): Review Vibrios as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology 140:310-317.

8- Christiane, S. P., Simone, D.A., André Felipe das, M. S., Salvatore, S., Ignacio, B. M., Paulo, H.O., Dalia, D.P.R. (2008): *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonadace* family pathogen isolated from marine mammals of southern and south eastern Brazilian coast. Brazilian J. Microb. 39:749-755.

9- De la Peña, L.D., Kakai, T., Muroga, K. (1995): Dynamics of Vibrio sp PJ in organs of orally infected kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Fish. Pathol. 30: 39-45.

10- FAO, Media center. (2013): Culprit behind massive shrimp die-offs in Asia unmasked. Bacterium responsible for Early Mortality Syndrome of Shrimp – Crucial first step in finding effective ways to combat the disease.

11- Gabriel, A. G., Felipe, A. V. (2000): Infectious disease in shrimp species with aquaculture Potential. Resent. Devel. Microbiology. 4: 333-348.

12- Ishimaru, K., Akarawa-Matsushita, M., Muroga, K. (1995): Vibrio penaeicida sp., nov., a pathogen of kuruma shrimps (*Penaeus japonicus*). Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 8-19.

13- Kannapiran E., Ravindran. J., Chandrasekar. R., Kalaiarasi, A. (2009): Studies on luminous, *Vibrio harveyi* associated with shrimp culture system rearing *Penaeus monodon*. J. Environ. Biol. 30(5): 791-795.

Archive of SID

www.SID.ir

14- Lightner, D.V. (ed.). (1996): A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
15- Lokare, K.V. (1995): Aquaculture engineering and water quality mangement, MPEDA, Cochin, India. P: 1231-1274.
16- Nash, G.L. (1990): *Penaeus monodon* grow-out disease. Ed. By New, M. B. Sarsam, H. D. Singh, T: Technical and economic aspects of shrimp farming Proceeding of the Aquatech 90 conference, Kualalampur, Malaysia. P: 11-14.
17- Soltani, M., Kakoolaki, Sh., Kiasami, M. (1999): Study of vibrios in heleh station, Bushehr, Iran. Conf. of Diseases of Fish and Shell fish. Book of Abstract, Rodes, Greece.
18- Thompson, J., Gregory, S., Plummer, S., Shields, R.J. Rowley, A.F. (2010): An in vitro and in vivo assessment of the potential of Vibrio spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. App. Microb. (4): 1177-1184.

Archive of SID

www.SID.ir