وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران- پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور

عنوان:

پایش عوامل عفونی در استخرهای پرورش میگوی وانامی در چوئبده آبادان

مجری:
سیدرضا سید مرتضائی

شماره ثبت
۸۹/۱۷۰

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مـؤسسه تحـقیقـات شیـلات ایـران- پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور

- **عنوان پروژه/ طرح :** پایش عوامل عفونی در استخرهای پرورش میگوی وانامی در چوئبده آبادان
- **شماره مصوب:**۸۷۰۳۱-۱۲-۷۴-۴
- **نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارنده‌گان:** سیدرضا سیدمرتضائی
- **نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):**- -
- **نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان:** سیدرضا سیدمرتضائی
- **نام و نام‌خانوادگی همکاران:** مینا آهنگرزاده- حسین هوشمند- نیازمحمدکر- الهام جرفی- فرحناز کیان‌ارثی- یعقوب میاحی- محمد افشارنسب- لفته محسنی‌نژاد- مهرداد محمدی‌دوست- محمدصادق ملک‌پور- علی قوام‌پور
- **نام‌ونام‌خانوادگی مشاور(ان):** مسعود قربان‌پور
- **محل اجرا:** استان خوزستان
- **تاریخ شروع:**۸۷/۴/۱
- **مدت اجرا:**۱ سال و ۹ ماه
- **ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران**
- **شمارگان(تیتراژ):۲۰ نسخه**
- **تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۹**

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر،جداول،منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

طرح / پروژه : پایش عوامل عفونی در استخرهای پرورش میگوی وانامی در چوئبده آبادان

کد مصوب : ۸۷۰۳۱-۱۲-۷۴-۴

شماره ثبت (فروست) : ۸۹/۱۷۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سیدرضا سید مرتضائی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته انگل شناسی می‌باشد.

طرح/پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۱۳۸۸/۹/۲۲ مورد ارزیابی و با نمره ۱۷/٤و رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	صفحه

چکیده ---------- ۱
۱- مقدمه ---------- ۲
۲- مواد و روش ها ---------- ۷
۱-۲- روش بررسی مولکولی ویروس ها ---------- ۱۱
۲-۲- روش کاربا کیت مؤسسه ---------- ۱۱
۳-۲- آماده سازی نمونه واستخراج DNA برای تشخیص جداگانه (IHHNV,WSSV,TSV) بااستفاده از کیت IQ2000 ---------- ۱۲
۴-۲- مرحله PCR در کیتهای تشخیصی تک ویروسی ---------- ۱۵
۵-۲- روش آسیب شناسی بافتی ---------- ۱۹
۶-۲- روش های فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب ---------- ۲۰
۳- نتایج ---------- ۲۲
۱-۳- نتایج باکتری شناسی ، قارچ شناسی و انگل شناسی ---------- ۲۲
۲-۳- بررسی مولکولی ویروس ها ---------- ۲۸
۳-۳- آسیب شناسی بافتی ---------- ۳۴
۴- بحث ---------- ۴۱
پیشنهادها ---------- ۴۹
منابع ---------- ۵۲
پیوست ---------- ۵۵
چکیده انگلیسی ---------- ۷۱

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- South Aquaculture Research Center

Title:
Monitoring infectious agents in *L.vannamei* farms in choebdeh-Abadan

Executor :

Seyed Reza seyed Mortezaei

Registration Number
2010.170

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – South Aquaculture Research Center

---

Title : Monitoring infectious agents in *L.vannamei* farms in choebdeh-Abadan
Apprpved Number:4-74-12-87031
Author: Seyed Reza seyed Mortezaei
Executor *:* Seyed Reza seyed Mortezaei
Collaborator : M.Ahangarzadeh-H.houshmand- N.M.Kor –E.Jorfi F.kian ersi-L.mohseninejad – M.Afsharnasab-Y.Mayahi-M.mohammadidust-**A.Ghavampour,M.S.Malakpoor**
Advisor(s):M.Ghorbanpour
Location of execution : Kozestan province
Date of Beginning : 2008
Period of execution : 1Year & 9 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : ***20***
Date of publishing : ***2010***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

چکیده

بعد از تلفات سنگین میگوهای پرورشی در مزارع میگوی آبادان در سال ۱۳۸۱ و بوشهر در سال ۱۳۸۳ میگوی وانامی از هاوایی به ایران معرفی گردید .

از اهداف اصلی این طرح شناسایی عوامل عفونی (ویروسی ، باکتریایی ، قارچی و انگلی) در میگوهای وانامی ، تعیین شمارش کل باکتری و ویبریوها در استخرهای پرورشی میگو و رودخانه بهمنشیر ، تعیین فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب استخرها و شناسایی حاملین ویرو س لکه سفید در میگوها و سخت پوستان وحشی رودخانه بهمنشیر بوده است . در این بررسی ۵۴۰ نمونه میگو (پست لاروها ی ۱۵ – ۱۲) و میگوهای پرورشی از مزارع استان خوزستان برای شناسایی عوامل عفونی ، ۲۸۰ نمونه میگوی وانامی ، میگوی وحشی و خرچنگ با استفاده از روش مولکولی (کیت Iq2000) و کیت داخلی ساخت ایران (مؤسسه) برای شناسایی ویروس های WSSV ، IHHNV و TSV مورد بررسی قرار گرفت .

همچنین ۱۲۰ نمونه از دو بافت آبشش و هپاتوپانکراس میگوها جهت شناسایی و ردیابی ویروس ها با استفاده از روش آسیب شناسی بافتی جمع آوری و سپس در محلول دیویدسون فیکس و سپس به الکل ۷۵ ٪ جهت آزمایش منتقل گردید . فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب شامل pH ، اکسیژن محلول ، BOD ، نیترات ، نیتریت ، آمونیاک ، سختی کل و شوری با روش های مختلف اندازه گیری گردید . بطور کلی در این مطالعه ۱۰ جنس و گونه باکتری بخصوص ویبریوآلجینولیتیکوس ، ویبریوپاراهمولیتیکوس ،ویبریو پروتئولیتیکوس ، پلزیوموناس شیگلوئیدس ، ۶ گونه قارچ بخصوص آسپرژیلوس نایجر ، فومیگاتوس و فلاووس و ۲ جنس انگل ورتیسلا و زئوتامنیوم جدا سازی گردید . از خرچنگ جنس Sesarma با استفاده از کیت Iq2000 ویروس لکه سفید شناسایی گردید .

همچنین ویروس های WSSV ، IHHNV ، TSV ، HPV و MBV با استفاده از روش مولکولیPCR کیت ساخته مؤسسه ، کیت Iq2000 و روش هیستوپاتولوژی شناسایی گردید . میانگین ویبریو کل $۱۰^{۳}\times$ ۱/۹۶ – $۱۰^{۳}\times$ ۰/۰۱ و باکتری کل ($۱۰^{۳}\times$ ۱۴/۲۵ – $۱۰^{۳}\times$ ۰/۲۱) در بافت میگو شمارش گردید.

فاکتورهای شوری (۲۲/۵ ppt – ۱۲/۳) BOD (۱۰/۲۱ ppm – ۱/۹۸) ، اکسیژن محلول (۱۱/۲۵ ppm –۳/۱۷) ، آمونیاک (۳/۴۵ ppm –۰/۰۲) ، درجه حرارت ۳۱/۵ – ۲۰ سانتی گراد اندازه گیری گردید .

لغات کلیدی : میگوی وانامی – باکتری – ویبریو – قارچ – انگل – آسیب شناسی بافتی – فاکتورهای فیزیکی وشیمیایی آب – آبادان – استان خوزستان

۱- مقدمه

بیش از یک هزار سال است که از قدمت پرورش آبزیان در جهان و بخصوص کشورهای خاور دور می گذرد. در گذشته های دور، تولید آبزیان در حد یک حرفه کوچک و بطور عمده جهت مصرف شخصی یا مصرف جوامع کوچک دیگر صورت می گرفت. اما در نتیجه رشد روز افزون جمعیت جهان و به موازات آن، افزایش میزان نیاز به پروتئین در سراسر جهان، وجود قابلیت بالای منابع آبی جهت تامین این نیاز با بهره برداری بیشتر از آبزیان، اجتناب ناپذیر گردید.

در ابتدا آبزیان مورد نیاز بازارهای مصرف، فقط از طریق صید از منابع طبیعی تامین میگردید. تا اینکه به دلیل افزایش هزینه های صید و یا صید بیش از حد و نابودی بسیاری از ذخایر در نتیجه آلودگی محیط زیست آبزیان، تمایل به آبزی پروری و تامین تقاضای بازارهای مصرف از طریق پرورش مصنوعی افزایش یافت.

درسالهای اخیر، پرورش میگو یکی از عمده ترین حرف تعدادی کشورهای آسیایی گردیده است . این امر از میزان بالای تولید سالانه آنها و ارزآوری کلان وسود مناسبی که این پیشه برای کشورهای تولید کننده دارد، مشخص می گردد. تولید جهانی میگوی پرورشی به رغم مشکلات مبتلا مانند بیماری های ویروسی و نوسانات قیمت جهانی طی سال های اخیر روندی صعودی داشته است و با توجه به گزارش سایت فائو از ۸۵۴۲۱۴تن در سال ۱۹۹۵ با افزایش ۱۴۸ درصدی به ۲۱۱۶۲۲۱ تن در سال ۲۰۰۵ رسیده است(WWW.FAO.ORG REPORT,2006)

کلیات

بیماری های میگو

بیماری های میگو یکی از مهمترین عوامل محدودکننده فعالیت های تکثیر و پرورش جهان می باشد. از زمان شروع صنعت تکثیر و پرورش در سال ۱۹۷۰، بیش از ۵۰ کشور به توسعه این صنعت مبادرت نموده و حجم بالایی از تولیدات آبزی در این کشورها به میگوهای پرورشی اختصاص یافته است. اما بروز برخی از بیماریها بویژه بیماری های ویروسی، اغلب کشورها به ویژه کشورهای آسیایی جنوب شرقی را با مشکلات جدی مواجه نموده است. بر طبق گزارش دفتر همه گیری بین المللی (OIE, 2003) بیش از ۸۰٪ از علل تلفات مربوط به میگو از ویروس ها و باکتری ها است (۵۸٪ ویروس ها و ۲۲٪ باکتری ها).

تا سال ۱۹۸۹ تنها ۶ ویروس تاثیر گذار در میگوهای پنائیده شناسایی شده بود، اما تا سال ۱۹۹۷ بیش از ۲۰ ویروس تشخیص داده شد که ذخایر وحشی و تولیدات تجاری را تحت تاثیر قرار می دهند. اما در حال حاضر OIE، هفت بیماری ویروسی میگو را در قالب قوانین سلامت موجودات آبزی معرفی نموده است. که گمان می رود توانایی سرایت داشته و از لحاظ اجتماعی، اقتصادی و سلامت عمومی حائز اهمیت می باشند. این بیماریهای ویروسی عبارتند از: بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) بیماری ویروسی سر زرد (YHV) ، بیماری ویروسی سندرم تورا (TSV) بیماری ویروسی کشنده مولد (SMR) ، بیماری با کلوویروس پنئی (BP) ، بیماری ویروسی نکروز عفونی غدد زیرپوستی و بافت خونساز (IHHNV) و منودون باکلوویروس (MBV) (OIE, 2003).

وضعیت میگوی وانامی در جهان و ایران

میگوی وانامی، گونه بومی سواحل اقیانوس آرام در کشور مکزیک، مرکز و جنوب آمریکا تا جنوب پرو می باشد که دمای آب این مناطق در تمام طول سال بطور طبیعی بالای ۲۰ درجه سانتی گراد می باشد (Wyban and Sweeny, 1991; Rosenberry, 2002). اولین حرکت های آزمایشی میگوهای خانواده پنائیده در اوایل دهه ۱۹۷۰ هنگامیکه محققین فرانسوی در تاهیتی (Tahiti) تکنیک های پیشرفته ای را برای تولید متراکم و پرورش میگوهای *P. japonicus*،*P. monodon* و *L. vannamei* و سرانجام *L. stylirostris* بکار بردند، شروع شد. در اواخر دهه

۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ میگوی وانامی از گستره طبیعی خودشان در سواحل اقیانوس آرام به آمریکای لاتین از مکزیک تا پرو منتقل شدند.

معرفی*L. vannamei* به آسیا در سال ۷۹-۱۹۷۸ شروع شد، ابتدا از فیلیپین و در سال ۱۹۸۸ به چین منتقل و فقط چین توانست آن را در حد صنعتی تولید کند. لیکن اولین محموله تجاری عاری از هر گونه ویروس مولدین وانامی از آمریکا به آسیا، از هاوایی به تایوان در سال ۱۹۹۶ صورت گرفت. این معرفی از چین و تایوان آغاز و سپس تا فیلیپین، اندونزی، ویتنام ، تایلند، مالزی و هند گسترش یافت(جدول۱)(wyban,2002).

جدول ۱- واردات میگوی سفید غربی(*L.vannamei*) به آسیا و اقیانوسیه

کشور	اولین معرفی میگوی سفید غربی	منبع اصلی	گونه های پرورشی اصلی	دلیل ورود میگوی سفید غربی	بیماریهای ویروسی رایج
چین	۱۹۸۸	تگزاس	C,M,J,P,Me	تنوع –اجرا	WSSV-YHV-TSV,MBV SMV,HP-IHHNV
تایوان	۱۹۹۵	هاوایی	M,J,Ma	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV-YHV- IHHNV-MBV-TSV
تایلند	۱۹۹۸	تایوان	M	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV MBV- HPV YHV- IHHNV-TSV-MOV
ویتنام	۲۰۰۰	چین	M,I,Me	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV-YHV
فیلیپین	۱۹۹۷	تایوان	M,Me	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV-YHV
اندونزی	۲۰۰۱	هاوایی	M,S	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV-YHV-MBV-TSV-IHHNV
مالزی	۲۰۰۱	تایوان	M,S	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV-MBV-HPV YHV-IHHNV
هند	۲۰۰۱	تایوان	M,I,Ma	مشکلات بیماری لکه سفید میگو ببری سیاه	WSSV-MBV-HPV-YHV
سری لانکا	—	—	M	—	WSSV-YHV-MBV
جزایر اقیانوس آرام	۱۹۷۲	مکزیک –پاناما	M,Me,J	بطور آزمایشی	—

گونه های پرورشی:C : میگوی چینی:،M : میگوی ببری سیاه،Me : میگوی موزی،I : میگوی سفید هندیj : میگوی ژاپنی ،Ma : میگوی آب شیرین

از سال ۲۰۰۰ میلادی میگوی عاری از عوامل بیماری زای خاص(SPF) یا سوپر میگو به صورت آزمایشی به کشورهای مختلف آسیایی معرفی شد اما تا تاریخ مذکور تنها کشور برونئی این صنعت را توسعه داده است. در حال حاضر صنعت پرورش میگوی سفید غربی در کشورهای آسیای جنوب شرقی گسترش یافته است بطوریکه

در چین در سال ۲۰۰۵ نزدیک به ۴۰۷۶۴۲ تن میگوی وانامی یعنی ۶۵٪ تولید میگوی کشور را به خود اختصاص داده است. (جدول۲)

جدول ۲- روند تولید میگوهای پرورشی به تفکیک گونه(تولید به تن)

گونه	۱۹۹۸	۱۹۹۹	۲۰۰۰	۲۰۰۱	۲۰۰۲	۲۰۰۳	۲۰۰٤	۲۰۰۵
میگوی وانامی	۱۹۳۵۱۲	۱۸۶۳۱۱	۱۴۵۳۸۷	۲۸۰۱۴۴	۴۷۹۵۱۷	۷۳۹۸۶۶	۹۵۵۸۷۵	۱۱۹۳۲۴۸
میگوی ببری سیاه	۵۰۲۹۸۸	۵۴۷۶۱۸	۶۳۰۹۸۴	۶۷۳۰۰۰	۶۳۱۵۵۲	۷۳۰۴۰۰	۷۰۰۰۱۶	۷۱۰۸۰۶
میگوی موزی	۳۶۵۷۳	۴۴۲۱۳	۵۰۳۹۳	۶۱۳۱۱	۶۵۳۹۱	۸۰۱۸۷	۸۱۷۱۵	۸۱۱۰۵
میگوی ژاپنی	۲۵۴۹	۲۳۸۳	۲۸۳۸	۲۵۶۲	۲۴۰۸	۴۴۵۸۲	۴۷۳۱۴	۴۳۱۸۱
میگوی سفید هندی	۱۰۹۹۳	۱۱۴۲۸	۱۶۴۱۷	۲۵۵۵۹	۲۵۷۳۶	۳۱۵۶۰	۳۳۰۸۵	۳۱۸۷۵

همانگونه که در جدول شماره ۲ مشخص است قریب به ۹۰ درصد میگوی تولیدی در جهان مربوط به دو گونهٔ وانامی و ببری سیاه است.

معرفی گونه وانامی به صنعت تکثیر و پرورش ایران توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران در سال ۱۳۸۳ صورت گرفت و نتایج موفقت آمیزی بدنبال داشت. در ادامه این طرح در سال ۱۳۸۵، اجرای دو پایلوت تحقیقاتی در استان خوزستان و بوشهر با هدف امکان سنجی پرورش میگوی وانامی با تأکید بر بیماری لکه سفید در زمینه بهبود تولید میگو و همچنین مقایسه ای بین تولید میگوی وانامی و سفید هندی انجام گرفت.

بیماری لکه سفید (WSD) موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می شود بطوریکه در چین (Huang et al, 1994)، تایلند (Wongteera supay et al, 1995)، ژاپن (Takahashi et al, 1994)، تایوان (Wang et al, 1995)، اندونزی و هند (Anon, 1994) و ایران (افشار نسب و همکاران، ۱۳۸۴) موجب میلیاردها دلار خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو شده است. بیماریزایی این ویروس در مناطق مختلف از جمله چین، هند، آمریکا، تایلند و همچنین در گونه های مختلف از جمله میگو *L.vannamei*، *P.chinensis*، *P.duorarum* مورد مطالعه قرار گرفته است و بنظر می رسد حساسیت گونه های مختلف میگو به این بیماری به نوع گونه و مراحل زندگی میگو که در معرض ویروس بیماری قرار می گیرند بستگی دارد (Wang et al, 1999).

اولین تلفات ناشی از بیماری TSV در میگوهای پرورشی وانامی در تایوان از مولدین وحشی آمریکای لاتین وارد شده در آسیا مشاهده گردید (Tu et al, 1999)، TSV و IHHNV در هاوایی و آمریکا در میگوهای *L.vannamei* و *P.stylirostris* تلفات سنگینی داشته است ولی تلفات ناشی از TSV در میگوی وانامی در اکوادور بیشتر بوده است (Lightner, 1999).

برای اولین بار ویروس IMNV در میگوی وانامی درکشور برزیل و سپس در کشور اندونزی گزارش گردید (Senapin *et al*, 2007).

بیشترین جابجایی عوامل بیماری زا بخصوص ویروس ها از کشورهای آسیایی به آمریکا و بالعکس توسط میگوی زنده و یا یخ زده صورت گرفته است (Lightner, 2004; Cheng *et al*, 2004; Flegel, 2006).

بهمین دلیل روش های مختلفی جهت تشخیص این بیماری ها گزارش گردیده است از جمله روش PCR، روش Insitu hybridization، Dot blot hybridization، ELISA و روش پاتولوژی می باشد. امروزه جهت تشخیص سریع بیماری های ویروسی و حتی باکتریایی از کیت های تجارتی مختلف که با روش PCR کار می کنند و بصورت دو مرحله ای (Nested) می تواند در تشخیص سریع بیماریها بسیار موثر و مفید واقع شود استفاده می شود. (Senapin *et al*., 2007; Saurabh *et al.*, 2006; Lightner *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 2001; Sukhumsirichart *et al.*, 1999; Pantoja *et al.*, 2000; Manjanaik *et al.*, 2005) ویروس TSV یا سندرم تورا در میگوهای پنائیده و در نمونه های میگوی وانامی در رودخانه تورای اکوادور شناسایی گردید. این ویروس که متعلق به خانواده Picornaviridae است در سیتوپلاسم سلولهای اپی تلیال کوتیکولی قرار دارد(Bonami *et al.*, 1997). این ویروس بصورت مکانیکی توسط پرندگان دریایی دیگر استخرها را نیز می تواند آلوده نماید (Kristie *et al*., 2004). همچنین در میگوهای وانامی در هچری های کشور مکزیک ویروس های IHHNV و HPV را نیز جدا کردند ولی علت اصلی تلفات در این میگوها که علائم بالینی نکروز شدن روی کوتیکول، رنگ قرمزی در دم و پاهای شنا ناشی از ویروس TSV گزارش گردید (Morales et al., 1999).

حضور همزمان ویروس های متعدد در میگوهای منودون و وانامی توسط دانشمندان دیگر گزارش گردیده است برای مثال همزمانی حضور ویروس های WSSV، IHHNV و TSV در میگوهای وانامی در تایلند (Limsuwan, 2003) ویروس های WSSV، MBV و HPV در منودون در هند (Otta *et al*, 2003; Umesha *et al*, 2003) همچنین محققین گزارش کرده اند که هر وقت آلودگی MBV، HPV و IHHNV در میگوهای منودون در هچریهای هندوستان مشاهده گردیده است آلودگی شدید به تک یاخته های زئوتامنیوم و باکتری های جنس ویبریو نیز بوفور جداسازی شده است (Manivannan *et al*, 2002).

همچنین بیشترین باکتریهای جدا شده از میگوهای خانواده پنائیده بخصوص میگوی منودون و وانامی متعلق به گونه های ویبریو بوده است (Chanratchakookl, 1995; Guzman *et al*, 2001; Vanderberghe *et al*, 1999; Selvin et al, 2003; Karunasagar *et al*, 2004).

۲- مواد و روش ها

پس از جمع آوری اطلاعات اولیه در مورد وضعیت منطقه، ایستگاه ها براساس کارگاه های فعال و اهداف پروژه تعیین و نمونه برداری آغاز گردید. از ۳ قسمت، رودخانه بهمنشیر (۲ ایستگاه روبروی کانال های آب رسان در رودخانه بهمنشیر تعیین گردید)، و از ۶ کارگاه فعال برروی کانال های آب رسان C4 و C5 از هر کارگاه یک استخر (بصورت تصادفی انتخاب گردید) و بر طبق جداول ذیل نمونه برداری انجام گرفت (جدول ۳).

جدول ۳- نمونه گیری از آب و میگو جهت شناسایی باکتری، قارچ ، انگل و ویروس

محل نمونه گیری	نوع نمونه	تعداد دفعات نمونه گیری			
		عملیات باکتری شناسی (total count) (total vibrio)	عملیات قارچ شناسی	عملیات انگل شناسی	عملیات ویروس شناسی
رودخانه (۲ ایستگاه)	آب	هر دو هفته یکبار	-	-	-
	آبزی میگوها و خرچنگها	-	-	-	میگو و خرچنگ (ماهیانه)
کانال C5 و C4	آب	هردو هفته	-	-	میگو و خرچنگ (ماهیانه)
	آبزی	-	-	-	-
استخر پرورشی ۶ استخر	آب	هر دو هفته	-	-	-
	میگو	-قبل از ذخیره سازی -ماه اول (هر هفته) -ماه دوم هردو هفته یکبار -زمان بروز بیماری	-قبل از ذخیره سازی -ماه اول (هر هفته) -ماه دوم هردو هفته یکبار -زمان بروز بیماری	قبل از ذخیره سازی Pl30 به بالا هردو هفته یکبار زمان بروز بیماری	قبل از ذخیره سازی ماه اول هر هفته ماه دوم به بعد (هر دو هفته یکبار) زمان بروز بیماری

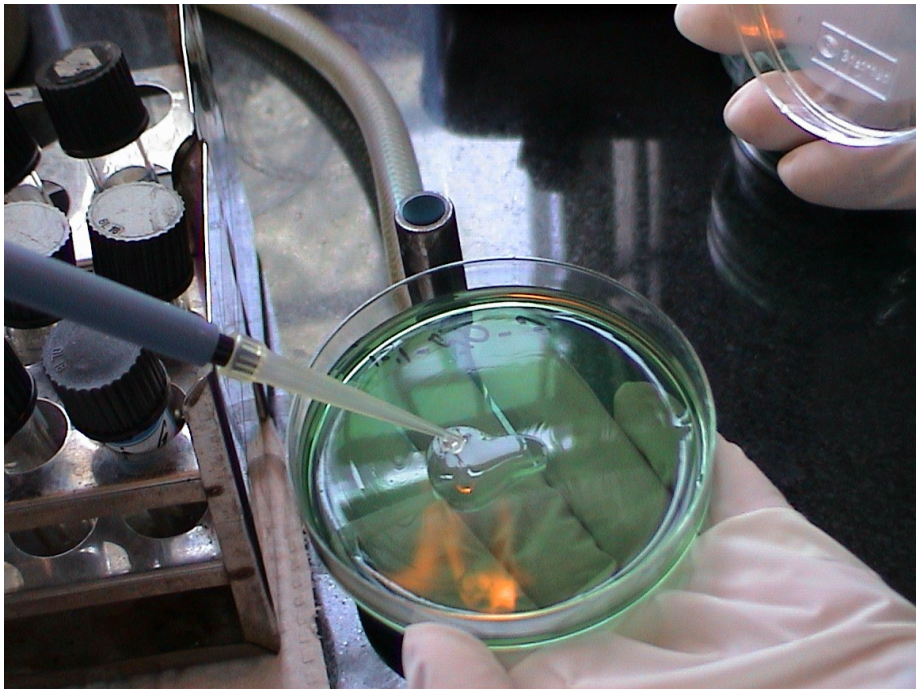
نمونه های میگوها و خرچنگ های وحشی صید شده توسط تور ترال جهت ردیابی ویروس لکه سفید میگو (بیماری لکه سفید white spot syndrome) و تعداد باکتری کل (Total count) و تعداد کل ویبریو (Total vibrio) در رودخانه بهمنشیر آغاز گردید.

