View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده میگوی کشور

عنوان :

پایش عوامل میکروبی آب (باکتری، ویروس و قارچ) در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

مجری:
بابک قائدنیا

شماره ثبت
۵۰۵۹۶

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه : پایش عوامل میکروبی آب (باکتری، ویروس و قارچ) در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

شماره مصوب پروژه : K۹۱۰۱-۹۱۰۰۱-۹۱۰۴-۱۲-۸۰-۱۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : بابک قائدنیا

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : بابک قائدنیا

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عیسی کشتکار، محمدعلی نظاری ، عصمت محمدی باغملایی ،سهیلا امیدی ، پریسا حسین خضری، عبدالرسول مرزبانی، صمد راستی امامزاده، محسن اردشیری، سید جلیل ذریه زهرا، محمد افشارنسب، مریم میربخش، عقیل دشتیان‌نسب، محمد خلیل پذیر، شکرالله فرخ بین، عبد الحمید ماهیانه، رضا بنادرخشان

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان بوشهر

تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱

مدت اجرا : ۲ سال و ۴ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵

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

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : پایش عوامل میکروبی آب (باکتری، ویروس و قارچ) در تولید میگوی عاری از بیماری خاص

کد مصوب : K۹۱۰۱-۹۱۰۰۱-۹۱۰۴-۱۲-۸۰-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۵۹۶ تاریخ : ۹۵/۸/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای بابک قائدنیا دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته قارچ‌شناسی دامپزشکی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۵/۶/۳۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص ۷
۱-۲- تعریف میگوی عاری از بیماری خاص ۷
۱-۳- مهمترین پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد ۸
۱-۳-۱- خصوصیات پاتوژن های باکتریایی ۱۰
۱-۳-۲- بیماری ویبریوزیس (Vibriosis) ۱۱
۱-۳-۳- بیماری نکروز عفونی پانکراس (Necrotizing Hepatopancreatitis, NHP) ۱۴
۱-۳-۴- عفونت‌های ریکتزیایی (Ricketsial infection) ۱۶
۱-۳-۵- بیماری سل میگو (Shrimp Tuberculosis) ۱۷
۱-۴- فرضیه ۱۸
۱-۵- اهداف تحقیق ۱۸
۱-۶- مروری بر منابع ۱۸
۱-۶-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص در آمریکا و آسیا ۱۸
۱-۶-۲- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی در داخل کشور ۲۰
۱-۶-۳- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی در خارج از کشور ۲۱
۲- مواد و روشها ۲۳
۲-۱- تجهیزات مورد نیاز ۲۳
۲-۲- محل اجرا ۲۳
۲-۳- تعیین جمعیت های اولیه برای تولید میگوی مولد عاری از بیماری خاص ۲۵
۲-۴- روش شمارش و جداسازی باکتری های خانواده ویبریوناسه و باکتری های هوازی- بی هوازی اختیاری ۲۵
۲-۵- مطالعات موردی ۲۸
۳- نتایج ۲۹
۳-۱- نتایج مطالعات موردی ۴۰
۳-۲- بررسی علت تلفات میگوها در فروردین ۴۲
۴- بحث و نتیجه گیری ۴۴
پیشنهادها ۴۵
منابع ۴۶
چکیده انگلیسی ۴۸

چکیده

پرورش میگو به عنوان یکی از فعالیتهای مهم آبزی‌پروری در جهان و ایران در حال توسعه و گسترش می‌باشد. باکتری‌ها و قارچ‌ها از رایجترین عوامل عفونی ایجاد کننده بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگوی می‌باشند. از مهمترین باکتریهای ایجاد کننده بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگو، باکتریهای خانواده ویبریوناسه می باشند. از قارچ‌های شناسایی شده نیز می توان به قارچ‌های *فوزاریوم*، *موکور*، *کلادوسپوریوم*، *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلوم* و مخمرها اشاره کرد. در این پروژه از یک سیستم تامین آب کنترل شدهٔ برای پرورش و تکثیر میگوها استفاده شد. هدف از این اقدام، کنترل و تثبیت کیفیت آب در طول دوره پرورش و در تمامی بخش‌ها بود. این سیستم به عنوان یک عامل استقرار امنیت زیستی عمل می‌کرد. آب ورودی قبل از استفاده در پایلوت از نظر مجموع بار باکتری و قارچ و همچنین تعداد باکتریهای خانواده ویبریوناسه، هر ۱۵ روز یک‌بار مورد پایش قرار گرفت. در صورت آلودگی بیش از حد قابل انتظار، انجام آزمایشهای تکمیلی در دستور کار قرار می‌گرفت و تیمارهای لازم برای بهبود کیفیت آب انجام شد. در نهایت آب، پس از استفاده در سیستم تکثیر و پرورش و پس از گذشتن از سیستم فیلتراسیون به خارج از مجموعه هدایت می‌گردید.