روش های انجام شده در هر مورد بدین شرح می باشد:

روش نمونه برداری باکتری شناسی، قارچ شناسی و انگل شناسی

نمونه های آب مربوط به هر ایستگاه (آب استخرهای پرورش میگو، کانالهای آب رسان و دو ایستگاه بهمنشیر) در بطری های ۱۰۰ میلی لیتری دهان گشاد شیشه ای استریل با در پوش پیچی لاستیکی از عمق ۵۰ سانتی متری از سطح آب جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل و شمارش کلی باکتری (Total count) به روش گسترش (spread method) انجام گردید. بدین صورت که از نمونه اخذ شده رقت های مختلف تهیه وسپس ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت را در سطح پلیت ریخته و با استفاده از میله شیشه ای خمیده پخش شد.

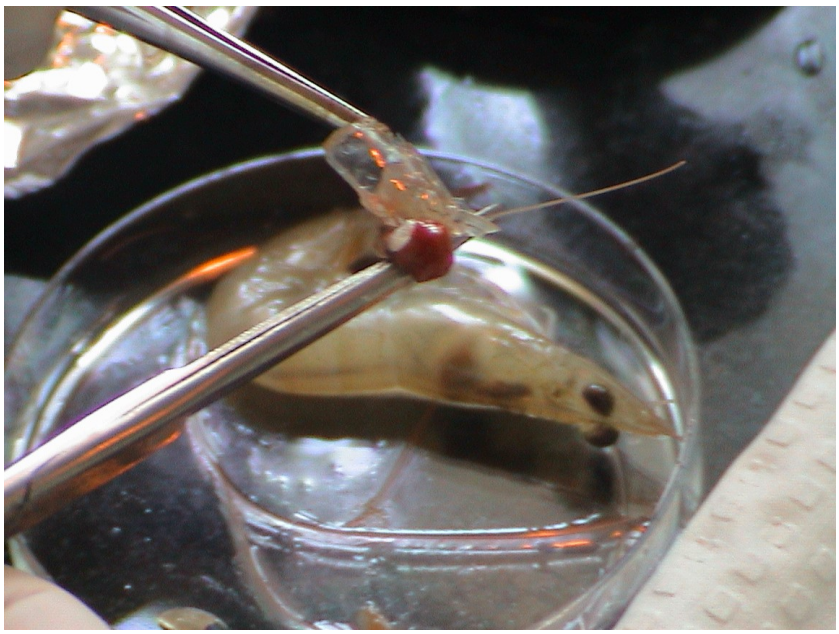
پس از طی زمان انکوباسیون ۴۸-۲۴ (ساعت) پلیت هایی را که دارای ۳۰۰-۳۰ کلنی هستند شمارش و تعداد کلنی ها در عکس ضریب رقت ضرب وتعداد تقریبی باکتری های موجود در ۱ میلی لیتر نمونه محاسبه گردید(تصاویر۱و۲)(CFU:colony forming unit)



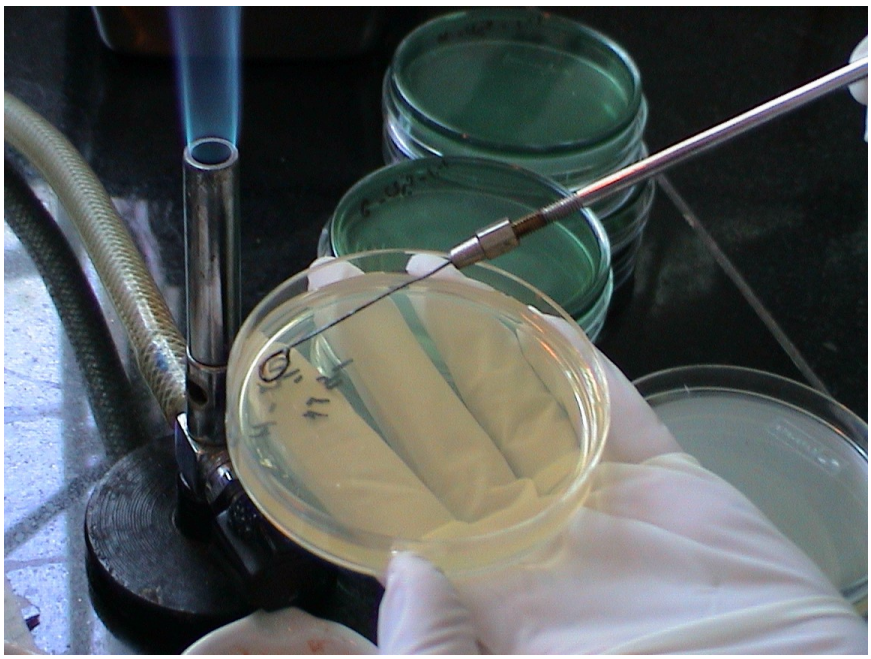
تصویر۱-کشت میکروبی آب استخرها و میگوهای پرورشی

تصویر۲-نمونه های آب استخرهای پرورشی جهت تعیین کلیفرم

همچنین همزمان شمارش کلی ویبریوها با استفاده از محیط اختصاصیTCBS نیز انجام گرفت. ارزیابی آلودگی احتمالی به کلیفرم ها (به روش MPN– لاکتوز براث) و آزمایش تائیدی کلیفرم به روشMPN-BGBLB به استناد استاندارد شماره ۳۷۵۹ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام گردید این نمونه برداری از ۶ استخر پرورشی ۲ کانال آب رسان و ۲ ایستگاه بهمنشیر از ابتدا تا انتهای دوره به صورت هر دو هفته یکبار انجام گرفت. برای شمارش کلی ویبریوها از بافت میگو یک گرم بافت مورد نظر را درون یک هاون چینی استریل هموژن کرده و سپس تهیه رقت های مختلف بر روی سطح پلیت ریخته و پخش گردید پس از زمان انکوباسیون کلنی ها شمارش وتعداد تقریبی باکتری های موجود در ۱ گرم نمونه محاسبه وبرای شمارش کلی ویبریوها از محیطTCBS استفاده گردید(تصاویر۳و۴).



تصویر۳-نمونه برداری از اندام های مختلف میگو جهت شناسایی میکروارگانیسم ها



تصویر٤-کشت باکتریایی اندام های میگو

جهت شناسایی باکتری و قارچ از میگوهای ریز (پست لاروهای ۱۷ تا ۲۵ روزه) هموژن و از روش تلقیح بر روی محیط کشت باکتری(TSA) حاوی ۲/۵٪ نمک ومحیط قارچ (SDA+C) حاوی کرامفینکل استفاده گردید. محیط کشت باکتری در انکوباتور با دمای ۲ ±۲۸ درجه سانتی گراد بمدت ۴۸-۲۴ ساعت و محیط کشت قارچ در انکوباتور با دمای ۲ ±۲۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۴-۱۰ روز قرار داده می شد. در میگوهای با وزن بیش از ۲ گرم از آبشش و هپاتوپانکراس در شرایط کاملاً استریل از میگو جدا شده و پس از هموژن نمودن بر روی محیط های کشت باکتری و قارچ تلقیح گردیدند. جهت تشخیص تفریقی از محیط های افتراقی مانند TCBS (جهت شناسایی ویبریوها) و رنگ آمیزی گرم و همچنین تستهای بیوشیمیایی استفاده گردید. نتایج آزمایشات باکتری شناسی با استفاده از جداول و منابع موجود تشخیص و شناسایی گردید (Buller,2004).

پلت های حاوی کشت قارچ پس از رشد و رنگ پرگنه با رنگ آمیزی لاکتوفنل انجام و سپس با استفاده از منابع موجود قارچ ها شناسایی شدند (Murray, 1998) جهت انجام عملیات انگل شناسی پاهای شنا و آبشش ها جدا گردیده و با استفاده از لوپ و میکروسکوپ تک یاخته های خارجی جدا و نمونه لام مرطوب تهیه وعکسبرداری گردید.

۱-۲- روش بررسی مولکولی ویروس ها

جهت شناسایی ویروس های مهمی که می توانند میگوی وانامی را تحت تاثیر قرار دهند روش نمونه برداری بدین صورت بود که خرچنگ ها و میگوهای وحشی رودخانه بهمنشیر به صورت ماهانه توسط تور ترال صید گردیده، ۱۰٪ نمونه در الکل مطلق فیکس و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شناسایی نمونه ها در صورت امکان انواع مشابه بصورت Pool درآمده و از بافت آبشش آنها جهت استخراج DNA و شناسایی ویروس استفاده شد. همچنین از ۳۰۰ پست لارو قبل از ذخیره سازی در استخرها، نمونه برداری شده، جهت انجام آزمایش های ویروس شناسی استفاده گردید. از ۶ استخر (از هر کارگاه ۱ استخر) در ماه اول پس از ذخیره سازی به صورت هفتگی و از ماه دوم به بعد هر دو هفته یک بار ۱۰ میگو جهت انجام آزمایشات ویروس شناسی نمونه برداری انجام شد.

با توجه به حساسیت هایی که در رابطه با ورود میگوی غیر بومی پا سفید غربی به کشورمان وجود داشته، شناسایی احتمالی ویروس های آلوده کننده این میگو با ۳ روش از جمله کیت موسسه (ساخت ایران)، Multivir IQ2000 و WSSVIQ بررسی ویروس هایWSSV ،IHHNV وTSV انجام گرفت که روش های به کار گرفته شده بدین شرح می باشد:

۲-۲- روش کار با کیت مؤسسه

جهت استخراجDNA، پس از آماده سازی بافت نمونه (آبشش ها) ابتدا با استفاده از آب مقطر یک محلول همگن تهیه و۲۰۰µl از بافت هموژن با ۹۰۰µl از محلول استخراجDNA در لوله میکروتیوب ریخته شده و پس از افزودن ۴۰۰µl کلروفرم ونگهداری در شرایط آزمایشگاهی برای ۱۰ دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و پس از جداسازی محلول رویی و افزودن ۵۰۰µl ایزوپروپانل و سانتریفوژ کردن، محلول رویی خارج و به رسوب DNA یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ اضافه گردید. سپس نمونه در ۷۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس محلول رویی خارج و رسوب در لوله نگهداری شد. بعد از خشک شدن پلت رسوب شده، آب مقطر استریل اضافه و ۵ µl از نمونه را بر روی ژل اگارز ۰/۷ ٪ بارگذاری نموده، با استفاده از

رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و اشعه UV عکسبرداری از آن صورت گرفت. برای PCR کردن نمونه استخراج شده با استفاده از اپندروف^{cc} ۰/۲ بدین صورت اجرا شد:

تکان دادن (DNA) ۵µl+ محلول $\xrightarrow{mix}$ µl(Diluent) ۱۰+ (پرایمر R) ۲µl + (پرایمر F)

در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شده، PCR انجام گردید.

در هر بار آزمایش از شاهد مثبت موجود در کیت و شاهد منفی (فاقدDNA) نیز استفاده می گردید. در پایان مرحلهPCR ، ۵µl از هر نمونه را در یک ژل اگارز ۱٪ ریخته و نتیجه آزمایش در دستگاه ژل داکیومنت مشاهده و عکسبرداری گردید.

۳-۲- آماده سازی نمونه و استخراج DNA برای تشخیص جداگانه ویروسهای (TSV، WSSV،IHHNV)

با استفاده از کیت IQ2000

مقداری از نمونه (آبشش، پای شنا، PL و یا به مقدار ۵۰ میکرولیتر از همولنف نمونه) درون میکروتیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری قرار داده شده، ۰/۶ میلی لیتر از محلول DTAB (تصویر۵) به آن اضافه می شود. توسط گریندرهای یک بار مصرف نمونه درون آن خرد گردیده، در حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و پس از آن اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسد. پس از یک همزنی مختصر، ۰/۷ میلی لیتر کلروفرم اضافه نموده، همزنی به مدت ۲۰ ثانیه و بعد از آن ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CTAB و ۹۰۰ میکرولیتر ddH2O به آن افزوده شد.

تصویر ۵ – محلولهای استفاده شده در مرحله استخراج به روش DTAB-CTAB

همزنی مختصر نموده، درون حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و پس از آن اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسد. به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. با دقت مایع رویی بیرون ریخته شده و با ۱۵۰ میکرولیتر Dissolve solution پلت دوباره حل گردیده، به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن تا رسیدن به دمای اتاق، خنک شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شده، به میزان ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه گردید. بعد از همزنی مختصر، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، شستن پلت با اتانول ۷۰٪ به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر، آن را اسپین نموده، پلت خشک شد (محلول فوقانی را بیرون ریخته و اجازه داده می شود پلت موجود در کف میکروتیوب خشک شود). حدود ۵۰ میکرولیتر ddH2O درون آن ریخته شد.

۱-۳-۲- استخراج DNA در روش IQ2000 WIT Multivir system

برای آماده سازی نمونه ابتدا بافت مورد نظر که غالباً در این پروژه از آبشش استفاده شده است در یک تیوب ml ۱/۵ همراه با µl ۵۰۰ محلول استخراج (تصویر۶) به خوبی همگن شده و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در محیط آزمایشگاه µl ۱۰۰ کلروفورم به آن افزوده به مدت ۲۰ ثانیه همزنی صورت گرفت.

تصویر٦ – محلول های استفاده شده در مرحله استخراج
در کیت IQ2000 WIT Multivir system

پس از ۳ دقیقه قرارگرفتن در دمای محیط، به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. µl ۲۰۰ از محلول شفاف فوقانی به یک میکروتیوپ جدید منتقل گردید و ۴۰۰µl الکل خالص به آن اضافه شد. پس از یک همزنی مختصر با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و اتانول موجود در تیوب خارج گردیده، پلت باقیمانده در کف خشک شده، بسته به اندازه، پلت در آب DEPC حل گردید .

۲-۳-۲- استخراج RNA

نمونه را در میکروتیوب ml ۱/۵ قرار داده، ۵۰۰ میکرولیتر RNA Extraction solution اضافه می شود. نمونه توسط گریندرهای یک بار مصرف به خوبی همگن گردیده، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می شود. ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم (CHCl3) به آن اضافه کرده، همزنی به مدت ۲۰ ثانیه، نگهداری به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق و سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه از مراحل بعدی هستند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن به یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری منتقل گردیده، ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه می شود.پس از همزنی مختصر، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ریختن ایزوپروپانول صورت می گیرد. سپس شستن پلت با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪، سانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دور ریختن اتانول انجام می‌شود و پس از آن اجازه می دهیم تا پلت RNA خشک شود. در پایان ۳۰ میکرولیتر آب DEPC به پلت افزوده میشود.

٤-۲- مرحله PCR در کیت های تشخیصی تک ویروسی

به منظور یکسان سازی اثر مقدار کمّی DNA به کارگرفته شده در همه آزمایش ها، با کمک یک دستگاه اسپکتروفتومتر (Genova MK2) غلظت هر یک از نمونه های به دست آمده اندازه گیری شده و به تجربه مشخص گردید که بهترین مقدار برای غلظت DNA مورد استفاده ۱۵۰ ng/µl می باشد. لذا برای هر نمونه در مرحله واکنش PCR غلظت متناسب تهیه و به کار گرفته می شد (تصویر۷ و۸).

تصویر۷ – کیت های تشخیص مولکولی ویروس های TSV، WSSV و IHHNV

کلیه مراحل PCR در تیوب های ۰/۲ میلی لیتری و با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر متعلق به شرکت Corbet (AUS) با چرخه های دمایی انجام گردید(جدول۴). محصول به دست آمده در روش تشخیصی ویروس ها به صورت تکی، پس از رانده شدن در ژل ۱ تا ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، در دستگاه ژل داکیومنت (UVidoc) عکس برداری و نتایج آن ثبت می گردید

۱-٤-۲-PCR در روش IQ2000 WIT Multivir system و مشاهده نتایج در بیوچیپ

در مرحله PCR پس از آماده سازی محلولهای مادر برای دو مرحله PCR شامل RT–PCR و Nested–PCR بر حسب تعداد نمونه های مورد بررسی به علاوه ۲ نمونه جهت شاهدهای مثبت و منفی ابتدا مرحله RT – PCR با شرایط زیر بر روی نمونه ها اجرا گردید : ۴۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه ۹۴ درجه سانتیگراد ، ۲ دقیقه و سپس ۳۰ ثانیه دمای۹۴ درجه سانتیگراد ، ۳۰ ثانیه دمای ۵۵ درجه سانتیگراد ، ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد با تکرار ۲۵ چرخه و در پایان ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد ، ۳۰ ثانیه دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در مرحله انتهایی اجرا گردید .

در مرحله Nested–PCR شرایط اجرا شده به شرح ذیل می باشد : ۲۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ، ۲۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه دمای۷۲ درجه سانتیگراد با تکرار ۳۰ چرخه و پس از آن ۳۰ ثانیه۷۲ درجه سانتیگراد ، ۳۰ ثانیه ۲۰ درجه سانتیگراد در انتهای چرخه اجرا گردید.

تصویر۸ – کیت IQ2000 WIT Multivir system PCR

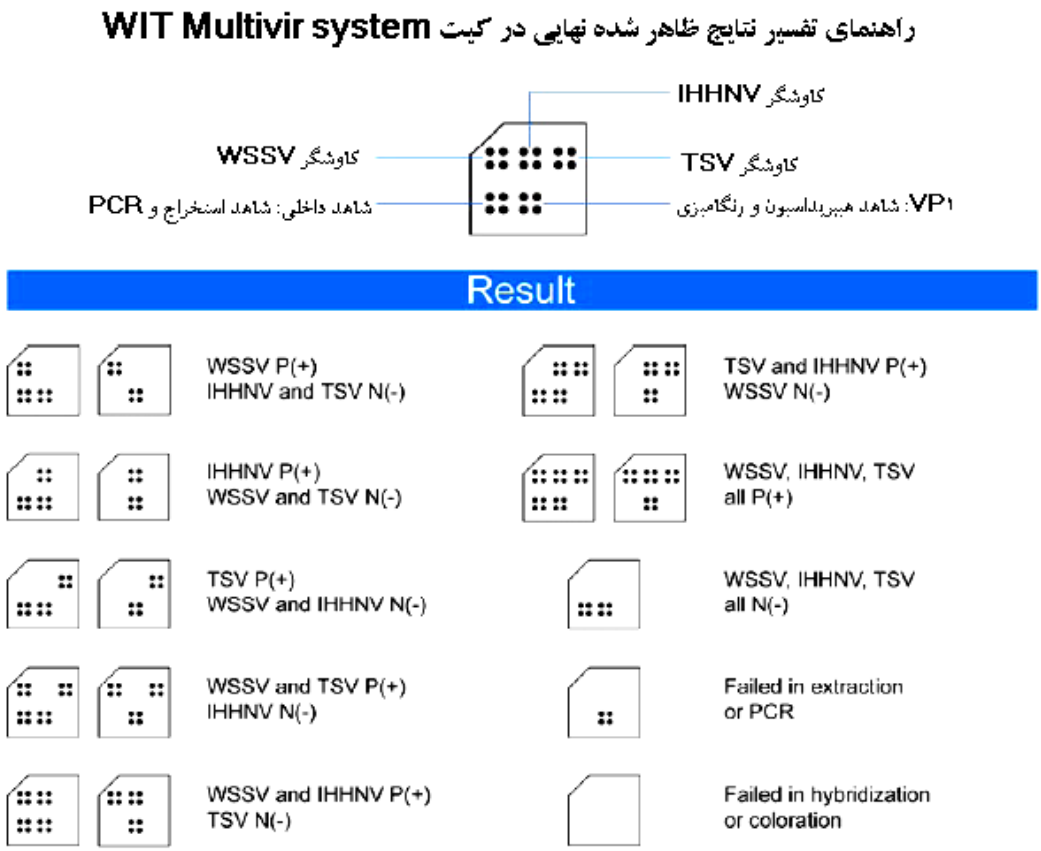
پس از اجرای ۲ مرحله PCR مراحل هیبریداسیون و رنگ آمیزی به صورت زیر اجرا گردید:

۴۷۵ µl از بافر Hyb را در هر یک از واحدهای چیپ قرار داده و کل محلول PCR (حدود ۲۵ µl) به آن افزوده شد. به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و در دستگاه IQ–Spotter که به طور همزمان با فراهم نمودن شرایط دمایی مورد نظر، چیپها را در حالت لرزشی قرار می دهد، انکوباسیون انجام شد(تصویر۹).

تصویر۹ – دستگاه IQ-Spotter

پس از اتمام این مدت، کل محلول از چیپ خارج گردیده و با استفاده از بافر شستشو (۵۰۰ µl) به مدت ۵ دقیقه در دمای ^{0C} ۵۰ بدون لرزش چیپ ها انکوبه گردیدند. دو بار این فرایند بر روی چیپ ها تکرار گردید.

سپس مخلوط بلاکینگ شامل ۵۰۰ µl بافر بلاکینگ همراه با ۰/۵ میکرولیتر بلاکر برای هر واحد چیپ به آن افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ضمن تخلیه محلول، دو بار مرحله شستشو با بافر همراه با انکوباسیون تکرار گردید (مطابق مرحله قبل). پس از انجام مراحل هیبریداسیون، به منظور اجرای مرحله رنگ آمیزی ۴۰۰ µl محلول تشخیص شامل ۳۹۲ µl بافر شستشو همراه با ۸ میکرولیتر Detector در هر واحد چیپ ریخته و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. در این مرحله پس از خارج ساختن محلول کنترل، vp1 چیپ که بیانگر صحت کارایی چیپ می باشد ظاهر می گردد . بعد از شستشوی چیپ با آب تمیز، نتایج حاصله بررسی گردید. در صورت پایین بودن دمای اتاق واکنش رنگ آمیزی کمی بیشتر طول می کشد. در مرحله قرائت نتایج با توجه به موقعیت هر بیماری در چیپ ، در صورت بروز علامت، نتیجه برای بیماری مورد نظر مثبت و در صورت عدم ظهور هرگونه علامت، نتیجه منفی اعلام گردید(تصویر۱۰).



تصویر ۱۰ – راهنمای تفسیر نتایج حاصل از کیت Multivir

جدول ٤ – مقایسه مراحل PCR در کیتهای مختلف.

نوع کیت	مرحله اول PCR		
	زیرمرحله اول	زیرمرحله دوم	زیرمرحله سوم
System Multivir WIT	۹۴°C ۲ و ۴۲°C ۳۰	۹۴°C ۳۰s و ۵۵°C ۳۰s و ۷۲°C ۳۰s (با تکرار ۲۵چرخه)	۷۲°C ۳۰s و ۲۰°C ۳۰s
کیتهای تشخیصی تکی برای ویروسهای WSSV و TSV	۹۴°C ۲ و ۴۲°C ۳۰	۹۴°C ۲۰s و ۶۲°C ۲۰s و ۷۲°C ۳۰s (با تکرار ۱۵چرخه)	۷۲°C ۳۰s و ۲۰°C ۳۰
کیت تشخیصی IHHNV	۹۴°C ۲۰°C و ۷۰°C ۲۰ (تکرار ۱۰ چرخه)	۹۴°C ۲۰s و ۵۶°C ۲۰s و ۷۲°C ۳۰s (با تکرار ۳۵ چرخه)	۷۲°C ۳۰s و ۲۰°C ۳۰
مرحله دوم PCR			
	زیرمرحله اول	زیرمرحله دوم	زیرمرحله سوم
WIT Multivir System	۹۴°C ۲۰s و ۶۰°C ۲۰s و ۷۲°C ۳۰ s (تکرار ۳۰ چرخه)	۷۲°C ۳۰s و ۲۰°C ۳۰	-
کیتهای تشخیصی تکی برای ویروسهای WSSV، IHHNV و TSV	۹۴°C ۲۰s و ۶۲°C ۲۰s و ۷۲°C ۳۰ s (تکرار ۳۰چرخه)	۷۲°C ۳۰s و ۲۰°C ۳۰	-

۵-۲- روش آسیب شناسی بافتی

جهت تائید نمونه هایی که با روشPCR ردیابی ویروس ها انجام گرفت از بافت آبشش و هپاتوپانکراس همان میگوجت انجام آزمایشات بافت شناسی نمونه برداری بعمل آمد. نمونه های بافت با وسایل استریل جداسازی و در محلول دیویدسون نگهداری شدند(تصویر۱۱). پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه های بافتی از محلول دیویدسون خارج و در الکل ۷۵ درجه نگهداری شدند. نمونه ها با دستگاه عمل آوری بافت (Tissue processor) آبگیری(تصویر۱۲) و سپس قالب گیری و بعد از آن توسط دستگاه برش بافت (Microtome) با ضخامت ۵ میکرون برش تهیه و بر روی لام فیکس گردیدند. لام ها با رنگ ائوزین- هماتوکسیلین رنگ آمیزی و مونت گردیدند.

تصویر۱۱- نمونه برداری جهت آسیب شناسی بافت میگو

تصویر۱۲- آماده سازی بافت با دستگاه Tissue processor

٦-۲- روش فاکتورهای فیزیکی- شیمیایی آب

نمونه برداری از ۶ استخر پرورشی بصورت دو هفته یکبار انجام گرفت. دمای آب وPH توسط دستگاهPH مترHacH در محل اندازه گیری شد. شوری به روش مور (Mohr) و فرمول کندسن (Rilly *etal*,1971)،Do توسط تثبیت نمونه اکسیژن در محل و تیتراسیون های یدومتری (روش و ینکلر)،BOD_5 بوسیله انکلوباسیون نمونه بمدت ۵ روز و سپس اندازه گیری اکسیژن باقیمانده به روش و نیکلر، آمونیاک به روش ایندوفنل با غلظت کم، یون نیتریت به کمک واکنش با سولفانیلیک اسید و دستگاه اسپکتروفتومتر، کدورت توسط دستگاه کدورت سنج و سختی کل توسط تیتراسیونهای کمپلکسومتری اندازه گیری شدند. همچنین برای اندازه گیری گازSH_2 ابتدا وجود یا عدم وجود این گاز توسط استات سرب تست گردید و در صورت وجود توسط تیتراسیون های یدومتری اندازه گیری گردیدند(تصاویر۱۳و۱۴). CO_2 در صورت وجود توسط NaoH،TSS توسط دستگاه اسپکتروفتومترHach و سایر فاکتورهای توسط روش های اسپکتوفتومتری بشرح ذیل اندازه گیری شدند(تصویر۱۵): PO_4تحت شرایط اسیدی توسط واکنش با آمونیوم هپتامولیبدات،NO_3 توسط احیا با کادمیم و سپس واکنش با سولفانیلیک اسید، نیتریت به کمک واکنش با سولفانیلیک اسید و تشکیل نمک حد واسط دی آزونیوم وسولفات توسط واکنش با باریم کلراید و تشکیل نمک نامحلول سولفات باریم اندازه گیری گردیدند. کلیه روش های آنالیز از کتاب standard Method استخراج شده اند (clesceri,1989).

تصویر۱۳- نمونه برداری آب استخرهای پرورشی

تصویر ۱۴- اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب استخرهای پرورشی

تصویر ۱۵- استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر برای اندازه گیری فاکتورهای شیمیایی آب

۳- نتایج

بطور کلی در طول دورهٔ پرورشی میگوی وانامی در سال ۱۳۸۶، از تعداد ۶ مزرعه، ۴۱ استخر بالغ بر ۳۴/۵ هکتار به زیر کشت رفت از آنجائیکه دو کانال آب رسان C4وC5 آبگیری و بر روی هر کانال ۳ مزرعه (جمعاً ۶ مزرعه) زیر کشت رفتند تحقیقات و نمونه برداری از ۱۰ ایستگاه (۲ ایستگاه در رود خانه بهمنشیر، ۲ ایستگاه در کانالهای C5 وC4 و ۶ استخر از ۶ مزرعه بصورت تصادفی انتخاب گردیدند) از تاریخ ۱۳۸۶/۲/۵ لغایت ۱۳۸۶/۸/۱۵ انجام گرفت بطور کلی ۶۲۰ مورد نمونه آب برای کشت باکتریایی بر روی محیط TSAوTCBS انجام گرفت. همچنین ۵۴۰ قطعه پست لارو تا میگوی بالغ پرورشی جهت انجام آزمایشات باکتری، قارچ و انگل مورد بررسی قرار گرفت و بیش از۲۸۰ نمونه میگوی وحشی (*Exopalaemon styliferus, Metapenaeus affinis*)، خرچنگ گرد خانواده Grapsidae (۲ جنس .Grapsus sp و .sesarma sp) و میگوهای وانامی بیش از ۳۸۰ بار PCR با استفاده از ۳ کیت دکتر قرشی، Iq 2000 wssv و WIT Multivir (TSV-IHHNV-WSSV) مورد آزمایش قرار گرفت.

برای اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب، ۱۲ فاکتور دما، PH، NH_3، SH_2، CO_2، DO، BOD، TSS ، کدورت، شوری، قلیائیت و سختی کل بیش از ۳۴۰ بار اندازه گیری گردید.

برای صحت نتایج PCR و شناسایی ویروسها ۱۲۰ قطعه میگو و از هر قطعه ۲ بافت آبشش و هپاتوپانکراس جهت ردیابی ویروس های احتمالی با دستگاه میکروتوم برش ۵ میکرون و از هر بافتی ۲ لام و بطور کلی ۲۸۰ لام هیستوپاتولوژی تهیه گردید.

نتایج بدست آمده هر قسمت بطور جداگانه بدین شرح است:

۳-۱۰- نتایج باکتری شناسی، قارچ شناسی و انگل شناسی

در این مطالعه در هنگامی که میگوها بسیار ریز بودند (زیر ۲ گرم) از همو ژن میگوها باکتریهای *Vibrio alginolyticus*، *V.nereis*، *V.flavialis*، *V.splendidus*، *V.mimicus*، *V.proteolyticus*و *lesiomonas shigelloides* و قارچ های آسپرژیلوس (بخصوص *Aspergilus niger*) و (تریکوفیتون .*Trichophyton* sp) شناسایی گردید. همچنین تک یاخته ورتیسلا (.*vorticella* sp) بخصوص در پای شنا شناسایی گردید. باکتری ویبریو آلجینو لتیکوس (*V.alginolyticus*) و قارچ آسپرژیلوس نایجر (*ASP.niger*) بیشترین فراوانی را داشتند(تصاویر۱۶و۱۷). در میگوهای بالای ۲ گرم که

امکان جداسازی آبشش و هپاتوپانکراس وجود داشت این بافت ها بطور مجزا مورد آزمایش قرار گرفت که ۵ نوع ویبریو(*V.proteolyticus*، *V.mimicus*، *V.alginolyticus*، *V.parahaemolyticus*، *V.campbelli*) و باکتری پلزیوموناس شیگلوئیدس (*plesiomonas shigelloides*) از این دو بافت جداسازی گردید(تصاویر۱۸و۱۹). همچنین از پاهای شنا و آبشش دو تک یاخته ورتیسلا (*vorticella* sp.) و زئو تامنیوم (*zoothamnium* sp.) جدا سازی گردید. (جدول ۵ و ۶)

جدول ۵- باکتری، قارچ و انگل جدا شده از اندامهای مختلف میگو

اندام	باکتری	قارچ	انگل
میگوی هموژن	*Vibrio alginolyticus* *V.nereis* *V.flavialis* *V.splendidus* *V.mimcus* *V.proteolyticus* *Plesiomonas shigelloides*	*Aspergilus niger* *Trichophyton sp.*	*Vorticella sp.* (پای شنا)
آبشش	*V.proteolyticus* *V.campbelli* *Plesiomonas shigelloides* *V.alginolytucus* *V.anguillarum* *V.parahaemolyticus*	*ASP.fumigatus* *Chlados poridium* *ASP.flavus* *Penicillium sp.*	*Vorticella sp.* (پای شنا) *Zoothamnium sp.*
هپاتو پانکراس	*V.proteolyticus* *V.campbelli* *Plesiomonas shigelloides* *V.alginolyticus* *V.anguillarum* *V.parahaemolyticus* *V.mimicus*	*Chladosporidium* sp.	-

جدول ٦- مقایسه فراوانی (درصد) گونه های باکتریایی جداشده از اندامهای مختلف میگو

محل برداشت نمونه / گونه باکتری	میگوی هموژن	آبشش	هپاتوپانکراس	درصد کل
V.alginolyticus	۳۷/۵	۲۲/۷۲	۲۶/۹۲	۲۸/۱۲
V.proteolyticus	۶/۲۵	۳۶/۳۶	۳۴/۶۱	۲۸/۱۲
P.shigelloides	۱۲/۵	۱۳/۶۳	۳/۸۴	۹/۳۷
V.parahaemolyticus	-	۱۸/۱۸	۱۵/۳۸	۱۲/۵
V.nereis	۱۲/۵	-	-	۳/۱۲
V.mimicus	۶/۲۵	-	۳/۸۴	۳/۱۲
V.campbelli	-	۴/۵۴	۳/۸۴	۳/۱۲
V.anguillarum	-	۴/۵۴	۱۱/۵۳	۶/۲۵
V.fluvialis	۶/۲۵	-	-	۱/۵
V.splendidus	۱۸/۷۵	-	-	۴/۶۸

نتایج شمارش کل ویبریوها (TVC) در میلی لیتر آب استخرهای پرورشی از$۱/۹۶\times۱۰^{۳}$-$۰/۰۱\times۱۰^{۳}$ و تعداد کل باکتری در میلی لیتر آب استخرهای پرورشی از $\times۱۰^{۳}$ ۱۴/۲۵-$۰/۲۱\times۱۰^{۳}$و در رودخانه بهمنشیر در حالت مد تعداد کل ویبریوهای آب از $۰/۲۷\times۱۰^{۳}$-۰ و تعداد کل باکتری از$\times۱۰^{۳}$ ۳/۵-$۰/۷۶\times۱۰^{۳}$ متغیر بوده است. در رودخانه بهمنشیر در حالت جزر تعداد کل ویبریوهای آب از $۰/۵۲۵\times۱۰^{۳}$-۰و تعداد کل باکتری از $۱۵/۳\times۱۰^{۳}$-$۱/۴۲\times۱۰^{۳}$ متغیر بوده است و در کانال C4 تعداد کل ویبریوها در آب از $۱/۹۶\times۱۰^{۳}$-۰ و تعداد کل باکتری از $۶۴/۵۵\times۱۰^{۳}$-$۰/۳۷\times۱۰^{۳}$ بوده است و در کانال C5 تعداد کل ویبریو از ۱×۱۰^{۳}-۰ و تعداد کل باکتری از $۲/۳۴\times۱۰^{۳}$-$۰/۲۵\times۱۰^{۳}$ در میلی لیتر باکتری شمارش شده است. نتایج شمارش کلی ویبریوها در میگوی وانامی (TVC) از $۳/۲۵\times۱۰^{۳}$-$۰/۵\times۱۰^{۳}$ متغیر بوده است.

تعداد کلیفرم (Total coliform) در رودخانه بهمنشیر از ۴ کلنی در ۱۰۰ میلی لیتر (۴c/۱۰۰ml) الی ۱۱۰۰ کلنی در ۱۰۰ میلی لیتر (>۱۱۰۰c/۱۰۰ml) و در کانال C4 از (۳c/۱۰۰ml-۳۴۰c/۱۰۰ml) و در کانال C5 از ۳c/۱۰۰ml-۳۴۰c/۱۰۰ml متغیر بوده است (جداول۷، ۸ و ۹)(نمودارهای۳۴-۲۵).

جدول ۷- شمارش کلی باکتری و ویبریو در ایستگاه ها

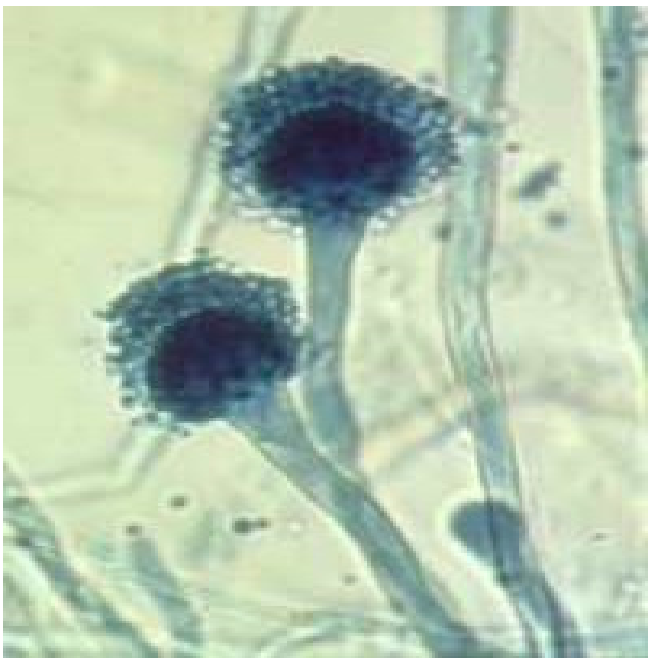
ایستگاه	شمارش کلی باکتری (CFU/ml)			شمارش کلی ویبریو(CFU/ml)		
	می نیمم	ماکزیمم	میانگین	می نیمم	ماکزیمم	میانگین
بهمنشیر	$۰/۷۶ \times ۱۰^{۳}$	$۱۵/۳ \times ۱۰^{۳}$	$۳/۶۱ \times ۱۰^{۳}$	۰	۲×۱۰^{۳}	$۰/۱۶ \times ۱۰^{۳}$
کانال C4	$۰/۳۷ \times ۱۰^{۳}$	$۱۳/۱ \times ۱۰^{۳}$	$۳/۷۸ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۱/۹۶ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۲۳ \times ۱۰^{۳}$
کانال C5	$۰/۲۵ \times ۱۰^{۳}$	$۸/۰۵ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۷۶ \times ۱۰^{۳}$	۰	۱×۱۰^{۳}	$۰/۲۱ \times ۱۰^{۳}$
استخر یونسی(C4)	$۰/۴۱ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۶۵ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۶۱ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۰۳ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۶۳ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۸۶ \times ۱۰^{۳}$
استخر موسوی(C4)	$۰/۲۱ \times ۱۰^{۳}$	$۳/۸ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۲۲ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۰۲ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۱۳ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۵۱ \times ۱۰^{۳}$
استخر سلمان زاده(C4)	$۰/۵۵ \times ۱۰^{۳}$	۳×۱۰^{۳}	$۱/۳۰ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۰۱ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۳۵ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۶۱ \times ۱۰^{۳}$
استخر اشرف پور(C5)	$۰/۳۴ \times ۱۰^{۳}$	$۱۰/۴ \times ۱۰^{۳}$	$۳/۷۳ \times ۱۰^{۳}$	۰	$۳/۳ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۹۰ \times ۱۰^{۳}$
استخر خیری(C5)	$۰/۵۴ \times ۱۰^{۳}$	۵×۱۰^{۳}	$۱/۹۹ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۱۵ \times ۱۰^{۳}$	$۱/۱۵ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۴۶ \times ۱۰^{۳}$
استخر محمدی(C5)	$۰/۹۹ \times ۱۰^{۳}$	$۱۴/۲۵ \times ۱۰^{۳}$	$۶/۹۵۶ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۰۴ \times ۱۰^{۳}$	$۲/۲۱ \times ۱۰^{۳}$	$۰/۹۸ \times ۱۰^{۳}$

جدول ۸- تعداد کل ویبریو در اندام های مختلف

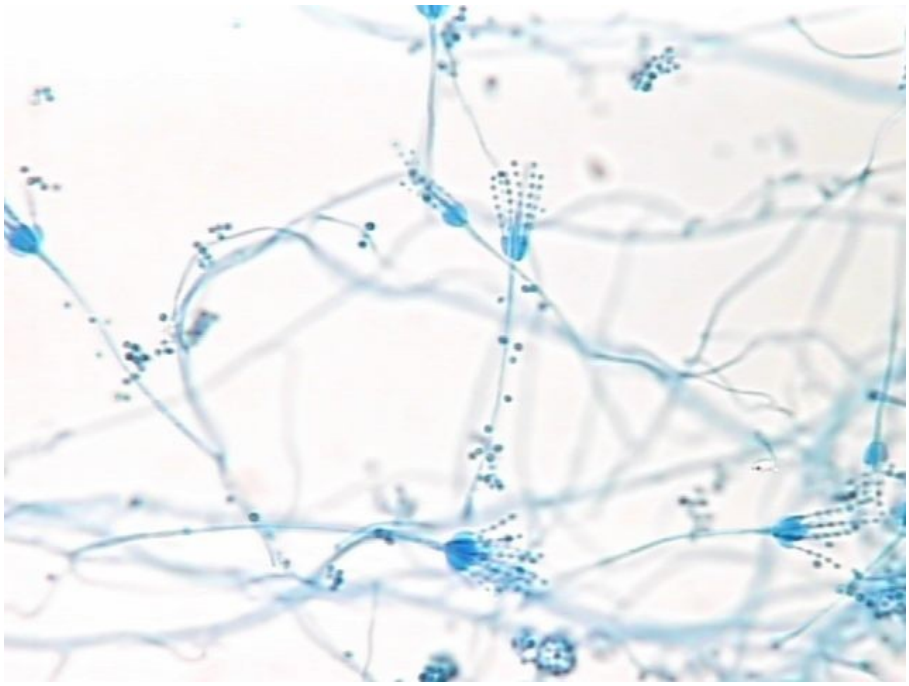
اندام	تعداد کل ویریو (CFU/ml)		
	می نیمم	ماکزیمم	میانگین
میگوی هموژن	$۰/۰۰۵ \times ۱۰^{۵}$	$۵/۶۲ \times ۱۰^{۵}$	$۰/۷۵۷ \times ۱۰^{۵}$
هپاتوپانکراس	$۰/۰۳ \times ۱۰^{۵}$	$۴/۹ \times ۱۰^{۵}$	$۱/۰۶ \times ۱۰^{۵}$
آبشش	$۰/۰۰۱ \times ۱۰^{۵}$	$۰/۹۲ \times ۱۰^{۵}$	$۰/۳۳ \times ۱۰^{۵}$

جدول ۹- تعداد کلی فرم (CFU/۱۰۰ml) در ایستگاه

ایستگاه	تعداد کلی فرم (CFU/۱۰۰ml)	
	می نیمم	ماکزیمم
بهمنشیر	۴	۱۱۰۰
کانال C4	۳	۳۴۰
کانال C5	<۳	۳۴۰
استخر یونسی(C4)	۴	۱۵۰
استخر موسوی(C4)	۳	۲۲
استخر سلمان زاده(C4)	۳	۱۵۰
استخر اشرف پور(C5)	۳	۴۶۰
استخر خیری(C5)	۳	۳۵
استخر محمدی(C5)	۳	۳۴۰

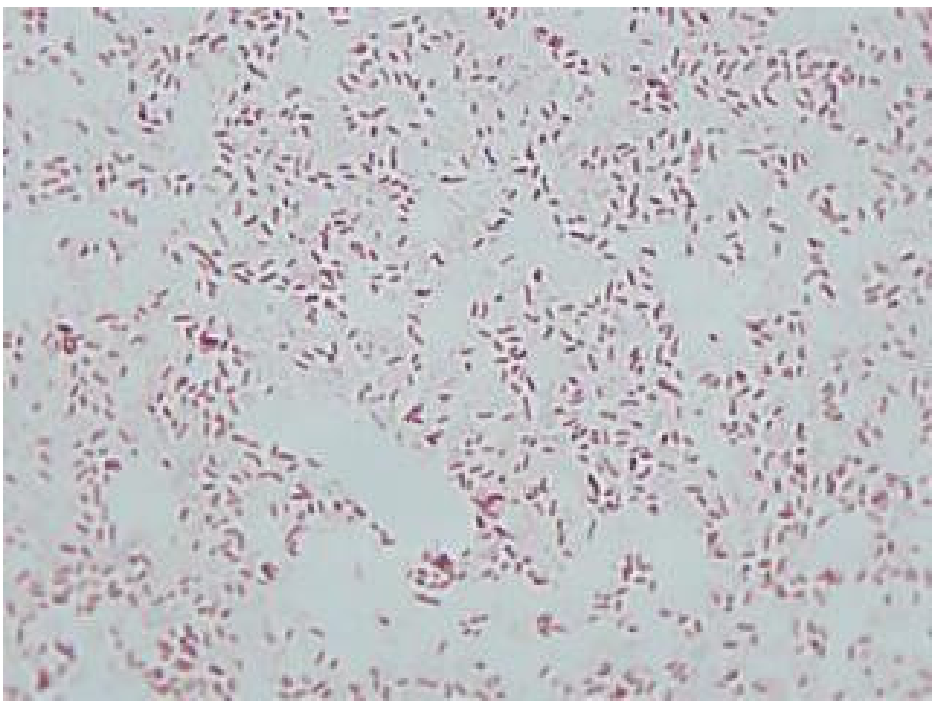


تصویر۱۶- قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس از آبشش میگوی وانامی ۴۰۰×



تصویر۱۷- قارچ جنس پنی سیلیوم از آبشش میگوی وانامی ۴۰۰×

تصویر۱۸-انگل تک یاخته ورتیسلا از پای شنا میگوی وانامی ٤٠٠×

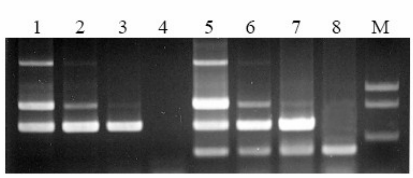


تصویر۱۹- باکتری ویبریو آلجینولیتکوس از هپاتوپانکراس میگوی وانامی ٤٠٠×

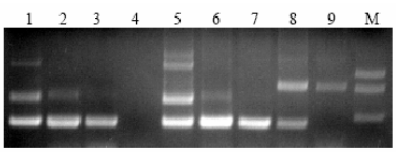
۲-۳- بررسی مولکولی ویروس ها

۱۳۷نمونه میگو با سه روش مختلف (سه نوع کیت مؤسسه، چندویروسی و تک ویروسی) PCR شد. ویروسی لکه سفید (WSSV) در خرچنگ جنس Sesarma در رودخانه بهمنشیر چند بار شناسایی گردید. ویروس لکه سفید هم با روش کیت مؤسسه و هم با روش کیت IQ2000 wssv بر روی ژل اگارز شناسایی گردید. با استفاده از روش کیت Multivir-WIT از میگوهای وانامی که در طول دوره پرورش نمونه برداری به عمل آمد ویروس WSSV، IHHNVو TSV (توراسندرم) شناسایی گردید. برای اطمینان از نتایج بدست آمده همان میگوها با روش کیت مؤسسه، کیت IQ2000 wssv و روش بافت شناسی عملیات آزمایشگاهی صورت گرفت که وجود TSV، WSSV، IHHNV،MBV وHPV محرز گردید. البته با توجه به اینکه کیت شناسایی مونودون باکلوویروس (MBV) وHPV در پژوهشکده موجود نبود با روش بافت شناسی این ویروس ها مشاهده گردید. برای اطمینان از نتایج کیتWIT از کنترل مثبت و کنترل منفی برای صحت جواب ها استفاده گردید(جدول ۱۰) در کیت های تشخیصی تکی برای هر کدام از ویروس های TSV، WSSV و IHHNV روش کار برای استخراج نتایج به شرح ذیل بوده است:

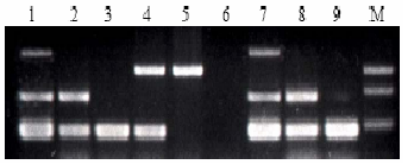
در صورتی که تنها باند ۸۴۸ bp (برای TSV ۶۸۰bp و ۲۴۳ bp برای IHHNV) ظاهر شده باشد بیانگر منفی بودن آن نمونه است زیرا این باند در واقع حاصل تکثیر شدن محدوده حاوی ژن بیماری مورد نظر می باشد یا همان باندی که به باند میگو معروف می باشد (House keeping gene). برای عامل بیماریزای WSSV در صورتی باند bp ۲۹۶ همراه یا بدون باند bp ۵۵۰ ظاهر شود نشانه مثبت بودن نمونه برای این بیماری است. برای بیماری TSV، داشتن باند در bp ۲۸۴ همراه یا بدون bp ۴۷۶ بیانگر مثبت بودن نمونه برا ی بیماری TSV می باشد. همچنین در نتایج حاصل از بررسی بیماری IHHNV، وجود باند ۴۳۸bp همراه یا بدون باند ۶۴۴bp گویای مثبت بودن نمونه برای این بیماری می باشد (تصویر۲۷-۲۰)



ردیف۱: استاندارد مثبت IHHNV با غلظت ۲۰۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۲: استاندارد مثبت IHHNV با غلظت ۲۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۳: استاندراد مثبت IHHNV با غلظت ۲۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ٤: شاهد منفی (Yeast tRNA یا آب دوبار تقطیر)
ردیف ٥: نمونه دارای آلودگی شدید IHHNV
ردیف ٦: نمونه دارای آلودگی میانه IHHNV
ردیف ۷: نمونه دارای آلودگی ضعیف IHHNV
ردیف ۸: نمونه منفی IHHNV
ردیف M: نشانگر وزنی مولکولی، ۸٤۸bp، ٦۳۰bp، ۳۳۳bp



ردیف ۱: استاندارد مثبت TSV با غلظت ۲۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۲: استانداراد مثبت TSV با غلظت ۲۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۳: استاندارد مثبت TSV با غلظت ۲۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ٤: شاهد منفی (Yeast tRNA یا آب دوبار تقطیر)
ردیف ٥: نمونه دارای آلودگی شدید TSV
ردیف ٦: نمونه دارای آلودگی میانه TSV
ردیف ۷: نمونه دارای آلودگی ضعیف TSV
ردیف ۸: نمونه دارای آلودگی بسیار ضعیف TSV
ردیف۹: نمونه منفی TSV
ردیف M: نشانگر وزنی مولکولی، ۸٤۸bp، ٦۳۰bp، ۳۳۳bp

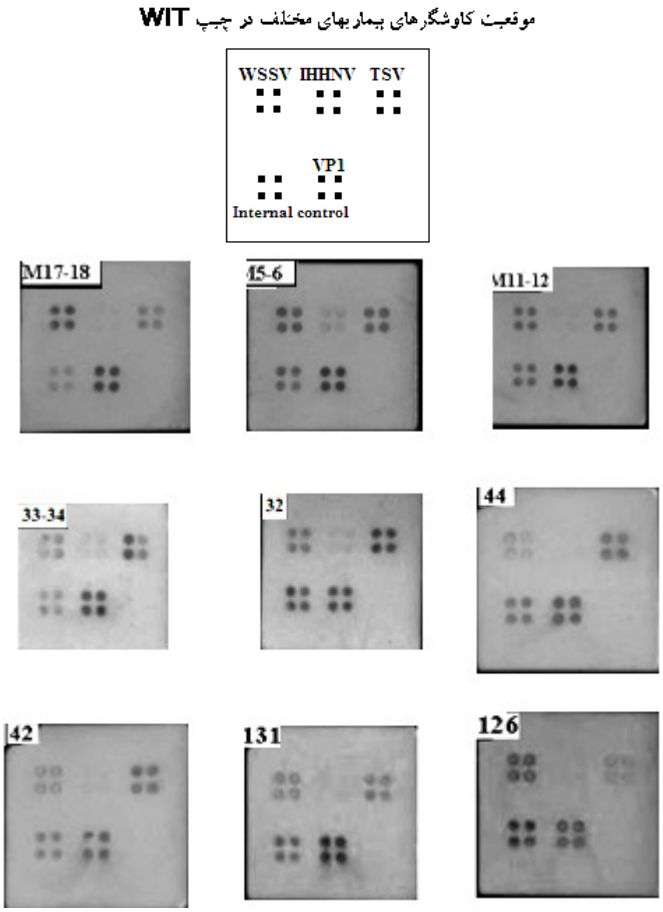


ردیف۱: نمونه دارای آلودگی شدید WSSV
ردیف۲:نمونه دارای آلودگی میانه WSSV
ردیف۳: نمونه دارای آلودگی ضعیف WSSV
ردیف٤: نمونه دارای آلودگی بسیار ضعیف WSSV
ردیف٥: نمونه فاقد آلودگی WSSV
ردیف٦: نمونه شاهد منفی (Yeast tRNA یا آب دوبار تقطیر)
ردیف۷: استاندارد مثبت WSSV با غلظت ۲۰۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف۸: استاندارد مثبت WSSV با غلظت ۲۰۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف ۹: استاندارد مثبت WSSV با غلظت ۲۰ رونوشت در هر واکنش
ردیف M: نشانگر وزنی مولکولی، ۸٤۸bp، ٦۳۰bp، ۳۳۳bp