کلمات کلیدی: میگوی عاری از بیماری خاص،SPF ، عوامل بیماری‌زای باکتریایی، عوامل بیماری‌زای قارچی، کیفیت آب سیستم های تکثیر و پرورش میگو

۱-مقدمه

در دو دهه اخیر، بیماری به یک معضل اساسی در صنعت پرورش میگـوی تبـدیل شـده اسـت. بـه ویـژه از زمـان ظهور بیماری لکه سفید، تولید میگو به میزان معنی داری در بسیاری از کشـورها از جملـه ایـران کـاهش یافـت و ادامه این صنعت با دشواری های زیادی مواجه شد. نتیجه آن ضربه به اقتصاد، بویژه تاثیر قابل توجه بر اقتصاد ملی و وضع معیشت بخشی از جمعیت فقیر و دهک های پایین جامعه بود. به عنوان مثال صـادرات میگـو در اکـوادور در دسامبر ۱۹۹۹ به سطحی پایین تر از سال ۱۹۸۵ رسید. برای مقابله با چنین شرایطی همکاری و مراقبـت مناسـب و به هنگام مورد نیاز بود. چنین مراقبتی به توسعه ایمن صنعت پرورش میگو، ایجاد درآمد ملی از طریق بازرگانی در این حوزه (چه در سطح منطقه ای و چه در سـطح بـین المللـی) و بهبـود معیشـت مزرعـه‌داران و دیگـر دسـت اندرکاران این بخش کمک کرد.

زمانیکه الگوهای شیوع بیماری‌هـا و عوامـل بیمـاری زای میگـو مـورد بررسـی قـرار گرفـت، خصوصـاً در مـورد پاتوژن‌های ویروسی، دلایل قانع کننده‌ای بدست آمد کـه شـیوع اغلـب بیمـاری‌هـای مهـم، مـرتبط بـا جابجـایی میگوی زنده (شامل مولد، ناپلی و پست لارو) است. برای پرورش بسیار مهم است که در جابجایی ذخایر میگوی زنده در سطح منطقه‌ای و بین المللی بسیار محتاطانه و هوشیارانه عمل کنـیم. ایـن احتیـاط حتـی در مـورد ذخـایر میگوی اهلی و پرورش تک گونه‌ای میگو در مکان های مختلف باید رعایت شود.

درک ما از راه‌ها و گزینه‌های کنترل بیماری‌های میگو، طی چند سال گذشته عمدتاً از طریق آزمایش‌های انجـام شده در آسیا و امریکای لاتین ارتقاء یافته است. راه حل نهایی برای مبارزه با معضل بیماری ها در میگو، پرورش تضمینی میگوهای اهلی شده با مواد مغذی و جیره خشـک عـاری از عوامـل بیمـاری‌زای خـاص در سیسـتم‌هـای دارای الزامات ایمنی زیستی و تحت شرایطی عاری از هر گونه استرس است.

ساده‌ترین راه برای حل مشکل کیفیت پست لارو، جایگزینی استفاده از پست لاروهای حاصل از مولدین وحشی با پست لاروهای حاصل از مولدین اهلی است. به هر حال این روش نیازمنـد تـلاش تحقیقـاتی بیشـتر و مطالعـات میدانی دقیق تری است و هنوز در ابتدای راه است.