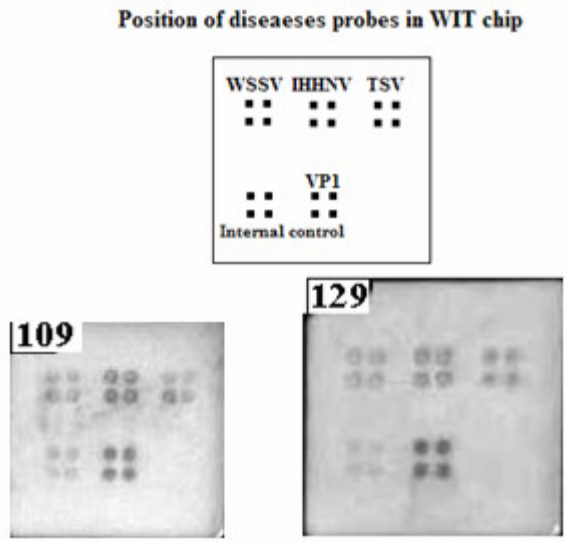
تصویر ۲۰ – راهنمای تفسیر نتایج حاصل از کیتهای تشخیصی تک ویروسی برای عوامل بیماریزای TSV، WSSV و IHHNV

جدول ۱۰- نتایج PCR با استفاده از کیت Multivir

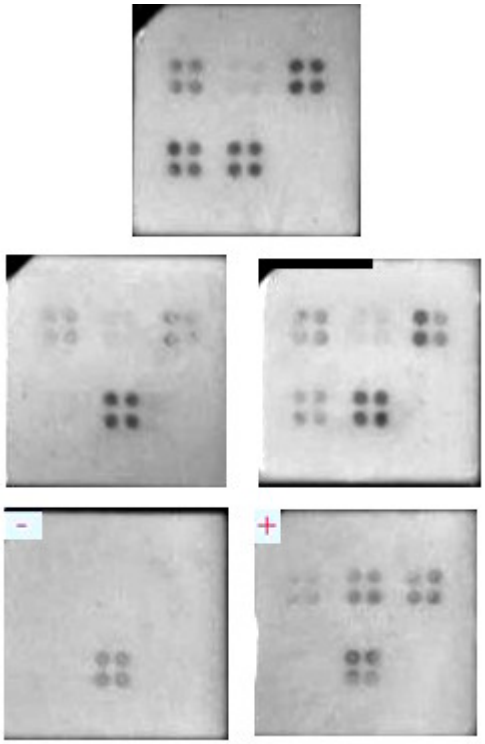
Result			No.	Result			No.
WSSV	IHHNV	TSV		WSSV	IHHNV	TSV	
+		+	108	+		+	32
+	+	+	109	+		+	33-34
+		+	110	+		+	35
+		-	111	+		+	42
+		+	112	+		+	43
+		+	113	+		+	44
+		+	114	+		-	49
-		+	115	+		+	50
-		+	116	+		+	51
+		+	117	-		+	52
+		+	118	-		+	53
+		+	119	+		+	58
+		+	120	-	+	+	59
+		+	121	-	-	+	60
+	+	+	122	+	-	+	61
+		+	123	+		+	62
+		+	124	*	*	*	63
+		+	125	-		+	64
-		+	126	-		+	65
				*	*	*	66
				-	+	+	67
				-	-	+	72
				+		+	73
				+	+	+	74
				+	+	+	75
				+		+	90
				+		+	91
				-		+	92
				-		+	93
				-		+	94
				-		+	95
				+		+	100
				+	+	+	101
				+	+	+	102
				+		+	103
				+	+		104
				+		+	105
				+		+	106
				+		+	107



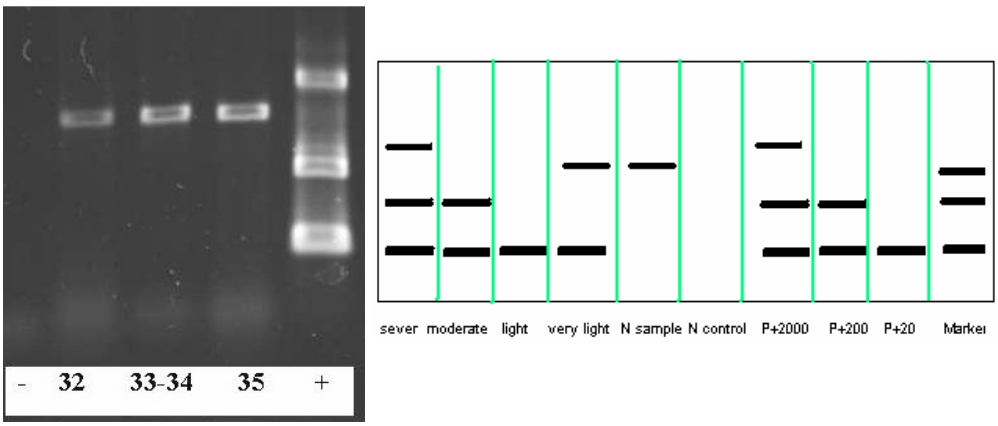
تصویر ۲۱- نمونه های مورد آزمایش آلوده به دو نوع ویروس WSSV و TSV می باشد



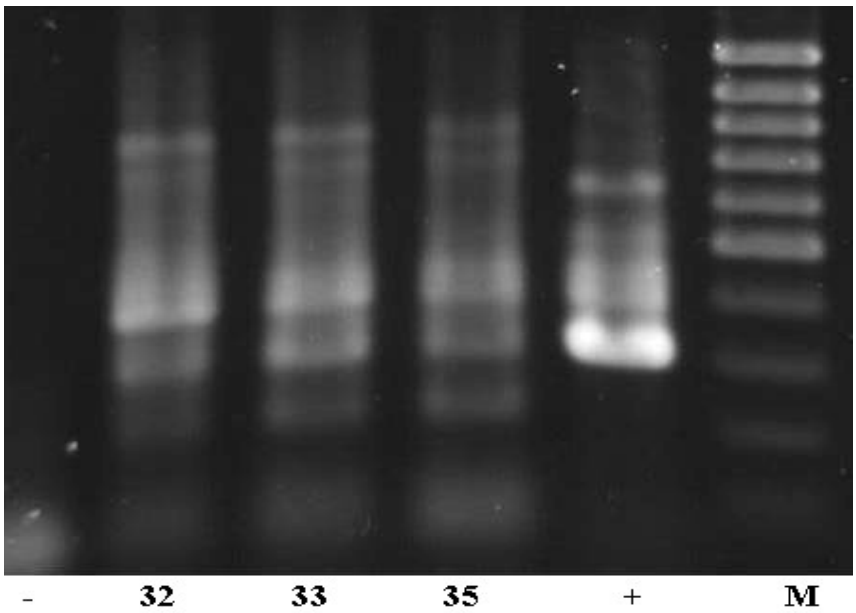
تصویر ۲۲- نمونه های مورد آزمایش آلوده به سه نوع ویروس WSSV وIHHNV و TSV می باشد.



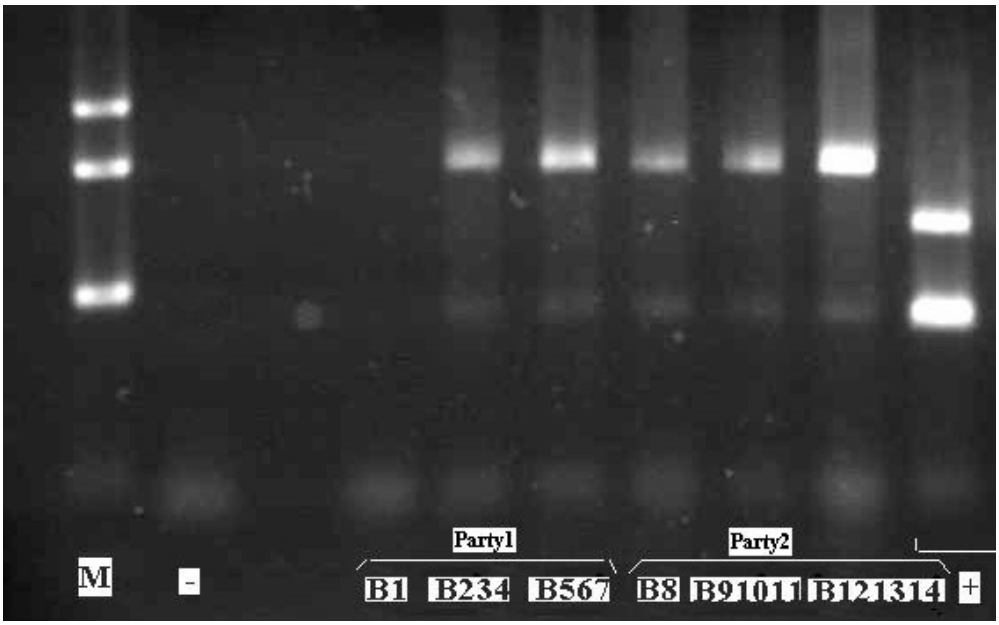
تصویر۲۳- پست لاروهای وارد شده که به دو نوع ویروس WSSV و TSV آلوده بودند



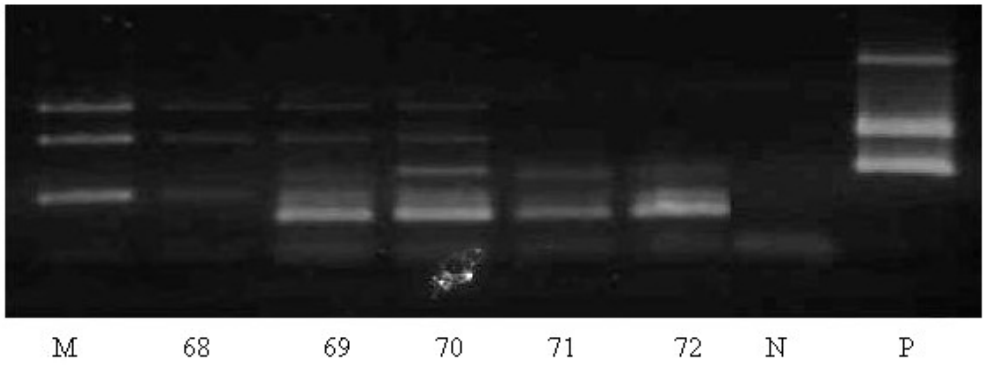
تصویر۲٤- راهنمای کیت IQ2000-WSSV و نمنونه های کار شده با این کیت



تصویر۲۵- نمونه های مورد آزمایش با استفاده از کیت مؤسسه



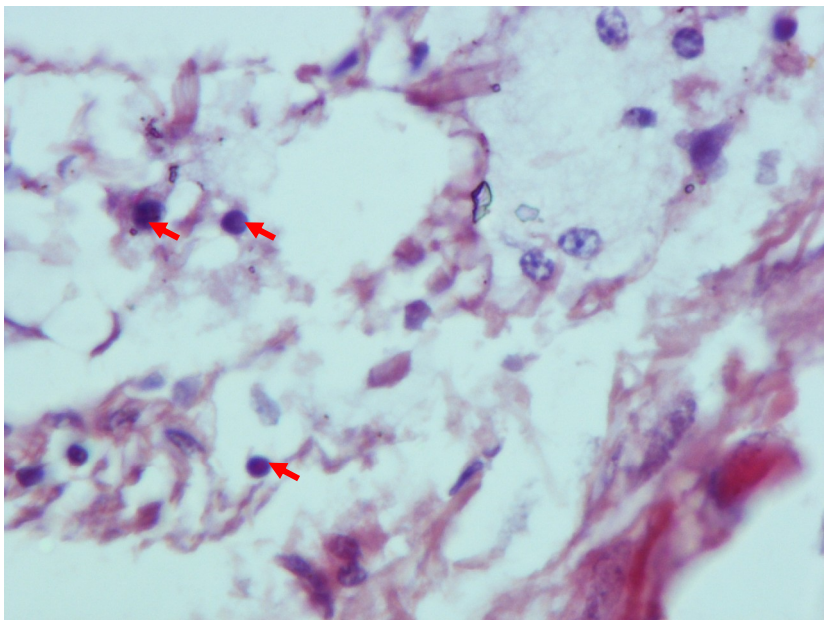
تصویر۲۶- پست لاروهای وارداتی آلوده به ویروس TSV.



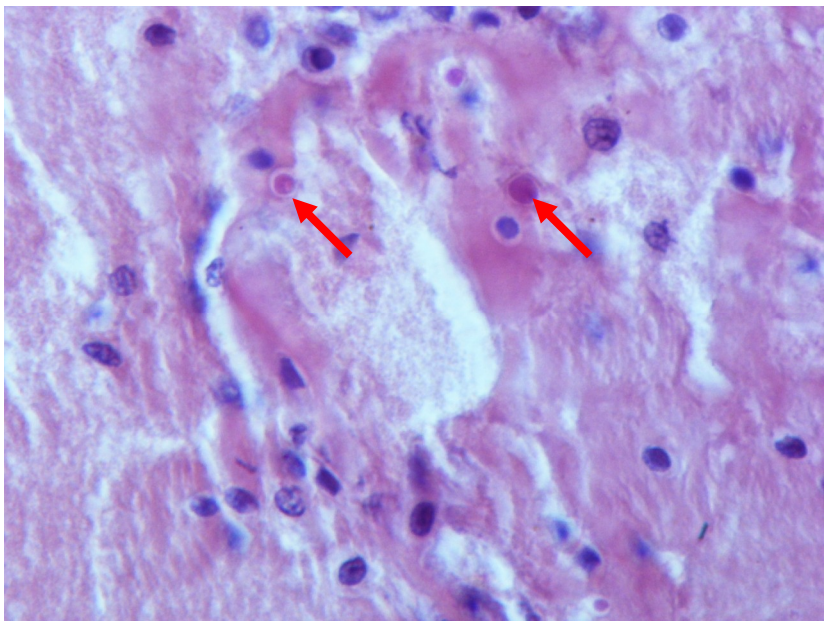
تصویر۲۷ – نمونه های آلوده به IHHNV تشخیص داده شده با کیت تکی IHHNV

۳-۳-آسیب شناسی بافتی

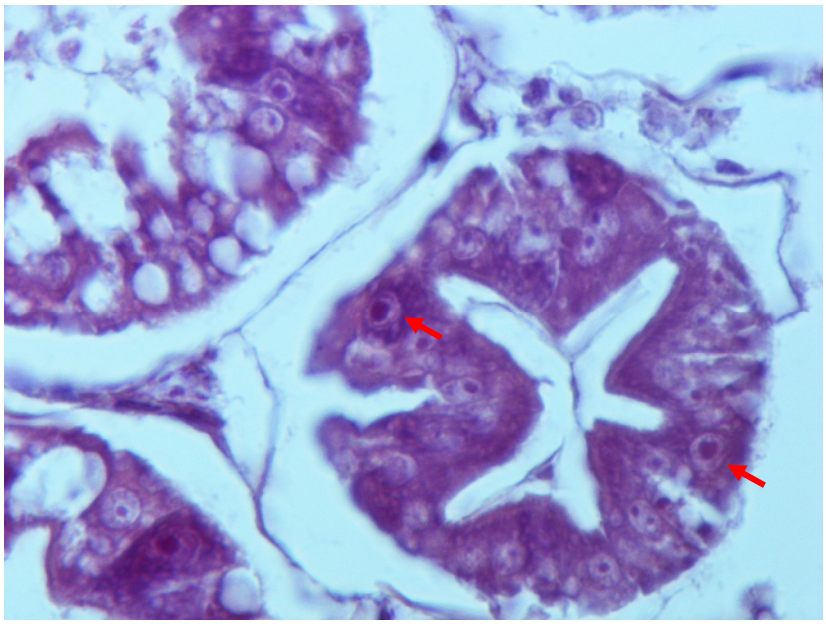
با توجه به مشاهده ویروس های WSSV،TSV و احتمالاً IHHNV در روش استفاده از کیت های خریداری شده و برای صحت جواب های بدست آمده ۱۱۲ بافت (همان بافت هایی که جهت PCR استفاده شده بودند) نمونه برداری و از آنها لام هیستوپاتولوژی تهیه گردید نتایج بدست آمده از بافت های آبششی و هپاتوپانکرس وجود ویروس ها TSV،MBV و HPV محرز گردید(تصاویر۳۲-۲۸).



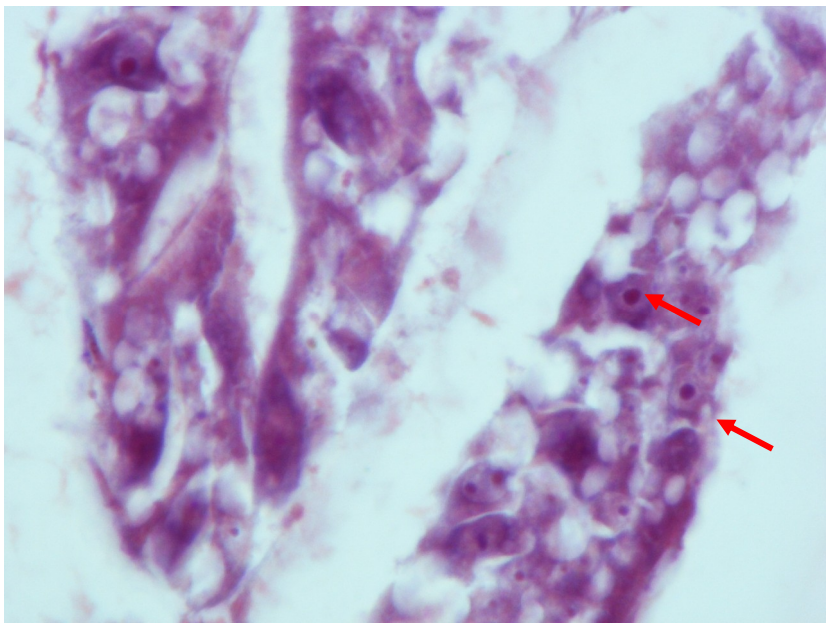
تصویر۲۸- بافت هماتوپوئیتیک آلوده به TSV(× ۱۰۰)



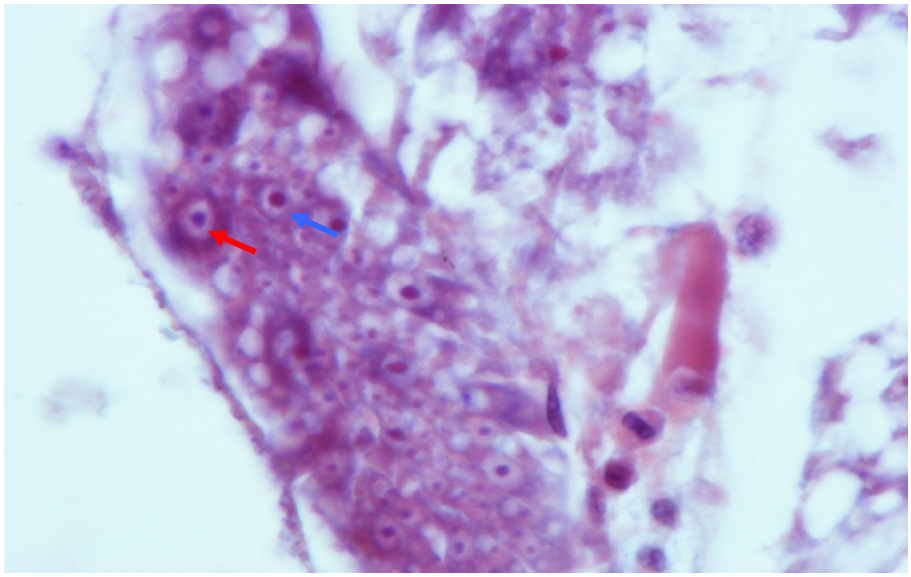
تصویر۲۹- بافت قلب آلوده به ویروس TSV (۱۰۰×)



تصویر ۳۰- بافت هپاتوپانکراس آلوده به ویروس HPV (۱۰۰×)



تصویر ۳۱- بافت هپاتوپانکراس آلوده به ویروس HPV (× ۱۰۰)



تصویر ۳۲- بافت هپاتوپانکراس آلوده به دو ویروس HPV
(فلش قرمز) و MBV **(فلش آبی)** (× ۱۰۰)

نتایج فاکتورهای فیزیکی – شیمیایی آب:

نتایج حاصل از آنالیز نمونه ها (حداکثر- حداقل و میانگین) در طول مدت نمونه برداری در ۶ استخر در جداول ۱۱-۱۶ و نمودارهای ۲۴-۱ خلاصه گردیده است.

دامنه تغییرات اکسیژن در استخرها برابر ۱۱/۴۳-۵/۲۳ میلی گرم بر لیتر ، مقادیر BOD_5 در استخر ها برابر ۱۰/۳۹-۳/۸۴ میلی گرم بر لیتر بوده است ، مقادیر فسفات در استخرهای مورد مطالعه برابر ۱/۵۵mg/l-۰/۱۵ مشاهده شده است(نمودار۲۷ و ۳۹). دامنه نیترات در استخرها از حداقل ۲/۲ mg/l تا حداکثر mg/l ۸/۴ ، دامنه نیتریت در استخرها از حداقل ۰ تا حداکثر ۰/۰۲۵ mg/l ، دامنه تغییرات آمونیاک برابر mg/l ۰/۱۴۹-۰ برابر NTU ۴۷-۱۱ ثبت شده است .

جدول ۱۱- مقادیر پارامترهای اندازه گیری شده درطول ماههای مختلف نمونه برداری دراستخرسلمان زاده (مجاور کانال C4) در سال ۱۳۸۶

پارامتر	واحد	سلمان زاده			میانگین	انحراف معیار
		مرداد	شهریور	مهر		
DO	**ppm**	۹/۶	۸/۷۳	۷/۵	۸/۶	۱/۰۴
BOD_5	ppm	۵/۶۳	۵/۵۷	۶/۷۸	۵/۹۹	۰/۶۸
Ph		۸/۰۴	۸/۳	۸/۴	۸/۲۴	۰/۱۸
PO_4	ppm	۱/۵۵	۱/۱	۰/۱۸۵	۰/۹۴	۰/۶۹
NO_3	ppm	۴/۸۶	۴/۸۶	۴/۱۹	۴/۶۳	۰/۳۸
NO_2	ppm	۰/۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱۳	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵
NH_3	ppm	۰	۰/۰۱۶	۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹
T.S.S	ppm	۴۱	۲۴	۳۲	۳۲/۳۳	۸/۵۰۴
کدورت	NTU	۳۷	۱۶	۲۷	۲۶/۶۶	۱۰/۵
شوری	ppt	۲۴/۸۹	۱۷/۰۵	۱۵/۷۲	۱۹/۲۲	۴/۹۵
سختی کل	ppm	۴۴۱۰	۳۲۸۵	۳۲۸۵	۳۶۶۰	۶۴۹/۵۱
قلیائیت تام	Meq/l	۲/۶	۲/۸۷	۲/۷۹	۲/۷۵	۰/۱۳۸

جدول ۱۲- مقادیر پارامترهای اندازه گیری شده درطول ماههای مختلف نمونه برداری دراستخرموسوی (مجاور کانال C4)در سال ۱۳۸٦

پارامتر	واحد	موسوی			میانگین	انحراف معیار
		مرداد	شهریور	مهر		
DO	ppm	۱۱/۲۹	۷/۴۷	۶/۶۶	۸/۴۷	۲/۴۷
BOD_5	ppm	۸/۹۷	۴/۳۵	۶/۳۱	۶/۵۴	۲/۳۱
pH		۸/۳	۸/۰۷	۸/۱	۸/۱۶	۰/۱۲۲
PO_4	ppm	۱/۲۵	۰/۷۷	۰/۱۶	۰/۷۲	۰/۵۴۶
NO_3	ppm	۴/۸۶	۵/۳۱	۵/۹۶	۵/۳۷	۰/۵۵۲
NO_2	ppm	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۴۷
NH_3	ppm	۰/۰۰۸	۰	۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴۶
T.S.S	ppm	۲۳	۲۹	۱۱/۵	۲۱/۱۶	۸/۸۹
کدورت	NTU	۲۳	۱۶	۱۱	۱۶/۶۶	۶/۰۲
شوری	ppt	۳۲/۴۵	۲۸/۸۲	۲۸/۳۷	۲۹/۸۸	۲/۲۳۷
سختی کل	ppm	۵۵۸۰	۵۱۳۰	۴۹۳۰	۵۲۱۳/۳۳	۳۳۲/۹۱
قلیائیت تام	Meq/l	۲/۳۸	۲/۸۶	۳/۱۱	۲/۷۸	۰/۳۷

جدول ۱۳- مقادیر پارامترهای اندازه گیری شده درطول ماههای مختلف نمونه برداری دراستخریونسی (مجاور کانال C4) در سال ۱۳۸٦

پارامتر	واحد	یونسی			میانگین	انحراف معیار
		مرداد	شهریور	مهر		
DO	ppm	۹/۲۷	۷/۸	۵/۹۱	۷/۶۶	۱/۶۸
BOD_5	ppm	۳/۸۴	۵/۶	۴/۴	۴/۶۲	۰/۸۹
pH		۸/۰۸	۸/۰۹	۸/۲۶	۸/۱۴	۰/۱۰۲
PO_4	ppm	۱/۲۵	۰/۷۷	۰/۱۴۵	۰/۷۲	۰/۵۵
NO_3	ppm	۲/۲۱	۸/۴	۵/۰۸	۵/۲۳	۳/۰۹
NO_2	ppm	۰/۱۴	۰/۰۰۲	۰/۰۱۳	۰/۰۵۱	۰/۰۷
NH_3	ppm	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹	۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴
T.S.S	ppm	۱۴	۴۵	۲۵/۵	۲۸/۱۶	۱۵/۶۷
کدورت	NTU	۱۳	۳۱	۳۰/۵	۲۴/۸۳	۱۰/۲۵
شوری	ppt	۲۶/۵	۲۵/۹	۲۵/۶	۲۶/۰۲	۰/۴۱
سختی کل	ppm	۴۷۲۰	۴۸۳۵	۴۶۰۰	۴۷۱۸/۳۳	۱۱۷/۵
قلیائیت تام	Meq/l	۲/۱۸	۲/۴۹	۲/۸۴	۲/۵	۰/۳۳

جدول ١٤- مقادیر پارامترهای اندازه گیری شده درطول ماههای مختلف نمونه برداری دراستخر اشرف پور (مجاور کانال C5) در سال ١٣٨٦

پارامتر	واحد	اشرف پور			میانگین	انحراف معیار
		مرداد	شهریور	مهر		
DO	ppm	۹/۸۹	۷/۹۵	۵/۲۲	۷/۶۹	۲/۳۴
BOD_5	ppm	۹/۲	۷/۸۵	۵/۱۵	۷/۴	۲/۰۶
pH		۸/۰۳	۷/۸۱	۷/۵۸	۷/۸	۰/۲۲
PO_4	ppm	۰/۶	۱/۳۲	۰/۳۵	۰/۷۵	۰/۵۰۱
NO_3	ppm	۵/۵۸	۶/۸۴	۵/۵۱	۵/۹۷	۰/۷۴
NO_2	ppm	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱۵	۰/۰۰۲
NH_3	ppm	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۱۴۹	۰/۰۵۵	۰/۰۸۱
T.S.S	ppm	۳۳/۷	۶۵	۲۳/۵	۴۰/۷۲	۲۱/۶۳
کدورت	NTU	۲۳/۳	۴۷	۱۶	۲۸/۷۷	۱۶/۲۰۱
شوری	ppt	۲۷/۶	۲۵/۰۴	۲۴/۷۲	۲۵/۷۹	۱/۵۹
سختی کل	ppm	۴۹۸۳	۴۵۴۵	۴۵۶۵	۴۶۹۷/۷۷	۲۴۷/۵۰
قلیائیت تام	Meq/l	۲/۶۵	۳/۱	۳/۳۲	۳/۰۲۴	۰/۳۳۹

جدول ١٥- مقادیر پارامترهای اندازه گیری شده درطول ماههای مختلف نمونه برداری دراستخر خیری (مجاور کانال C5) در سال ١٣٨٦

پارامتر	واحد	خیری			میانگین	انحراف معیار
		مرداد	شهریور	مهر		
DO	ppm	۱۱/۴	۷/۹۳	۶/۵۷	۸/۶۴	۲/۵
BOD_5	ppm	۱۰/۴	۷/۸	۶/۵۲	۸/۲۳	۱/۹۶
pH		۸/۲۱	۷/۹۶	۸/۰۸	۸/۰۸	۰/۱۲
PO_4	ppm	۰/۶۸	۱/۴۳	۰/۲۳	۰/۷۸	۰/۶۰۴
NO_3	ppm	۴/۸۶	۷/۲۸	۵/۹۸	۶/۰۴۲	۱/۲۱
NO_2	ppm	۰/۰۲	۰/۰۱۳	۰/۰۲۳	۰/۰۱۷	۰/۰۰۵
NH_3	ppm	۰/۰۲	۰	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹۶	۰/۰۱۱
T.S.S	ppm	۱۶/۷	۲۷/۵	۴۰	۲۸/۰۵	۱۱/۶۷
کدورت	NTU	۲۱	۲۶	۳۲/۵	۲۶/۵	۵/۷۶
شوری	ppt	۳۰/۳	۲۹/۲	۲۶/۲۹	۲۸/۵۹	۲/۰۷
سختی کل	ppm	۵۳۵۳	۵۰۸۵	۴۸۰۵	۵۰۸۱/۱۱	۲۷۴/۱۸
قلیائیت تام	Meq/l	۱/۹۱	۲/۹۳	۳/۲۴	۲/۶۹	۰/۶۹۷

جدول ١٦- مقادیر پارامترهای اندازه گیری شده درطول ماههای مختلف نمونه برداری دراستخر محمدی (مجاور کانال C5) در سال ١٣٨٦

پارامتر	واحد	محمدی			میانگین	انحراف معیار
		مرداد	شهریور	مهر		
DO	ppm	۱۰/۵	۸/۰۸	۶/۶۸	۶/۶۸	۱/۳۹
BOD_5	ppm	۷/۲۵	۷/۲	۶/۶۵	۶/۳۸	۰/۹۷
pH		۸/۰۵	۸/۱۱	۸/۰۶	۸/۱۲	۰/۰۶۵
PO_4	ppm	۰/۲	۰/۹۸	۰/۲۶	۰/۴۳	۰/۴۸
NO_3	ppm	۳/۹۷	۷/۵۱	۵/۹۳	۵/۸۱	۱/۷۷
NO_2	ppm	۰/۰۱	۰/۰۱۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲	۰/۰۰۸
NH_3	ppm	۰	۰/۰۰۳	۰/۰۲۲	۰/۰۰۹۶	۰/۰۱
T.S.S	ppm	۲۶	۲۷/۵	۳۴	۲۹/۱۶	۴/۲۵
کدورت	NTU	۳۳	۱۹	۲۱	۱۹/۳۳	۱/۵۲۷
شوری	ppt	۳۳	۳۰/۷	۲۸/۴۵	۲۸/۸۶	۱/۷۱۸
سختی کل	ppm	۵۹۰۰	۵۴۱۰	۵۴۱۰	۵۴۷۳/۳۳	۱۰۹/۶۹
قلیائیت تام	Meq/l	۲/۳۸	۲/۹۵	۳/۴۲	۳/۲۷	۰/۲۸

٤- بحث

صنعت آبزی پروری جهان از دیرباز تحت تأثیر آثار مثبت و منفی حاصل از تنوع گونه ای قرار داشته است. میگوی سفید غربی به دلیل برخورداری از امتیازهای ویژه همچون رشد بیشتر، هزینه های پائین تر بدلیل نیاز پروتئینی کمتر و تا حدودی مقاومت به بعضی از میکروارگانیسم ها مورد توجه بسیاری از کشورهای شرق آسیا قرار گرفته و مقام نخست را در بین گونه های پرورشی کسب کرده است. این گونه، بومی آب های سواحل غربی آمریکای لاتین از پروتا مکزیک بوده که در سال ۱۹۹۶ از هاوایی بصورت رسمی وارد کشور تایوان و دیگر کشورهای آسیایی گردید. در ایران نیز بدلیل مشکلات بیماری بخصوص بیماری لکه سفید و تنگناهای موجود در پرورش اقتصادی میگوی سفید هندی، بنظر می رسد که میگوی وانامی بعنوان یک گونه مکمل میگوی بومی می تواند جایگاه مناسبی در صنعت آبزی پروری ایران داشته باشد. اما معرفی این گونه به نقاط مختلف جهان بعنوان یک گونه پرورشی جدید، پیامدهایی ناشی از آلودگی ویروسی را بدنبال داشته که موجب خسارتهای زیادی به مزارع پرورشی شده است (Weyban, 2003- Krol *et al*, 1990; Jory & *et al*, 1999; Reantaso& *et al*, 2005).

بدنبال تعطیلی سایت پرورش میگوی چوئبده آبادان در استان خوزستان در سال ۱۳۸۱ بدلیل بروز بیماری لکه سفید و بروز همین بیماری در سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر زمینه توجه به گونه جدید را فراهم آورد لذا پروژه تحقیقاتی «بررسی امکان معرفی میگوی سفید غربی (وانامی) به صنعت تکثیر و پرورش میگوی ایران» برای اولین بار توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران در سال ۱۳۸۳ در استان بوشهر و پایلوت تحقیقاتی معرفی این گونه در سال ۱۳۸۵ در استان خوزستان در سایت شهید کیانی با موفقیت به اتمام رسید. اما میگوی وانامی به رغم داشتن پاره ای برتری ها نسبت به سایر گونه های میگوی دریایی، مانند همه آبزیان می تواند حامل عوامل بیماری زا باشد یا در شرایط نامناسب محیطی بیمار شده و در صورت عدم رعایت مسائل امنیت زیستی، آثار نامطلوب محیطی بهمراه داشته باشد. هنگامیکه الگوی پراکنش بیماری ها و انگل های میگو بررسی شد (بخصوص در مورد بیماری های ویروسی) دلیل قانع کننده ای وجود دارد که اغلب شیوع بیماریهای اصلی با جابجایی میگوی زنده (مولد، ناپلی، پست لارو) و منجمد شده رابطه دارد (Lightner, 2004- Kristie *et al*, 2004)

برای دستیابی به یک تولید موفق در زمینه پرورش میگو بایستی فاکتورهای خطر را کاهش داد تا از بروز بیماریها جلوگیری شود. از مهمترین عوامل مدیریت کارگاههای پرورش میگو که می تواند فاکتورهای خطر ساز را کاهش داد میتوان به آماده سازی استخرها، مدیریت آب، کیفیت پست لاروها، مدیریت تغذیه وردیابی و مدیریت بیماری ها اشاره نمود. با توجه به سابقه بیماری ویروسی لکه سفید و بیماری ویبریوزیس در سال های گذشته در کارگاههای پرورش میگوی چوئبده آبادان و تعطیلی این مجتمع، به منظور احیاء مجتمع و معرفی گونه میگوی پا سفید غربی، موسسه تحقیقات شیلات ایران یک دستورالعمل بهداشتی با تأکید بر پیشگیری از بیماری لکه سفید که مبتنی بر آماده سازی مزارع و بهبود شرایط محیطی در استخرها را به اجرا گذاشت (افشار نسب و همکاران، ۱۳۸۵).

براساس گزارش Chanratchacol (1995) خروج خاک های سیاه و پاکسازی استخرها از اصول اولیه مدیریت یک کارگاه پرورش می باشد همچنین نامبرده وجود بعضی لکه های سفید و یا قرمزی در میگوها را به کیفیت بد آب استخر و همچنین کف لجنی استخر نسبت داده است. با تعویض آب این علائم از بین رفته و نامبرده همچنین ارتباط بین باکتری های ویبریو و ضعیف بودن میگوها را نیز در کشور تایلند و اندونزی گزارش کرده است. براساس گزارش MPEDA-NACA (2003) در مزارعی که معمولاً با ۵۰۰ هزار پست لارو یا بیشتر ذخیره دار می شوند و دارای یک لایه خاک سیاه در کف استخر می باشند، باید خاک کف استخر را بعد از هر برداشت کاملاً تعویض نمود که در این دستورالعمل به این موضوع توجه گردید. همچنین با توجه به آلوده بودن منطقه چوئبده آبادان به ویروس لکه سفید جهت پیشگیری از این بیماری در این دستورالعمل روی کارگاههایی که در حاشیه رودخانه بهمنشیر بودند حساسیت بیشتری وجود داشت بطوریکه در صورت ذخیره سازی این کارگاهها، قرار بر این گردید که در حاشیه رودخانه به ارتفاع ۵۰-۳۰ سانتی متر فنس کشیده شود تا از ورود حاملین ویروس لکه سفید بخصوص خرچنگ ها جلوگیری شود. براساس گزارش Corsin & *et al.* 2001 استخرهایی که به دریا نزدیک تر هستند بیشتر در معرض آلودگی هستند و همچنین باید از تراکم و یا آلودگی های باکتریایی که میتواند باعث استرس به میگوها شوند جلوگیری بعمل آورد. همچنین بایستی از پرندگان دریایی که می توانند حاملین ویروس بین استخرها و آب های طبیعی باشند جداً جلوگیری کرد. Kristie & *et al*, 2004 از پرندگان

دریایی آزمایشاتی بعمل آورد و حضور ویروس های IHHNV و TSV گزارش کرده است را که بصورت مکانیکی جابجا میشود.

در تحقیق سال ۱۳۸۶ متأسفانه بارها حضورپرندگان را در استخرهای پرورشی شاهد بوده ایم که احتمال انتقال آلودگی های ویروسی به آب های طبیعی دور از ذهن نیست.

ویروس ها از میان دیگر میکروارگانیسم ها حدود ۸۰٪ علل تلفات در بین آبزیان بخصوص میگو می باشد از بین ۲۰ ویروس شناسایی شده در پنائیده ها چهار ویروس IHHNV –WSSV –YHV و TSV از مهمترین علل تلفات در بین میگوها گزارش شده است از آنجائیکه TSV و IHHNV در منطقه هاوایی و آمریکا تلفات می گیرد بیماری ویروسی WSSV و YHV اولین بار در سال ۱۹۹۱ در آسیا گزارش و باعث تلفات سنگین گردید. با جابجایی محصولات آبزیان بصورت زنده یا منجمد شده گزارش های متعددی توسط Limsuwan, 2003 ، Jory, 1999، Yang, 2006، Nunan & *et al*, 1998، Tu& *et al*, 1999، Cheng, 2004، Flegel, 2006 و دیگر محققین بر روی جابجایی و معرفی ویروس ها به مناطق جدید گزارش شده است. از مهمترین این ویروس ها IMNV است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ در برزیل و سپس در سال ۲۰۰۶ در اندونزی توسط Sepapin & *et al*, 2007 گزارش گردید.

کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نبوده و با ورود میگوی وانامی به ایران و با تحقیقات انجام گرفته طی دو سال در مرکز تحقیقات آبزی پروری جنوب کشور و تحقیق حاضر ویروس TSV و IHHNV در میگوی وانامی شناسایی گردید. برای تأیید صحت کیت های خریداری شده علاوه بر استفاده از کیت های WIT multivir Iq2000، WSSV Iq2000، TSV Iq2000 از کیت های داخلی (ساخت مؤسسه) و همچنین کیت Vetek کره ای نیز استفاده گردید و ویروس ها TSV، WSSV ، IHHNV در میگوهای وانامی شناسایی شدند علاوه بر این از روش آسیب شناسی بافتی نیز استفاده گردید و ویروس های TSV، MBV و HPV نیز در بافت ها مشخص گردید. در این تحقیق و ویروس های IHHNV، TSV، WSSV، MBV و HPV برای اولین بار در میگوی وانامی گزارش می شود.

با توجه به اینکه عوامل خطر سازی می توانند در شیوع بیماری های ویروسی و ایجاد تلفات موثر باشند محققین بسیاری همچون افشار نسب و همکاران ۱۳۸۵، Corsin & *et al*, 2001، Selvin & *et al*, 2003، Mohan & *et al*, 2005

و Limsuwon & *et al*, 2003 روی کنترل حاملین ویروس ها (خرچنگ ها و میگوهای وحشی) و یا آلودگی باکتریایی و بطور کلی ایمنی زیستی (Biosecurity) در سطح استخر، مزرعه، منطقه وغربال گری گونه های جدید برای پیشگیری از آلودگی های جدید تأکید کرده اند. در تحقیق حاضر ویروس لکه سفید از خرچنگ خانواده Grapsidae جنس .Grapsus sp در رودخانه بهمنشیر (روبروی کانال های آب رسان به مجتمع چوئبده آبادان) نیز جداسازی و شناسایی گردید. غربال گری و بررسی دقیق مولدین وارداتی وانامی به ایران بایستی از جهت ویروس شناسی بصورت دقیق انجام گیرد چون که احتمال انتقال ویروس ها از مولد به نوزادان به خصوص در مورد ویروس های IHHNV، WSSV و HPV توسط Motte & *et al*, 2003 و Karunasagar & *et al*, 2004 گزارش شده است البته تا بحال گزارشی روی انتقال عمودی ویروس TSV از مولد به نوزاد وجود ندارد که با توجه به واردات مولدین وانامی به ایران این موضوع بایستی مد نظر قرار گیرد. شناسایی و ردیابی ویروس ها توسط روش های مختلفی همچون PCR، Insitu Hybridization، منوکلونال آنتی بادهای TEM (میکروسکوپ الکترونی) و حتی بصورت مستقیم با استفاده از میکروسکوپ نوری (مشاهده علائم روی کاراپاس) و یا مدفوع میگو قابل انجام است. برای مثال ویروس HPV هم توسط PCR در میگوهای منودون در تایلند (Sukhumsirichart & et al, 1999) و هم در میگوهای P.chinensis در چین (Bonami & *et al*, 1995 و Pantoja & *et al*, 2000) گزارش شده است. در هندوستان Saurabh & et al, 2006 بهترین روش جهت ردیابی ویروس ها و ارزیابی کیفیت پست لاروها را استفاده از روش PCR ظاهر پست لاروها، شوک شوری و فرمالین دانسته است. در روش استفاده از مدفوع و مشاهده ویروس زیر میکروسکوپ نوری با استفاده از رنگ آمیزی نیازی به از بین بردن مولدین و یا پست لاروها وجود ندارد.

شناسایی ویروس های IHHNV، TSV و WSSV در میگوی وانامی در این تحقیق با استفاده از روش nested PCR انجام گرفته است که بسیار روش دقیقی می باشد.

Manjanaik& *et al*, 2005 برای شناسایی HPV با استفاده از روش non- nested PCR و nested PCR اختلاف فاحشی را در میگوهای *F.indicus* و *P.semisulcatus* گزارش کرده است.

در مطالعه اخیر حضور همزمان ویروس های TSV، HPV و WSSV بارها مشاهده گردید که یافته های این پروژه با مطالعات دیگر محققین همچون otta & *et al*, 2003 و Umesha & *et al*, 2003 در میگوهای منودون به ظاهر سالم

توسط روش PCR در هند مطابقت دارد. همچنین Manivannan et al, 2002 حضور همزمان MBV، MSV و HPV را در پست لاروهای منودون در هندوستان گزارش کرده است. نمونه های وانامی صید شده در این تحقیق در استخرهای پرورشی علیرغم داشتن ویروس TSV و HPV ظاهر سالمی داشتند.

درتعیین کیفیت سلامت و بهداشت میگوها علاوه بر ویروسها وضعیت باکتری ها، قارچ ها و انگل ها و تأثیر این میکروارگانیسم ها و همچنین وضعیت فاکتورهای محیطی همه از عوامل بسیار مهمی هستند که در تولید موفق یک کارگاه حائز اهمیت هستند. Chanratchakool, 1995 وجود لکه های سفید برروی میگوی مونودون را نامناسب بودن فاکتورهای آب و افزایش بار آلی و باکتریهای ویبریو در کشورهای اندونزی، چین و ژاپن دانسته اند بخصوص حضور باکتری های ویبریو را زیر کاراپاس و در هپاتوپانکراس جدا کرده است. Guzman & et al, 2001 اثرات چهار گونه ویبریوی آلجینولتیکوس، پاراهمولیتکوس، هارویی و پنائیسیدا را بر روی مراحل مختلف لاروی میگوی وانامی مورد بررسی قرار داده است و ایشان مشاهده کرده است که ویبریو آلجینولیتکوس از دیگر ویبریوها فراوان تر اما نسبت به دیگر ویبریوها تلفات بسیار کمتری را باعث شده است.

افشار نسب و همکاران (۱۳۸۵) باکتری های ویبریوآلجینولیتکوس، ویبریوپاراهمولتیکوس، ویبریومیمیکوس، ویبریوولینفیکوس و پلزیوموناس شیگلوئیدس را در میگوی وانامی گزارش کرده است. ایشان همچنین قارچهای آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فومیگاتوس و فوزاریوم و تک یاخته های ورتیسلا و زئوتامنیوم را نیز گزارش کرده است. در این تحقیق ویبریوهای (*Vibrio alginolytis*، *V.nereis*، *V.flavialis*، *V.splendidus*، *V.anguillarum* و V.parahaemolyticus) جدا سازی گردید همچنین قارچهای *Aspergillus flavus*، *Asp.fumigatus*، *Chladosporium sp.*، *Trichophyton sp.*، *Penicillium sp.* جدا سازی گردید. از پاهای شنای و آبشش میگوهای وانامی هم تک یاخته های Zoothamnium و *Vorticella sp.* جدا سازی گردید.

Sanchez & *et al*, 2002 حضور انگل گریگارین و باکتری فیلامنتی لوکوتریکس را در میگوی وانامی، Vandberghe & *et al*, 1999 ویبریو هارویی و آلجینولتیکوس را بعنوان باکتری های مهم آلوده کننده، در کارگاه های تکثیر اکوادور و مزارع پرورش مکزیکو دانسته است. ایشان همچنین ویبریو میمیکوس و ویبریو پاراهمولتیکوس را نیز جدا سازی کرده است.

Selvin *et al*, 2003 ارتباط بین حضور بیماری لکه سفید را بهمراه ویبریو آلجینولتیکوس را در میگوهای منودون گزارش کرده است. در این تحقیق در ماههای مختلف، میگوهایی که بیماری لکه سفید را در آزمایش PCR از خود نشان داده اند تعداد باکتریها در هر گرم میگو بخصوص ویبریوآلجینولتیکوس هم افزایش پیدا کرده بود و در استخرهایی که ویروسهای TSV و WSSV و HPV نیز از میگوها شناسایی گردید تنوع باکتریهای گونه ویبرو نیز بیشتر مشاهده گردید. Karunasagar *et al*, 2004 بیش از ۲۰ گونه باکتری را در میگوی منودون در هند جدا کردند که اغلب آنها متعلق به جنس ویبریو بوده است این ویبریوها از کارگاه های تکثیر، استخرهای پرورشی و رسوب جداسازی گردید. Hongwang *et al*, 2005 و Cheng *et al*, 2004 اثر تحریک کننده های ایمنی کیتین و کیتوزان را و اثر این ماده ها را روی ویبریوآلجینولتیکوس مورد بررسی قرار داده است. از مهمترین باکتری های پاتوژن که در میگوی وانامی مهم است (Necrotizing hepato pancreatitis (NHP نکروز هپاتوپانکراس است که در میگوهای وانامی این تحقیق جدا سازی نگردید. البته جدا نشدن این باکتری دلیل بر عدم این باکتری نبوده است و ضروری است در آینده کیت تشخیص این باکتری نیز خریداری گردد. باکتری NHP در میگوهای وانامی در مکزیکو و تکزاس توسط Rodriguez & *et al*, 2006 و Frelier & *et al*, 1992 گزارش شده است.

در این تحقیق شمارش کل ویبریو (Total vibrio count (TVC و تعداد کل باکتری در استخرهای پرورشی، رودخانه بهمنشیر و کانال های آب رسان اندازه گیری شد که متوسط شمارش کل ویبریو در میلی لیتر آب استخرهای پرورشی $۱۰^{۳}\times$ ۱/۹۶– $۱۰^{۳}$ × ۰/۰۱ و تعداد کل باکتری در میلی لیتر آب استخرهای پرورشی $۱۰^{۳}\times$ ۱۴/۲۵–$۱۰^{۳}\times$ ۰/۲۱ شمارش گردید. وضعیت باکتری های ویبریو و باکتری های کل در حالت جزر نسبت به مد رودخانه بیشتر بوده است. وضعیت فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب نیز در حالت جزر نسبت به حالت مد از وضعیت مناسبی برخوردار نبوده است و از این اطلاعات میتوان نتیجه گرفت که آب گیری کانال ها در حالت مد به مراتب بهتر از حالت جزر می باشد. گاهی اوقات عوامل و فاکتورهای محیطی و وضعیت فاکتورهای فیزیکی- شیمیایی آب باعث بروز بیماری و حضور باکتریهای فرصت طلب همچون ویبریوها، می تواند بیماری و تلفات در کارگاههای پرورش میگو را تشدید کند. Limsuwan, 2003. بیماری آبشش سیاه را در میگوی وانامی ناشی از شرایط نامناسب آب استخر و تراکم بیش از حد دانسته است. Davis *et al*, 2004 مشاهده کرده است که میگوی وانامی در آمریکا با توجه به تحمل شوری در آبهای سطحی هم قابل کشت است اما باتراکم بالا احتمال

حضور ویبریوهای فرصت طلب را در بروز بیماری محتمل دانسته است. همچنین Gross & et al, 2004 غلظت بالای نیتریت را عامل کاهش رشد وانامی دانسته است همچنین Rahman & et al, 2007 تغییرات ناگهانی دمای هوا در کشورهایی همچون بنگلادش را زمینه مساعد برای بروز بیماری لکه سفید می داند در مطالعه اخیر با توجه به اینکه تغییرات ناگهانی در دمای هوا وجود نداشت بیماری لکه سفید علیرغم آزمایشات مثبت حضور ویروس WSSV در میگوها بروز نکرد اما با کاهش دما و به مرور که فصل پاییز آغاز گردید. لکه های سیاه در میگوهای وانامی مشاهده گردید که ازعلائم بالینی ویروس TSV می باشد. با نمونه برداری از این میگوها با استفاده از روش PCR و آسیب شناسی بافتی وجود ویروس TSV محرز گردید.

حفظ فاکتورهای کیفی آب مزارع پرورش میگودر دامنه مناسب و مورد قبول برای رشد مطلوب میگوهای در حال پرورش ضروری است و نبایستی میزان آنها به حد مرگ آور برسند.

اکسیژن محلول به عنوان مهمترین پارامتر در آبزی پروری دارای اهمیت بوده و سنجش میزان آن در مدیریت صحیح استخرهای پرورشی نقش حیاتی دارد

مقادیر اکسیژن ، BOD5 در استخرها خیلی نزدیک به دامنه قابل قبول جهت امر آبزی پروری میباشد (Boyd,1998 ،Stickney,2000).

دامنه فسفات ثبت شده در استخرهای مورد مطالعه برابر mg/l ۱/۵۵-۰/۱۵میباشد که در مقایسه با مقادیر قابل قبول برای استخرهای پرورشی (۰/۶ mg/l-۰/۰۱۵)تا حدی زیاد میباشد (Boyd,1998). برای تدبیر در حل این مشکل باید از سیکل فسفر در آب اطلاعاتی داشته باشیم .

ذرات فسفر معدنی و آلی و همچنین اشکال فسفر محلول متحمل انتقالات و جابجایی های مداوم و مستمر قرار میگیرد . فسفر محلول (معمولا بشکل ارتو فسفات)بوسیله فیتو پلانکتون جذب شده ،بشکل فسفر آلی در می آید . فیتو پلانکتون ها سپس بوسیله مصرف کنندگان یا زئو پلانکتون ها مصرف میشود . بیش از نیمی از فسفر جذب شده بوسیله زئو پلانکتون ها بصورت فسفر معدنی دفع میشود که این نوع فسفر دوباره در چرخه فسفر قرار میگیرد ،بعبارت دیگر فسفر معدنی دوباره بوسیله فیتوپلانکتون ها جذب میشود(Smith,1990,Holtan,*etal*.,1988)ماندگاری فسفات محلول در محیط بسیار کوتاه است ولی میتواند برای دوره های زمانی طولانی در بیومس گیاهی یا بصورت نمک های نامحلول در سوبات باقی بماند. فسفات اضافی میتواند سبب شکوفایی جلبکی و از این رو

معضلات آلودگی ثانویه گردد. این امر ممکن است منجر به تسریع افزایش غذا (پرغذایی)طبیعی برکه ها و دریاچه ها گردد. با توجه به مطالب فوق الذکر بنظر میرسد جهت مقابله با فسفات اضافی ابتدا باید آب ورودی در استخرهای ذخیره وارد شود و سپس به استخرهای پرورشی منتقل گردد که با انجام این کار تا حد بسیار زیادی مقدار فسفات به حد متعادل و قابل قبول میرسد .

دامنه نیترات ثبت شده در استخرها از حداقل ۲/۲ mg/l تا حداکثرmg/l ۸/۴ میباشد . مقادیر قابل قبول نیترات جهت آبزی پروری در دامنه mg/l ۱۰-۰/۲قرار دارد (Boyd,1998). بنابر این مشاهده میشود که مقادیر اندازه گیری شده نیترات در حد قابل قبول میباشد .

دامنه تغییرات آمونیاک در استخرهای مورد مطالعه برابرmg/l ۰/۱۴۹-۰ میباشد . نتایج نشان میدهد که بجز در یک مورد که مقدار آمونیاک در مهر ماه mg/l ۰/۱۴۹ ثبت شده است در همه موارد کمتر از mg/l ۰/۱ثبت شده است . البته در این مورد بخصوص نیز مقدار آمونیاک فراتر از حد مجاز نرفته است ، بلکه به حداکثر مقدار مجاز رسیده است (Boyd,1998).

روند تغییرات شوری در رودخانه بهمنشیر از اردیبهشت تا تیر افزایش پیدا میکند و این کاملا طبیعی است زیرا با افزایش دما ،شوری نیز افزایش پیدا میکند ولی از تیر ماه به بعد با وجود اینکه دمای آب هنوز بالاست ولی مقدار شوری بشدت کاهش می یابد که این حالت احتمالا بعلت وجود شرایط خاص رودخانه های جزر و مدی میباشد . در استخرهای مورد مطالعه مقدار شوری از مرداد ماه تا مهر ماه تقریبا کاهش می یابد و این کاملا طبیعی میباشد زیرا در این مدت زمانی بعلت تدریجی کاهش دما ،مقدار شوری نیز بتدریج کاهش می یابد .دامنه تغییرات شوری در رودخانه برابرppt ۲۳/۵-۰/۲۷ و در استخرها برابر ppt ۳۳/۰۷ -۱۵/۷ می باشد . هریک از گونه های آبزیان یک دامنه شوری مناسبی دارد که در خارج از این دامنه جانور باید انرژی قابل ملاحظه ای را صرف تنظیم فشار اسمزی نماید ، میگوی وانامی که در این طرح مورد مطالعه قرار گرفته است ، دامنه تحمل شوری وسیعی دارد و میتواند ازppt ۰/۵ تا ۴۵ را تحمل کند. در شوریppt ۳۴-۷ راحت زیست مینماید ولی در شوری پایین ترppt ۱۵-۱۰(که درآن دامنه محیط و خون در حالت ایزواستاتیک هستند) خوب رشد میکند بنابر این میگوی وانامی بخاطر این ویژگی ها براحتی در محیط مورد مطالعه میتواند رشد کند.

پیشنهادها

- انجام پایش مداوم آلاینده های زیستی و غیر زیستی در رودخانه بهمنشیر و استخرهای پرورشی
- ردیابی ویروس های مهم میگوی وانامی و خرید کیت آنها (IMNV، YHV و NHP)
- تهیه پرایمر و کیت های داخلی
- استفاده از فیلتراسیون در مسیر آب ورودی به استخرهای پرورشی جهت پیشگیری از حاملین ویروس
- استفاده از مولدین و پست لاروهای SPF و SPR
- راه اندازی مرکز SPF و SPR میگو در ایران

تشکر وقدردانی

- ریاست محترم پژوهشکده جناب آقای دکتر مرمضی بدلیل همکاری صمیمانه
- معاون محترم تحقیقاتی پژوهشکده جناب آقای مهندس اسکندری بدلیل همکاری و حل مشکلات و ارائه راهکارهای پیشنهادی
- آقایان حاجب نژاد ، سوری کارشناسان محترم اداره میگو آبادان
- دفتر اطلاعات علمی ، کتابخانه ، اداری ، مالی ، تدارکات پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور
- آقای جمال سلیمانی تکنسین بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان پژوهشکده

واژه نامه

BGBLB(Brilliant Green Bile Lactose Broth)
BOD_5(Biochemical Oxygen Dimand)
BP(Baculovirus penaei)
CFU(Colony Forming Unit)
DNA(Deoxy ribo Nucleic Acid)
DO(Dissolved Oxygen)
ELISA(Enzyme Linked Immuno Assay)
HPV(Hepato pancreatic parvolike virus)
IHHNV(Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus)
IMNV(Infectious myonecrosis virus)
MBV(Monodon Baculovirus)
Meq/l(Milli Equivallent per litre)
MPN(Most Probable Number)
NHP（Necrotizing hepato pancreatitis)
NTU(Nephazolin Turbidity Unit)
PCR(PolymeraseChain Reaction)
PL(Post Larvae)
ppm(part per million)
ppt(part per ton)
SDA(Sabourod Dextrose Agar)
SMV(Spawner isolated mortality virus)
SPF(Specific Pathogen Free)
SPR(Specific Pathogen Resistance)
TCBS(Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar)
TEM(Transmission Electron Microscopy)
TPC(Total Plate Count)
TSA(Tryptic Soy Agar)
TSS(Total Solide Sediment)
TSV(Taura Syndrom Virus)
TVC(Total Vibrio Count)
WSD(White Spot Disease)
WSSV(White Spot Syndrom Virus)
YHV(Yellow head virus)

منابع

۱.افشار نسب، م.؛ م. محمدی دوست؛ ع. قوامپور؛ ع. متین فر؛ س.ر. سید مرتضایی؛ م. سوری؛ ا. جرفی؛ غ. فقیه؛ خ. پذیر؛ م. حق نجات؛ م. ر. مهرابی و ش. کاکولکی. ۱۳۸۵. احیاء پرورش میگو در سایت چوئبده – آبادان با رعایت اصول بهداشتی و پیشگیری از بیماریهای میگو با تأکید بر بیماری لکه سفید. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۹ ص.

2. Bonami , J.R.; J.Mari; BT.poulos and D.V.Lightner.1995.Characteri zation of hepato Pancreatic parvo-like virus, a second unusual parvo virus pathogenic for penaeid shrimp. Jof general virology , vol. 76, pp:813-817

3. Bonami , J.R.;K.W.Hasson ; J.Mari and B.T.Poulos. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent J.of General virology, vol.78, pp: 313-319.

4. Briggs, M; S. Smith; R.subasinghe and M.phillips. 2005. Introduction and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the pacific. FAO no.476,78p

5. Buller, N.B, 2004 . Bacteria from fish and other aquatic animals : a practical identification manual. CABI publishing . 361P.

6. Chanratchakool, P. 1995. white patch disease of black Tiger shrimp (*P.monodon*). AAHRI News letter,vol.4, No.1, pp:1-2

7. Chayaburakul, K;D.V.Lightner; S. Sriurairattana; K.Nelson and B: withyachumnarn kul.2005. Different responses to IHHNV in penaeus monodon and L.vannamei. Dis of Aquat organ , vol . 67,no.3, pp: i91-200

8. Cheng, W.; C. Hungliu; S.Tuen yeh and J. Chuchen. 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp Litopenaeus vannamei and its resistance against vibrio alginolyticus. Fish and Shell fish Immunology, vol. 17, pp: 41-51.

9. Corsin, F.; J.F. Turnbull; N.V. Hao; C.V. Mohan; T.T. phi; L.H. phuoc; N.T.N. Tinh and K.L. Morgan. 2001. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice- shrimp farming system. DAO, vol. 47, pp:1-12.

10. Creswell, R.L., 1993. Aquaculture desk refrence. Van Nostrand Rinhold.

11. CTSA publications. 1996. shrimp Diseases. Center for tropical and subtropical Aquacultre No.121, pp: 18-22

12. Davis ,D.A.;T.M.samocha and C.E. Boyd. 2004. Acclimating pacific white shrimp , Lito penaens vannamei, to inland, low salinity waters. SRAC publications No.2601 pp: 89-94.

13. FAO.2003.Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (p.vannamei) hatcheries in latin America FAO no.450 Rom .2003.64p.

14. Flegel , T. W. 2006. The special danger of viral pathogens in shrimp translocated to Aquculture. Science Asia, vol.32 pp:215-221

15. Frelier, P.F; R.F. Sis; T.A. Bell and D. H. Lewis. 1992. Microscopic and ultra structural studies of necrotizing hepatopancreatitis in pacific white shrimp (P.vannamei) cultured in Texas. Vet pathol, vol. 24, no.4, pp:269-277.

16. Gross,A.; S.Abutbul and D.ziberg .2004. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, Litopenaens vannamei , cultured in low- salinity brackish water. J.of the world Aquaculture society.vol.35 pp:315-321

17. Guzman , A.;J.R. vazquez and F.Ascencio 2001. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (L.vannamei) to four vibrio species. J.Inverteb pathol ,vol .78,No.4, pp: 215-219.

18. Hongwang, S.and Y.Chuchen .2005. The protective effect of chitin and chitosan agaist vibrio alginolyicus in white shrimp Litopenaeus vannamei. Fish and shell fish Immunology. Vol. 19, pp:191-204

19. Jimenez, R.;R.Barniol ; L,D.Barniol and M.Machuca. 1999. Infection of IHHNV virus in two species of cultured penaeid shrimp Litopenaeus vannamei (Boone) and Litopenaeus stylirostris (stimpson)in Ecuador during El Nino 1997- 98. Aquacultare Research.vol. 30, pp:695-705

20. Jory,D.:T.Cabrera; B.polanco; R.sanchez; J.Millan; J.Rosas ;C.Alceste; E.Garcia; M.Useche and R.Agudo.1999. Aquaculture in Venezuela Aquaculture magazine sep/oct .vol.25,no.5, pp:12-16

21. Karunasagar, I; I, karunasagar and R.K. umesha. 2004. Shrimp Health management in Asia, microbias Diseases in shrimp Aquaculture. University of Agricultural sciences. Mangalore, India pp: 121-134.

22. Kristie, A; M. S. Vanpatten and D.V. Lightner. 2004. Seabirds as vactors for penaeid shrimp viral diseases. Industry Briefs marine shrimp farming program vol. 10, no.1 pp: 1-6.

23. Krol, R.M; W.E.Hawkins and R. M. Overstreet. 1990. Reo- like virus in white shrimp P.vannamei (Crustacea: Decapoda): Co- occurrence with Baculovirus penaei in experimental infections.Dis. Aquat. Org, vol. 8, pp:45-49.

24. Lighter, D.V.;C.R.pantoja ;B.T.poulos ; K.F.J.Tang; T.M.Redman; T.Andreans and J.R.Bonami .2004.Infectious myonecrosis (IMN) a new virus diseases of Litopenaeus vannamei . Book of Abstracts. World Aquaculture 2004, March 2-5
25. Lightner, D.V. 2004. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV,TSVand YHV: History in the Americas and current status Arizona, Tucson , USA, 20p
26. Lightner, D.V. and R.M.Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. vol,164. pp:201-220.
27. Lightner, D.V.1999. The Penaeid shrimp virusus TSV, IHHNV , WSSV and YHV current status in the Americas, Available diagnostic methods and management strategies. J.of APPL Aquaculture, vol.9 . pp: 27-52
28. Limsuwan, C. 2003. Diseases of pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) in Thailand The AAHRI news letter , vol. 12, no .1 pp:1-5
29. Manivannan,S.;S.K.Otta and I. Karunansagar. 2002. Multiple viral infection in P.monodon shrimp postlarvae in an Indian hatchery. Dis Aquat org. vol .48. pp: 233-236
30. Manjanaik, B.;K.R.Umesha and I.Karunasagar. 2005. Detection of HPV in wild shrimp from India by nestesd PCR.Dis Aquat organ , vol.63, pp:255-259
31. Mohan, C.V.; F.corsin and A. padiyar. 2005. Disease prevention focus: Farm- Level biosecurity and white spot Disease of shrimp. Aquaculture Health Internationl, nov. 2005, pp:16-20.
32. Morales , M.S.and C.C. Sanchez. 1999. Histopathological studies on wild Broodstock of white shrimp penaeus vannamei in the platanitos Area, Adjacent to san Blas , Nayarit , Mexico,J.of the world Aquacultuer society .vol. 30, pp: 192-200
33. Motte, E.; Yugcha; J. Luzardo; F.Castro; G.Leclercq; J. Rodriguez; P.miranda; O.Borja; J.serrano; M. Terreros; K. Montalvo; A. Narvaez; N. Tenorio; V.Cedeno; E.Mialhe and V.Bulo. 2003. prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp L. vannamei. Aquaculture. Vol. 219, pp:57-70.
34. MPEDA/NACA.2003. Shrimp Health management extension manual . MPECA, cochin, india . 36p.
35. Murray , P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenorer, F.C. and Yolken, R. H., 1998. Manual of clinical microbiology: Mycology. pp.699-854.
36. Nunan , L.M;B.T.poulos and D.V.Lightner.1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow Head virus (yHV) in imported commodity shrimp. Aquacultare. vol.160. pp:19-30
37. Otta ,S.K.and I.Karunasagar. 2003. Detection of MBV and WSSV in apparently healthy p.monodon from India by PCR.Aquaculture, vol.220, pp:56-69
38. Pantoja , C.R.and D.V.Lightner. 2000. A non- destructive method based on the PCR for detection of HPV of penaeid shrimp. Dis Aquat organ , vol. 39,pp:177-182
39. poulos, B.T.;C.R.Pantoja ; B.Dunlop; D.Aquilar and D.V.Lightner. 2001. Development and application of monoclonal Antibody for the detection of whitespot syndrome virus of penaeid shrimp. Dis .Aquat,org,vol.47,no.1, pp:13-23
40. Rahman , M.M;M. Corteel ; J.J.Dantas- lima ;M.wille; v.Alday-sanz; M.B.pensaert; p.sorgeloos and H.J .Nauwynck.2007. Impact of daily fluctuations of optimum(27^{0C}) and high water temperature (33^{0C}) on penaeus vannamei Juveniles infected with white spot syndrome virus (wssv). Aquaculture. Vol. 269. pp:107-113
41. Reantaso , M.G.B; R.P.Subasinghe; J.R.Arthur ; K.Ogawa; S.Chinabut; R.Adlard ; Z.Tan and M.Shariff . 2005. Disease and health management in Asian Aquaculture. Veterinary parasitology, Article In press p:25-47
42. Rodriguez, R. E. D; S.S. Rodriguez; M.L.Flores; A.D. Escamilla; and M.I. Gomez- Solano. 2006. A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in campeche, Mexico: A first case report. Aquaculture, vol. 255, Issues. 1-4, pp: 606-609.
43. Sanchez, C.;H.Martinez ; A.R, Sales ; F.Avila; M.Rodriguez and A.Torres .2002. Asurvey of infectious Diseases and parasites of mexico. J. world Aquacult. Soc , vol.33. no. 3, pp:316-329
44. Sangamaheswaran, A.P. and M.J.P.Jeyaseelan. 2001. White spot viral Disease in Penaeid shriump- A Review. Naga, vol.24, nos, 3,4 pp:16-22.
45. Saurabh,S; V.Kumar; S.Karanth and G.Venkateshwarlu. 2006. Selec of high-health postlarvae:Aprerequisite for sustainability of the Indian shrimp industry. Aquaculture Asia mag. vol. XI, No.2. pp:4-8
46. SEAFDEC.2005. Regional technical consultation on the aquaculture of penaeus vannamei and other Exotic shrimps in southeast Asia. Seafdec publication june 2005,99 p.
47. Selvin, J. and A.P.Lipton. 2003. vibrio alginloyticus associated with white spot disease of penaeus monodon. Dis Aquat organ, vol.3, no. 57, pp:1-2.
48. Stickney, R.R., 2000. Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc. 1063 p.
49. Sukhumsirichart , W.;C.wongteerasupaya; v.Boonsaevg; s.panyim; s.sriurairatana ; B.with yachumnarnkul and T.W.Flegel 1999. Characterization and PCR detection of hapatopanereatid parvo virus (HPV) from penaeus monodon in Thailand. Dis Aquat organ , vol. 38,pp:1-10
50. Tu, c.; H. T. Huang; S. H. Chuang; Y. P. Hsu; S. T. Kuo; N. y. Li; T. L. Hus; M. C. Li and s. y. Lin.1999. Taura syndrome in pacific white shrimp penaeus vannamei cultured in Taiwan. Dis Aquat org , vol. 38. pp:159-161

51. Umesha , K.R.;A.Uma;S.K.Otta and I.karunasagar. 2003. Detection By PCR of hepatopancreatic parvo virus (HPV) and other virus in hatchery – reared P. monodon post larve. Dis .Aquat org , vol . 57, pp: 141-146.
52. Vndberghe , j.; L.verdonek; R.R.Arozarena; G.Rivera; A.Bolland; M.Balladares , B.Gomez; J.Calderon; P. Sorgeloos and J. Swings. 1999. Vibrios Associated with Litopenaens vannamei larvae ,postlarvae , Brood stock.and Hatchery probionts. Appl Environ microbial ; vol.65, no.6, pp: 2592-2597
53. Wyban ,J. 2003. penaeus vannamei seedstock production recent developments in Asia. Global Aquacure Advocate.pp:78-79
54. Wyban, y. 2007. Domestication of pacific white shrimp revolutionizes aquaculture. Global aquaculture Advocate. Jul/sep2007. pp:42-44
55. Yang, B; X.Song; Y. Huang; C. Y. Shi and L.Liu.2006. Evidence and existence of infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus (IHHNV)in penaeid shrimp cultures in china. Vet .

پیوست

تصویر ۳۳- بیومتری و بررسی رشد میگوها

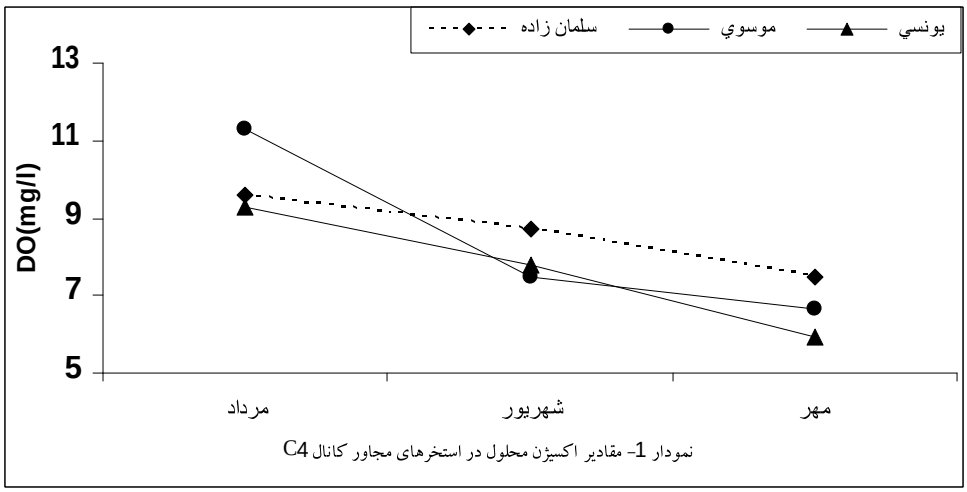
تصویر۳٤-نمونه برداری از میگوهای ضایعه دار جهت ردیابی ویروسها

تصویر۳۵- صید میگوها و خرچنگ های حامل ویروس لکه سفید در رودخانه بهمنشیر

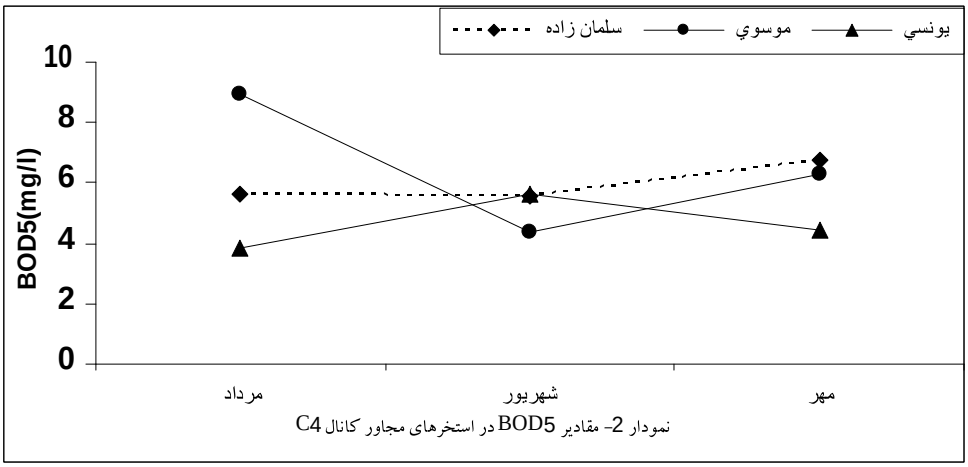
تصویر۳٦- ردیابی موجودات ناخواسته و بررسی میگوهای پرورشی

تصویر۳۷- پرندگان دریایی در استخرهای پرورشی

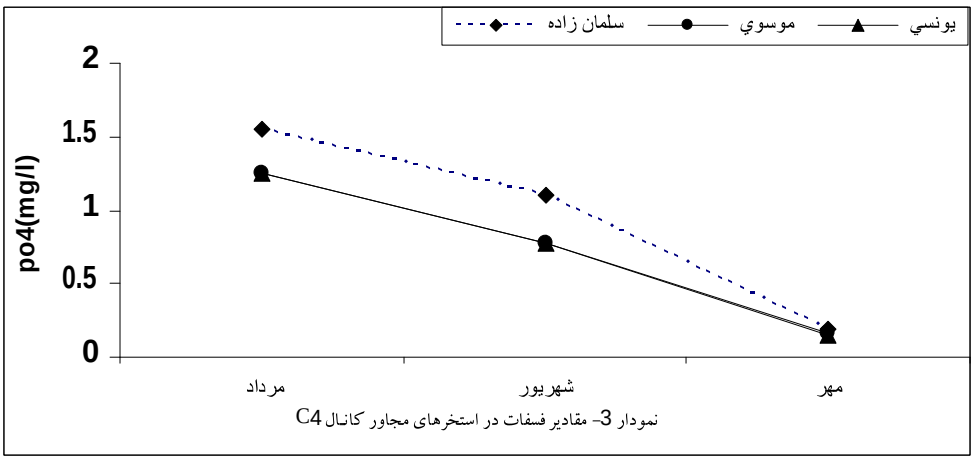
تصویر۳۸- صید میگوهای وحشی از رودخانه بهمنشیر جهت ردیابی ویروس لکه سفید



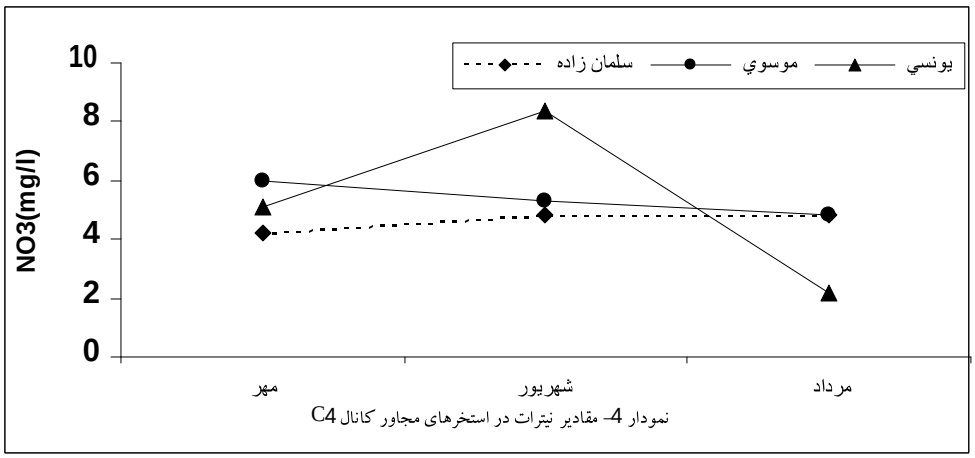
نمودار 1- مقادیر اکسیژن محلول در استخرهای مجاور کانال C4



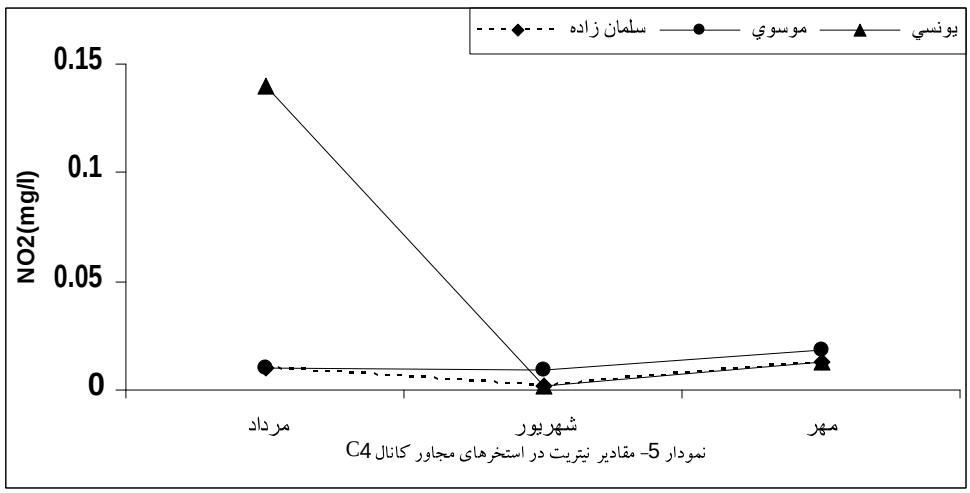
نمودار 2- مقادیر BOD5 در استخرهای مجاور کانال C4



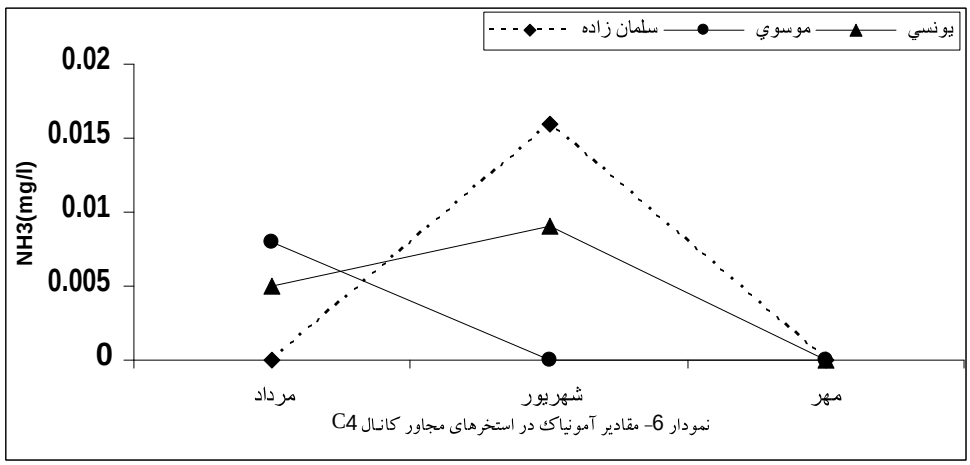
نمودار 3- مقادیر فسفات در استخرهای مجاور کانال C4



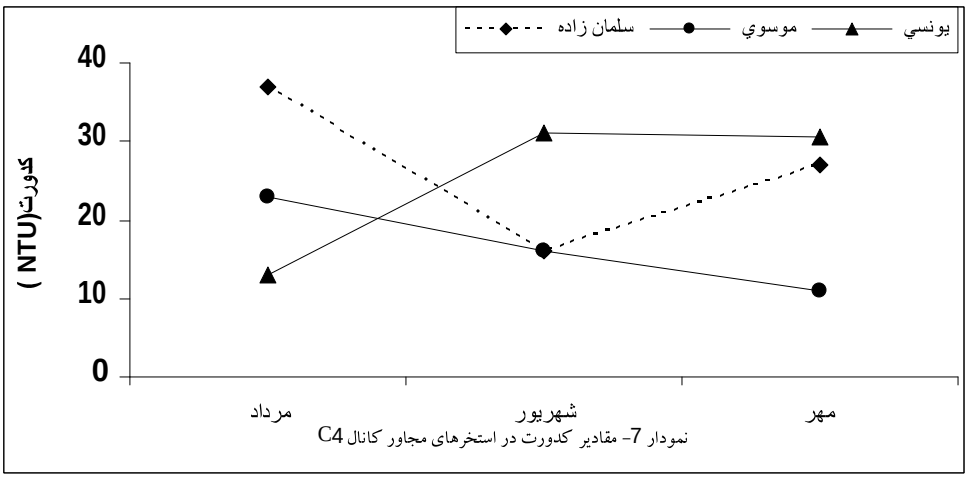
نمودار 4- مقادیر نیترات در استخرهای مجاور کانال C4



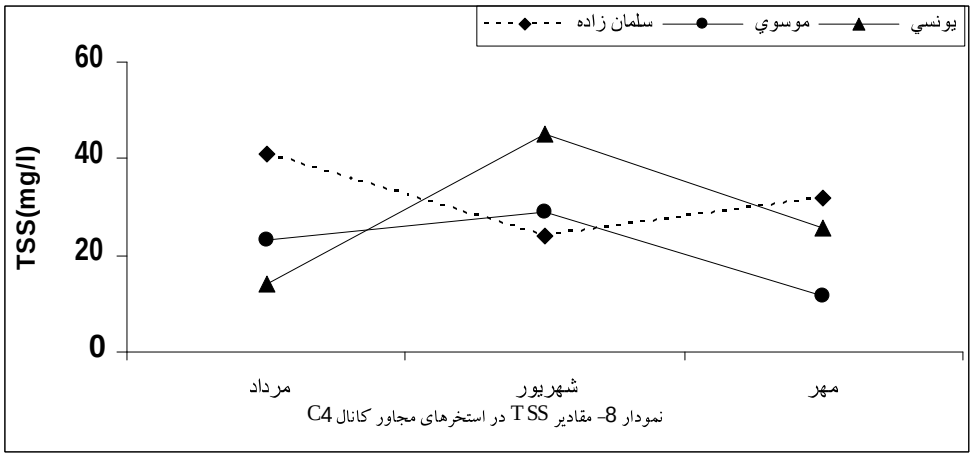
نمودار 5- مقادیر نیتریت در استخرهای مجاور کانال C4



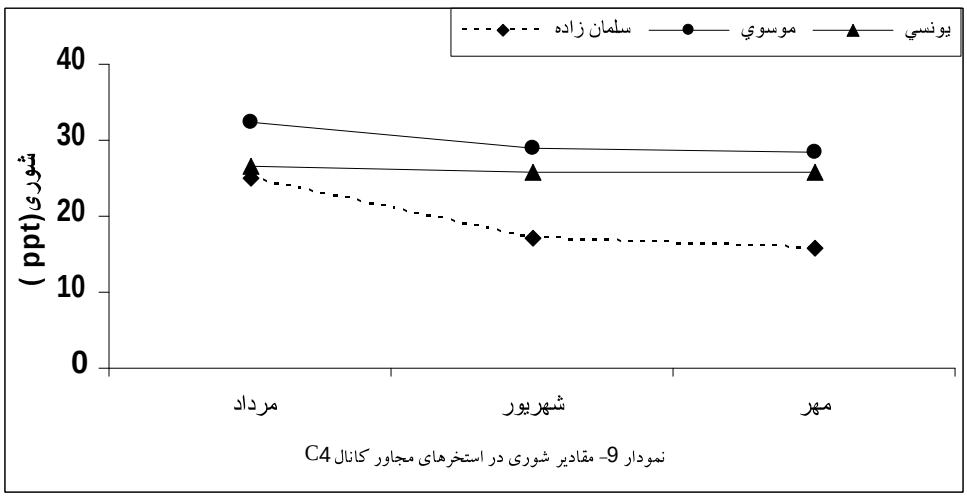
نمودار 6- مقادیر آمونیاک در استخرهای مجاور کانال C4



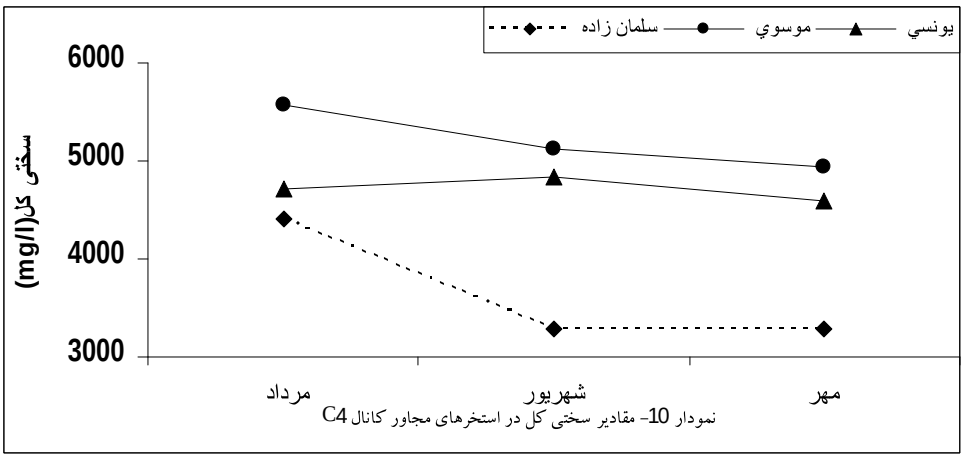
نمودار 7- مقادیر کدورت در استخرهای مجاور کانال C4



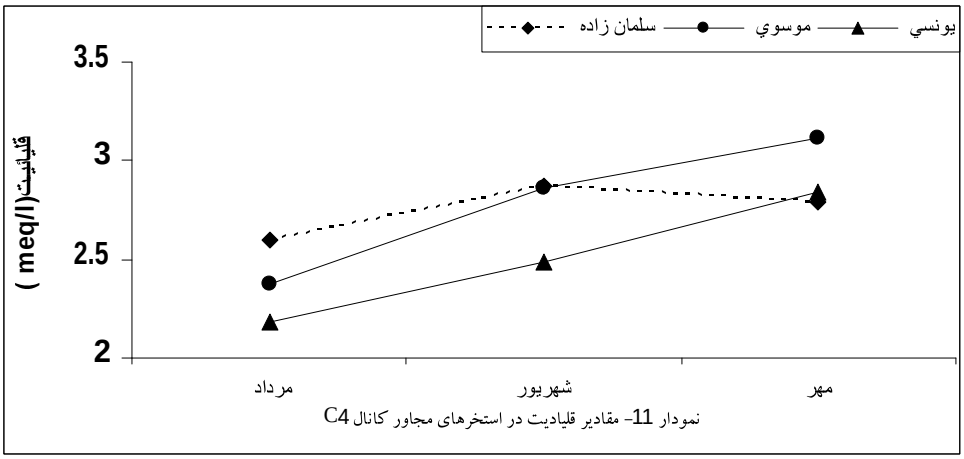
نمودار 8- مقادیر TSS در استخرهای مجاور کانال C4



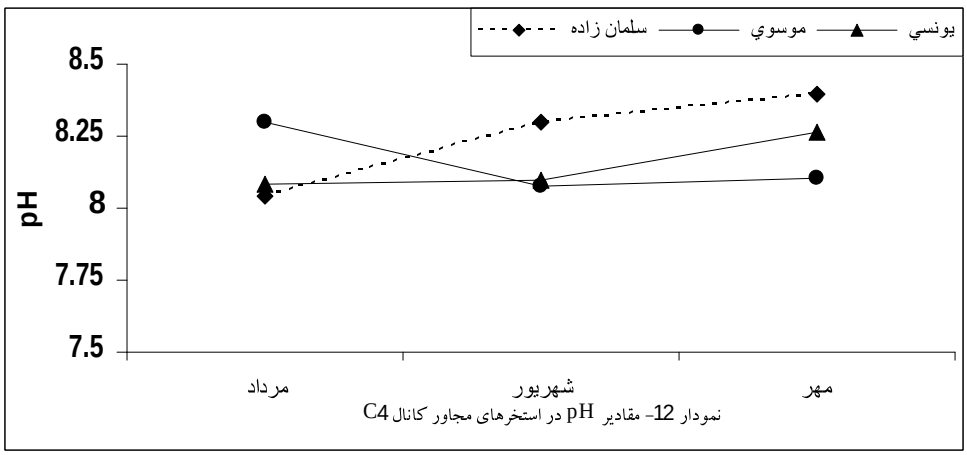
نمودار 9- مقادیر شوری در استخرهای مجاور کانال C4



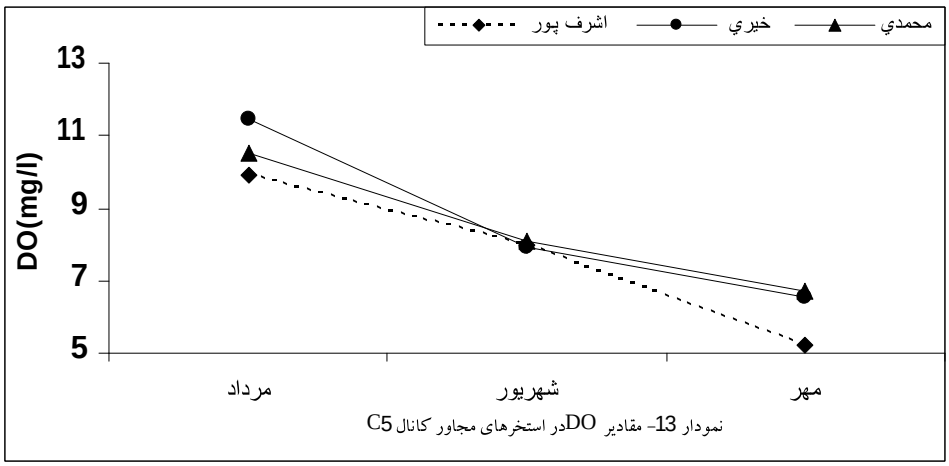
نمودار 10- مقادیر سختی کل در استخرهای مجاور کانال C4



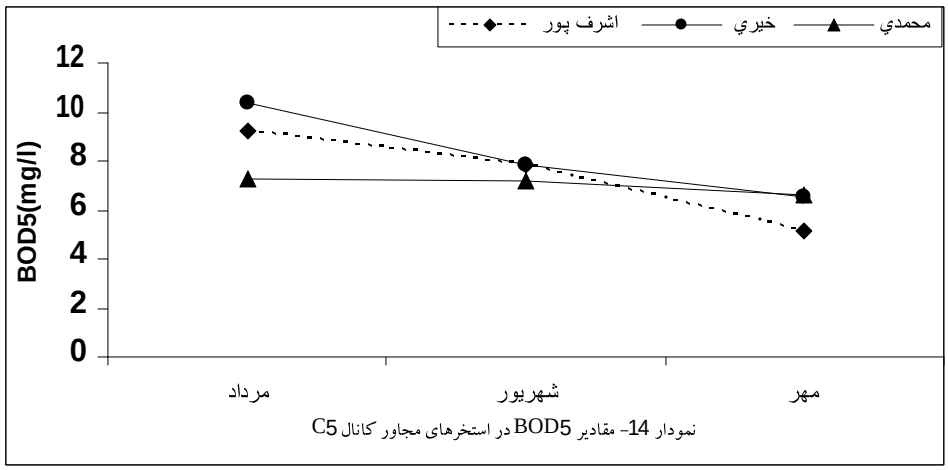
نمودار 11- مقادیر قلیادیت در استخرهای مجاور کانال C4



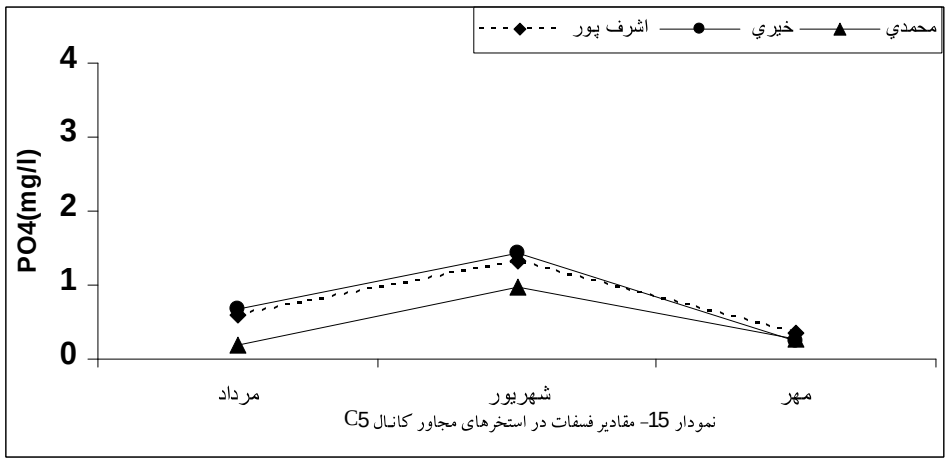
نمودار 12- مقادیر pH در استخرهای مجاور کانال C4



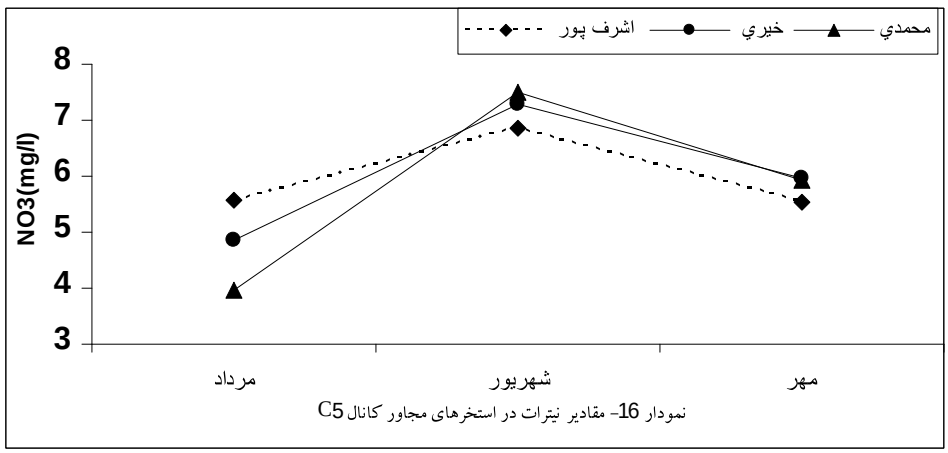
نمودار 13- مقادیر DOدر استخرهای مجاور کانال C5



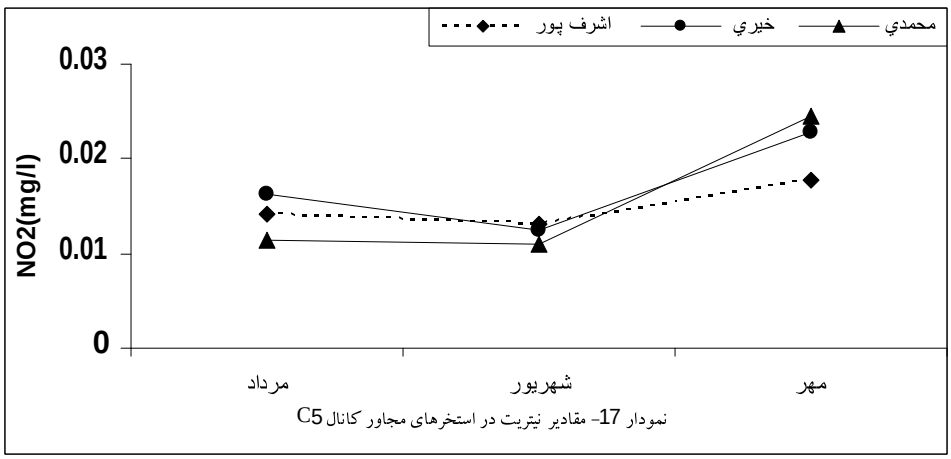
نمودار 14- مقادیر BOD5 در استخرهای مجاور کانال C5



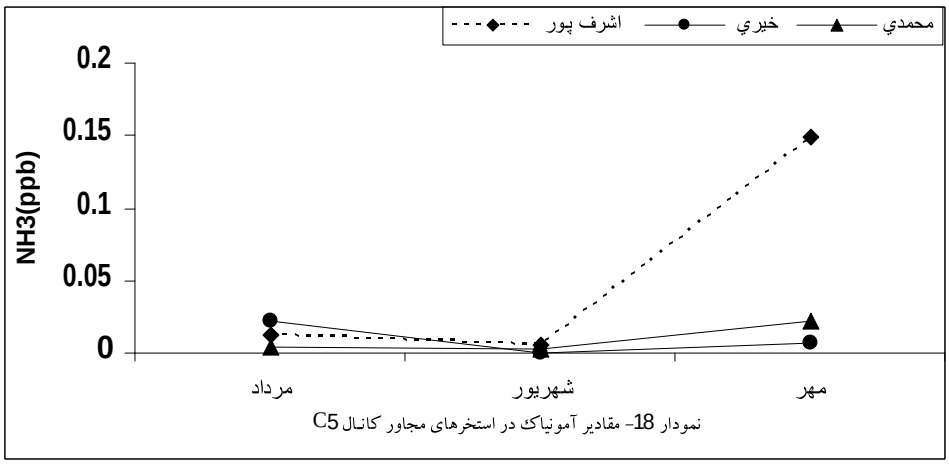
نمودار 15- مقادیر فسفات در استخرهای مجاور کانال C5



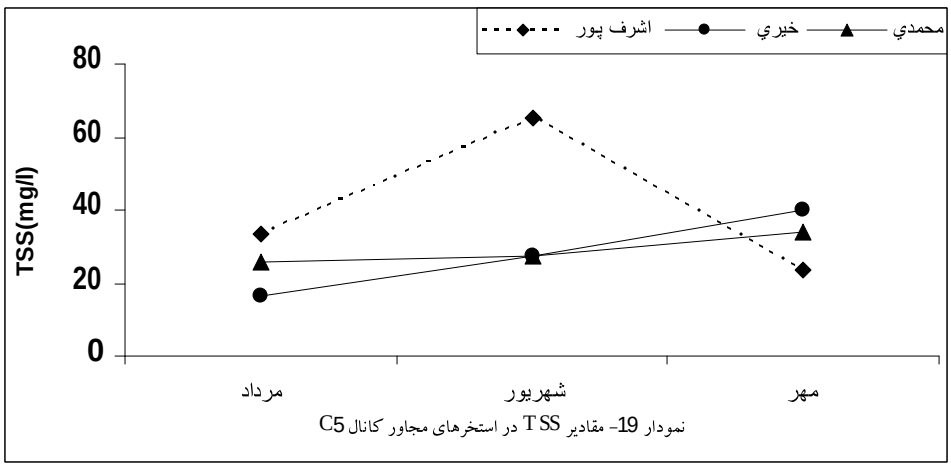
نمودار 16- مقادیر نیترات در استخرهای مجاور کانال C5



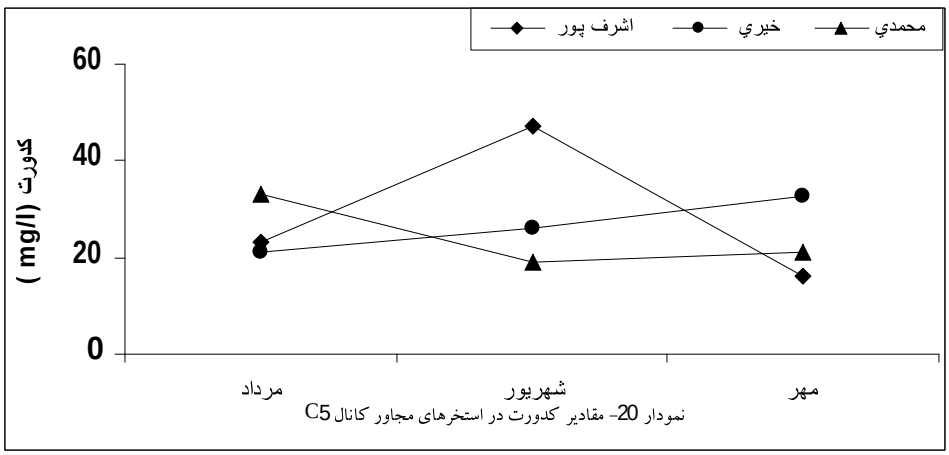
نمودار 17- مقادیر نیتریت در استخرهای مجاور کانال C5



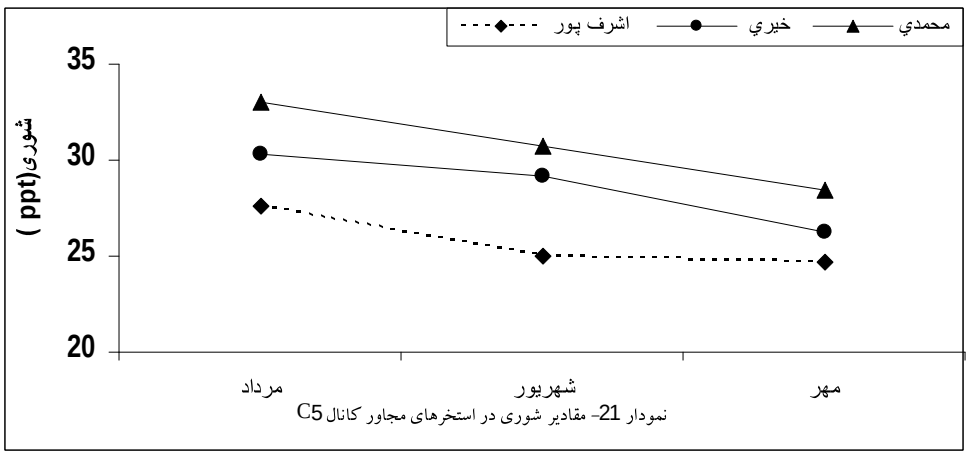
نمودار 18- مقادیر آمونیاک در استخرهای مجاور کانال C5



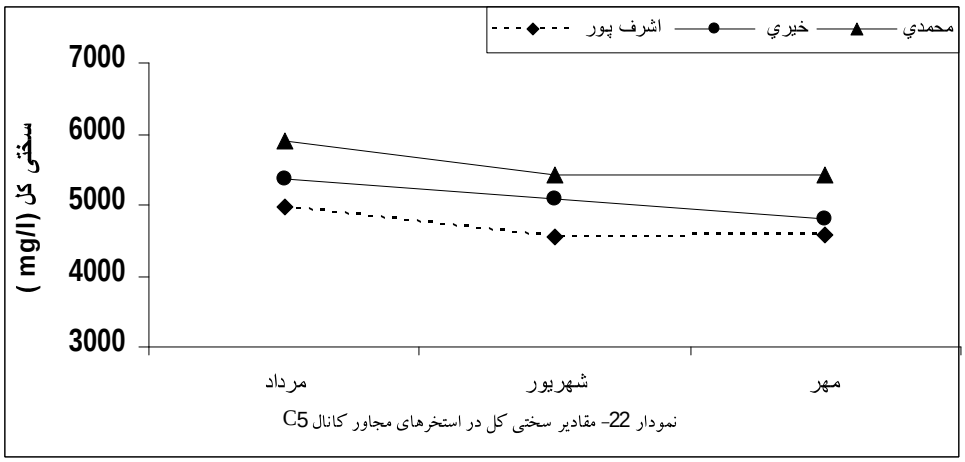
نمودار 19- مقادیر TSS در استخرهای مجاور کانال C5



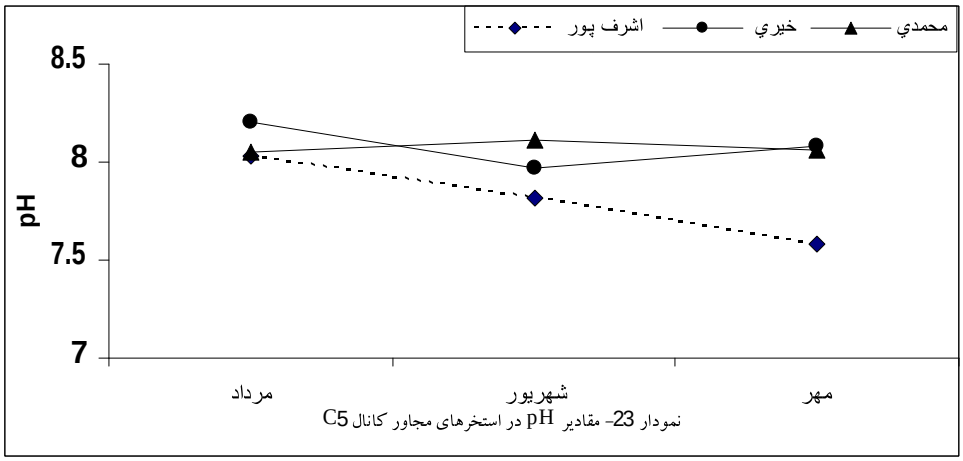
نمودار 20- مقادیر کدورت در استخرهای مجاور کانال C5



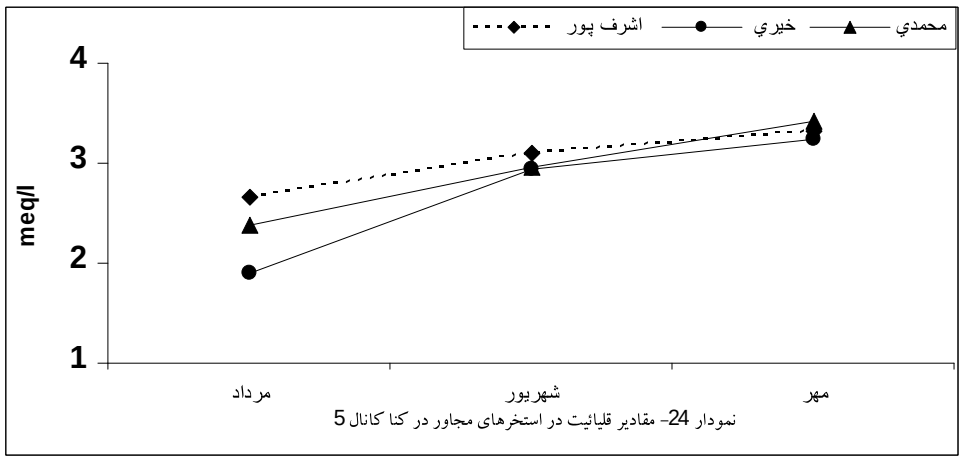
نمودار 21- مقادیر شوری در استخرهای مجاور کانال C5



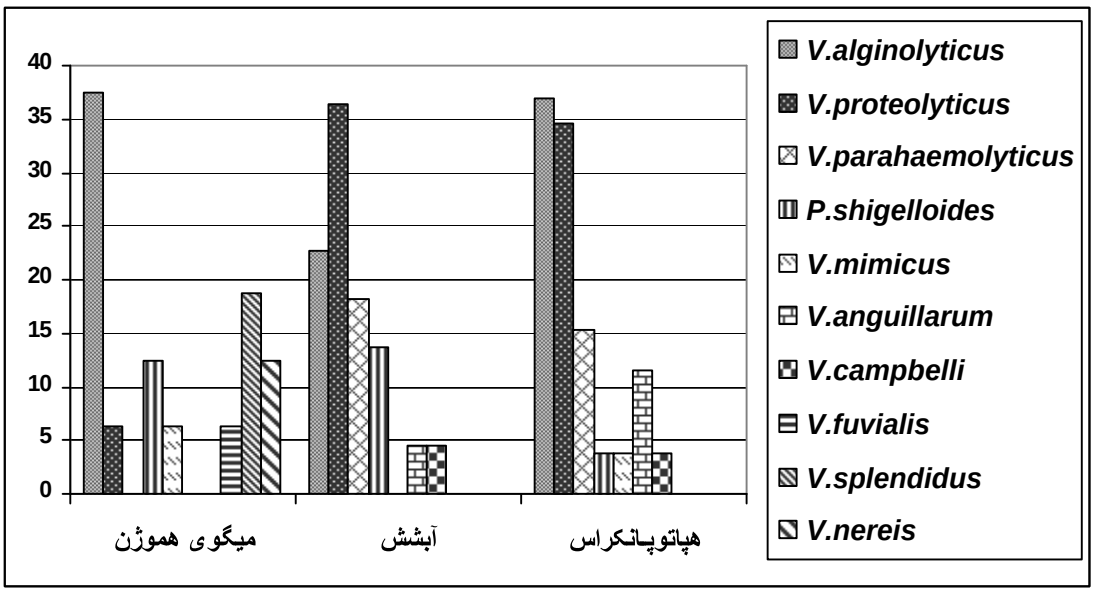
نمودار 22- مقادیر سختی کل در استخرهای مجاور کانال C5



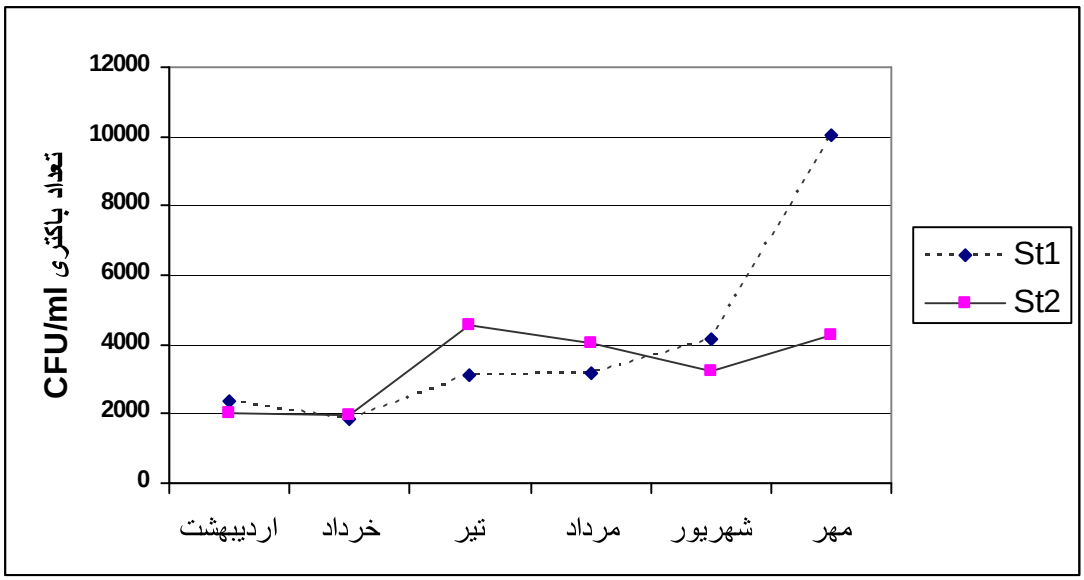
نمودار 23- مقادیر pH در استخرهای مجاور کانال C5



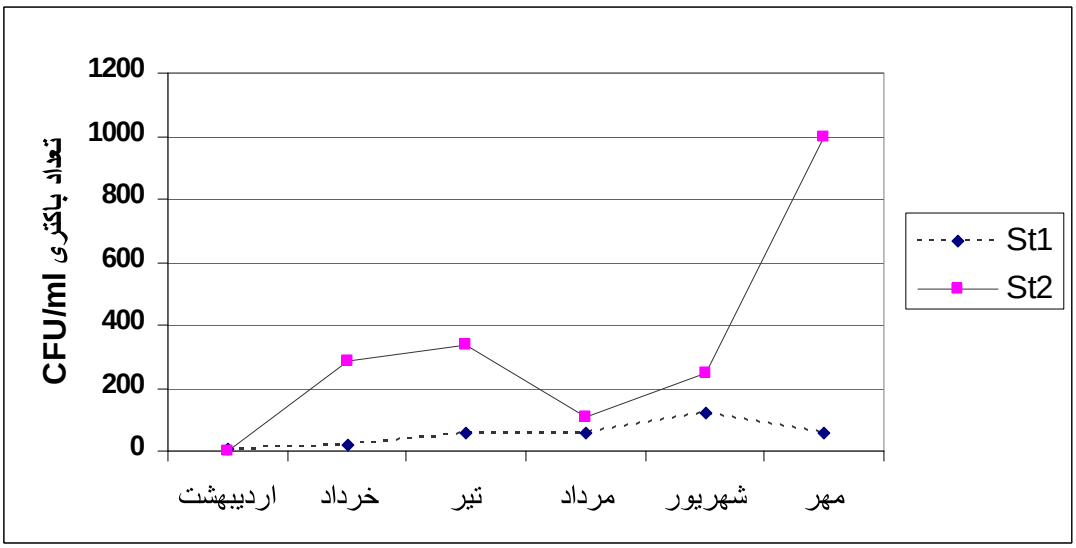
نمودار 24- مقادیر قلیائیت در استخرهای مجاور در کنا کانال 5



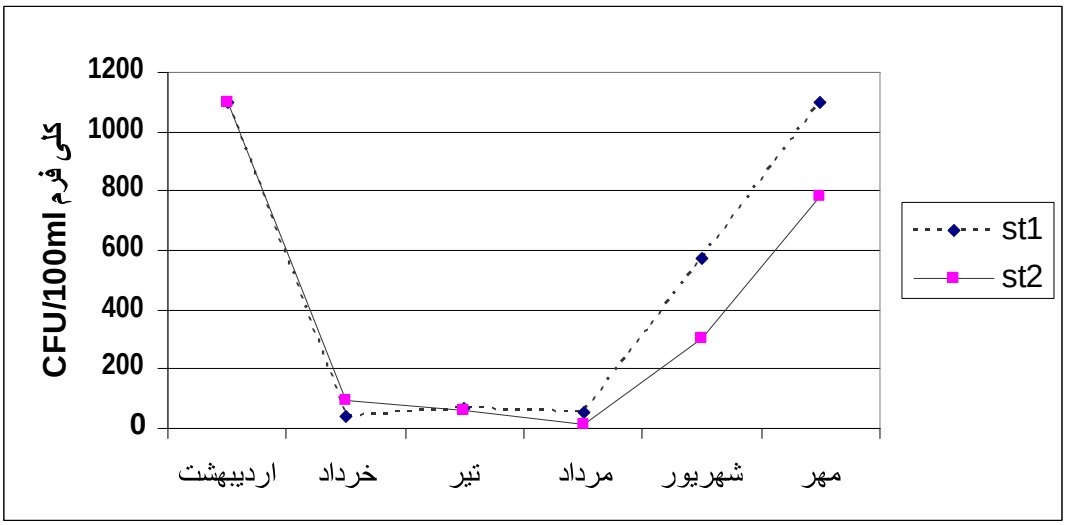
نمودار ۲۵- مقایسه فراوانی (درصد) گونه های باکتریایی جداشده از اندامهای مختلف میگو



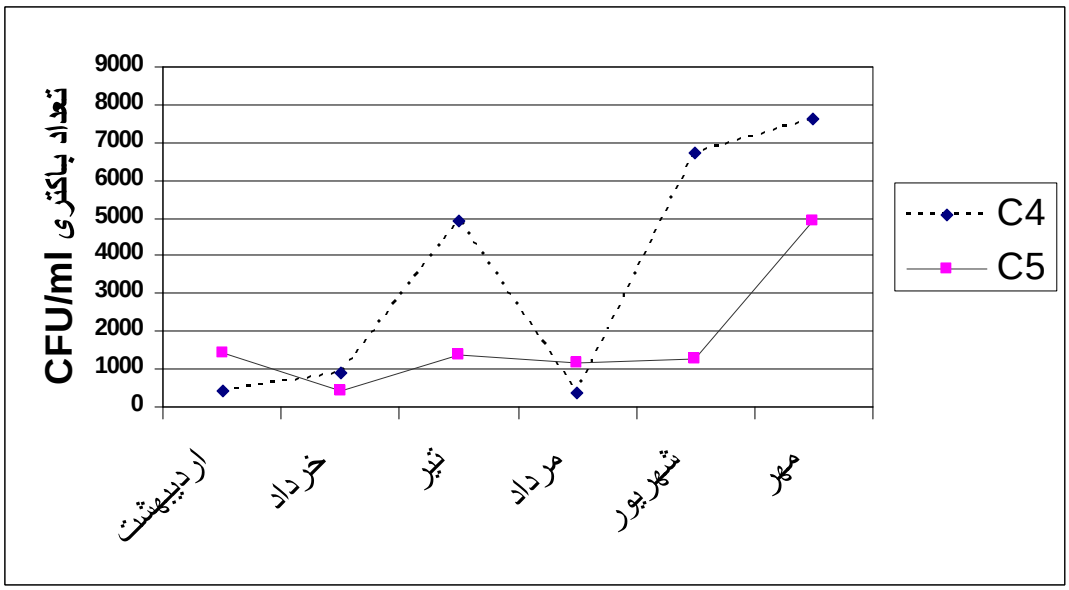
نمودار ۲۶- مقایسه تعداد کل باکتری در دو ایستگاه بهمنشیر در ماههای نمونه برداری



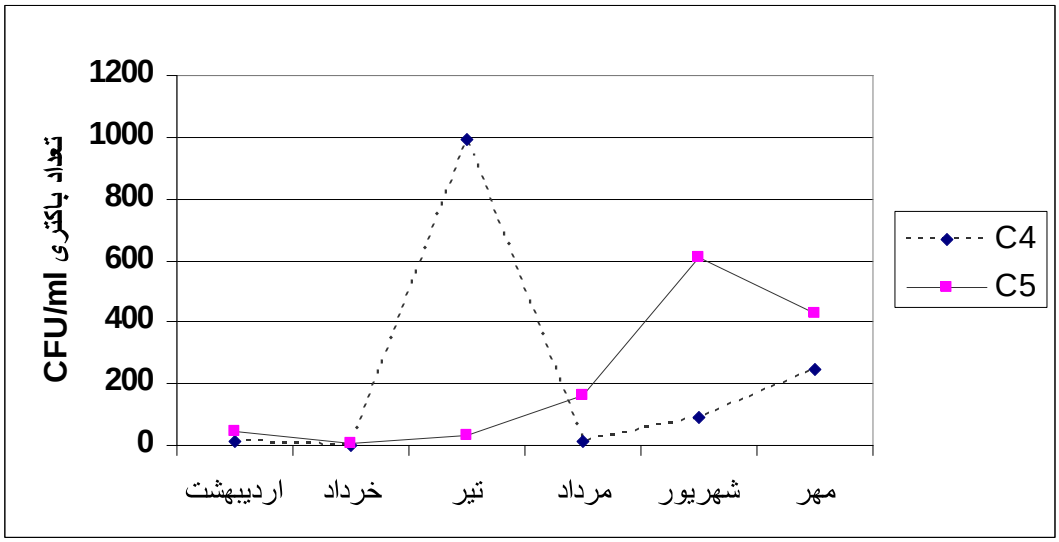
نمودار ۲۷- مقایسه تعداد کل ویبریو در دو ایستگاه بهمنشیر در ماههای نمونه برداری



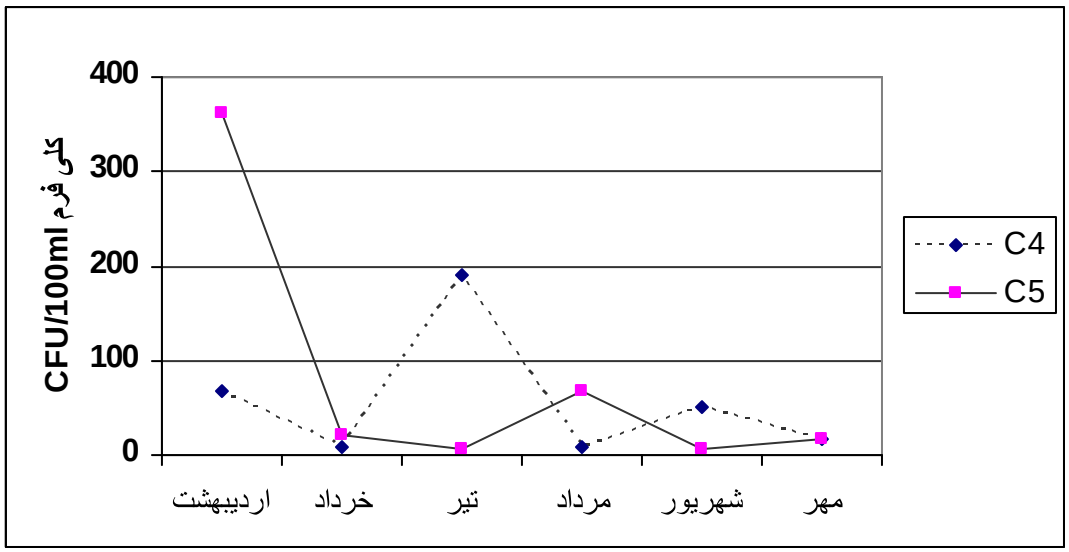
نمودار ۲۸- مقایسه تعداد کلی فرم در دو ایستگاه بهمنشیر در ماههای نمونه برداری



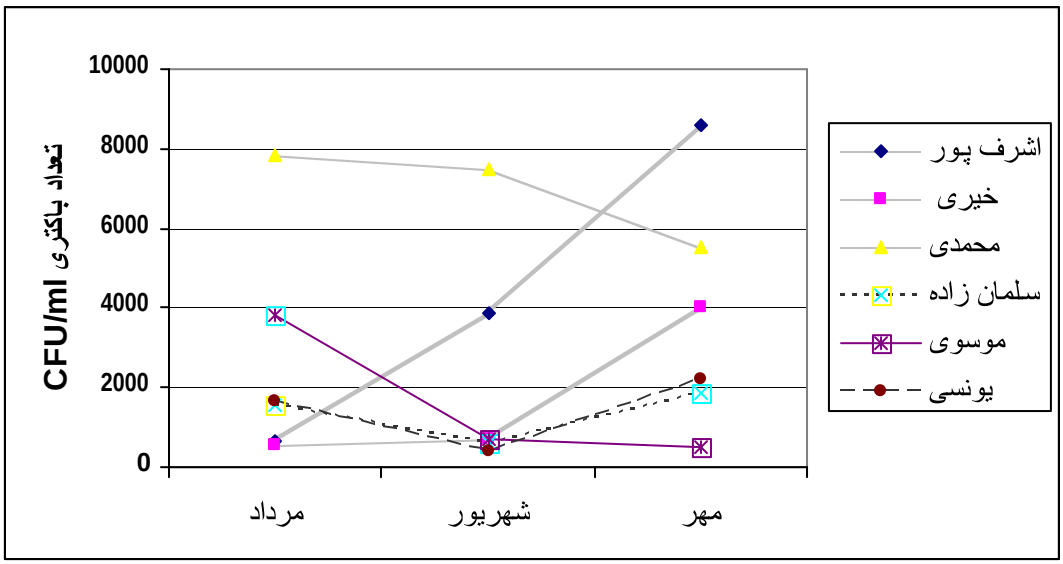
نمودار ۲۹- مقایسه تعداد کل باکتری در کانال های آبرسان در ماههای نمونه برداری



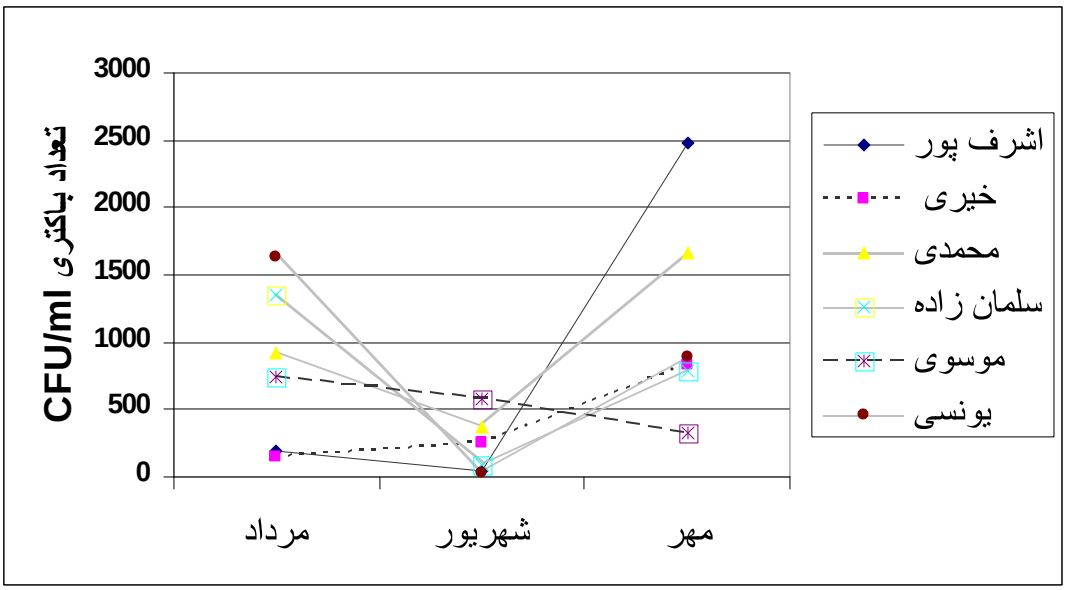
نمودار ۳۰- مقایسه تعداد کل ویبریو در کانال های آبرسان در ماههای نمونه برداری



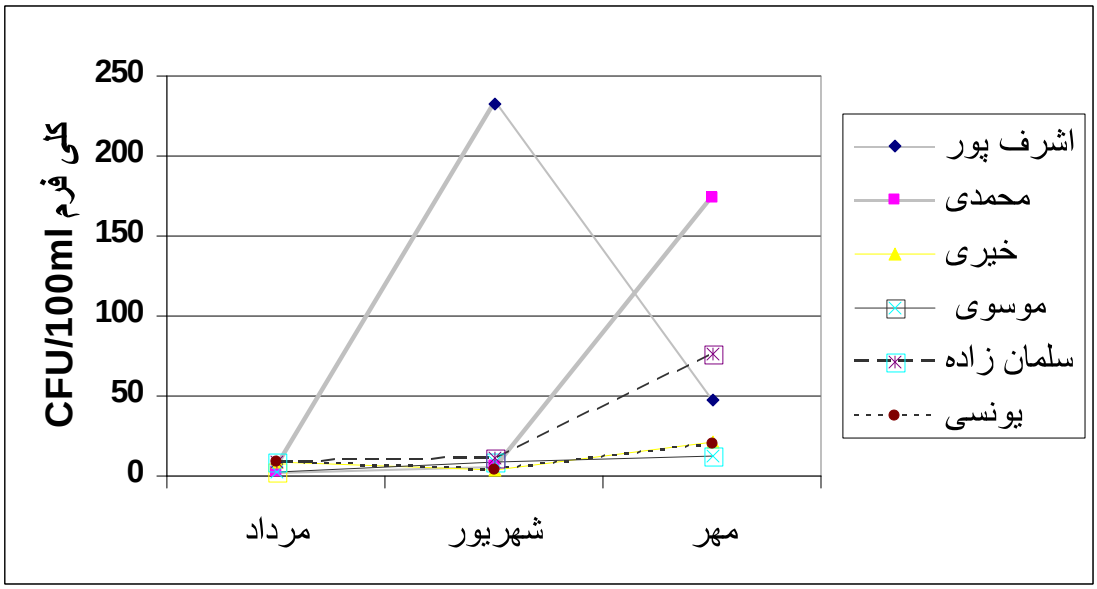
نمودار ۳۱- مقایسه تعداد کلی فرم در کانال های آبرسان در ماههای نمونه برداری



نمودار ۳۲- مقایسه تعداد کل باکتری در استخرهای پرورشی در ماههای نمونه برداری



نمودار ۳۳- مقایسه تعداد کل ویبریو در استخرهای پرورشی در ماههای نمونه برداری



نمودار ۳٤- مقایسه تعداد کلی فرم در استخرهای پرورشی در ماههای نمونه برداری

Abstract:
The introduction of *L. vannamei* to Iran from Hawaii was initiated when high mortality occurred in shrimp farms of Abadan in 2002 then in Bushehr during summer of 2004 .
Inspection of *L. vannamei* for infectious agents (Bacteria , virus , fungi and parasite) , determine total plate count and total vibrio in Bahmanshir Rivers, shrimps and farms water , examination physicochemical factors of farms water , Identification of carriers of wssv in wild shrimp and crabs , the main objectives of this study , which was held in 2007 .
540 shrimp samples (pl12 – pl15) and subadults were collected from different shrimp farms in khouzestan province and then check for identity bacteria , fungi and parasite . Also 280 samples of *L. vannamei*
, wild shrimps (*Metapenaeus affinis* , *Exopalaemon styliferus*) and crabs (*Grapsus* sp .and *Sesarma* sp.) were Collected from Bahmanshir river for virology studies by PCR procedure (Iq2000 kit WSSV , IHHNV , TSV) .
120 samples of *L. vannamei* for histopathology had been collected randomly and preserved in Davidsons fixation and then transferred to 75% ethyl alcohol for storage . (Hepatopancreas – gills) .
Physicochemical parameters of water in culture ponds comprising of pH DO , BOD , NO3 , NO2 , salinity . total . hardness and NH3 were measured all over culture period for 340 times .
Finally it has been detected 10 genus and species of bacteria consisting of
V . alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. proteolyticus , plesiomonas shigelloides ; 6 genus and species of fungi specially *Aspergilus niger* , *Asp.fumigatus* and *Asp.flavus* and two genus of parasites *vorticella sp.* And *Zoothamnium sp*. were isolated .
Crab (*Sesarma sp*.) were tested by using Iq2000 diagnostic kit for WSSV that positive for WSSV. There was a positive result (three viruses TSV , IHHNV and WSSV) for postlarvae and subadults of *L.vannamei* by using Iq2000 kit and IFRO kit (Internal kit).
Histopathological studies have shown inclusion bodies of TSV , WSSV , IHHNV , MBV and HPV in various tissues. Results demonstrated the mean of vibrio count ($0 . 01\times10^3$- 1.96×10^3) and tolal plate count ($0 .21 \times10^3$- 14.25×10^3).
physicochemical parameters of water were measured as follows : salinity (12.3 – 22.5 ppt).BOD_5 (1.98 – 10.21 ppm) , DO (3.17 – 11.25 ppm) , NH3(0.02 – 3.45 ppm) and temperature (20 – 31. 5 c) .
Keywords : *L.vannamei* , bacteria , virus , fungi , parasite – Histo pathology - physicochemical parameters of water- Abadan – khouzestan province .

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.