مدیریت وحفظ کیفیت آب در استخرهای پرورش میگو و همچنین مدیریت غذا و غذادهی بـه طـور گسـترده‌ای به هم وابسته و دارای اثرات متقابل بوده و در تولید پایدار میگوی پرورشی و در آمـدزایی آن نقـش اساسـی ایفـا می‌نمایند. گام نخست در موفقیت پرورش آبزیان به مدیریت بهداشتی آن بستگی دارد. در پرورش میگو بهترین، آسانترین وکم‌هزینه ترین روش برای پیشگیری از بیماری ها، انتخاب محل مناسب، آماده‌سازی صحیح اسـتخر و پایش و بهبود کیفیت آب است. انتقال بسیاری از عوامل بیماریزا از طریق آب انجام می گیرد، بنابراین تأمین آب عاری از این عوامل، مهمترین راهکار در جلوگیری از ورود عوامل بیماریزا به سیسـتم‌هـای پـرورش آبزیـان مـی باشد. این مهم در فرآیند تولید میگوی عاری از بیماریهای خاص، اهمیت ویژه‌ای می‌یابـد. لایتنـر مـوارد کلیـدی زیر را برای جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا به سیستم هـای پـرورش میگـو فهرسـت کـرده اسـت، ۱) کنتـرل

میگوی پرورشی ۲) شناسایی و فهرست کردن عوامل بیماری زای قابل کنترل ۳) فراهم کردن روش‌ها و امکانات تشخیص عوامل بیماری زا ۴) کافی بودن کنترل‌های محیطی برای جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا ۵) اقدام‌های مدیریتی برای اطمینان از اجرای همیشگی سیاست های پیشگیرانه از ورود عوامل بیماری‌زا ۶) ضدعفونی کردن و استفاده از روش‌های حذف عوامل بیماری‌زا، برای جلوگیری از شیوع آنها.

از دهه ۱۹۷۰ صنعت پرورش میگو به صورت فوق العاده‌ای گسترش یافته است به طوریکه میزان تولید میگوی پرورشی در حال حاضردر حدود سه میلیون تن است که این میزان یک دوم از کل مقدار میگویی است که در جهان عرضه و تامین می شود(FAO 2008). علیرغم این گسترش سریع در خلال سالهای اخیر کشور های تولید کننده میگو تجارب تلخ فراوانی را ناشی ازشیوع بیماری های ویروسی تجربه کرده‌اند (chamberlain,1999). تاکنون بیش از ۲۰ ویروس مختلف در میگوها شناسائی شده است که سالانه خسارت هنگفتی بر جای می گذارند. خسارات اقتصادی ناشی از بیماری های آبزیان در جهان از مهمترین چالش‌های فرآروی کشورهای پیشگام در عرصه آبزی پروری بوده و تبعات سیاسی، اقتصادی و اجتماعی ناشی از آن بحران‌های جدی ایجاد کرده است. روند توسعهٔ آبزی پروری در کشور و عدم توجه کافی به زیر ساخت‌های مدیریت بهداشتی این صنعت در گذشته، زمینه ساز بروز آسیب های جدی در مقاطع زمانی حال و آینده شده است، بگونه ای که هر از چندگاه شاهد بروز همه گیری های متعددی در مزارع تکثیر و پرورش آبزیان کشور می باشیم. وقوع همه گیری بیماری ویروسی لکه سفید (WSD) در مزارع پرورش میگوی استانهای خوزستان، بوشهر، سیستان و بلوچستان موجب تحمیل میلیاردها ریال خسارت مستقیم به پرورش دهندگان میگو (بدون احتساب خسارات وارده به صنایع جانبی مانند مراکز فرآوری ، کارخانه های تولید خوراک آبزیان و ...) گردیده و بحران های ناشی از آن تا مدتها گریبانگیر دست اندرکاران این صنعت خواهد بود. این در حالی است که تزاید نابسامانی‌های موجود، شیوع همه گیری های مختلف در کشورهای همجوار و منابع آبی منطقه و نیز خلاء قوانین و مقررات قانونی موثر و فقدان سیستم مدیریت بهداشتی منسجم ، زمینه حضور سایرعوامل بیماری‌زای خطرناک و شیوع همه‌گیری‌های مختلف در سایر مناطق کشور را نیز فراهم کرده است.

مهمترین عوامل بیماری‌زای اخطارکردنی میگوهای پرورشی در جهان، ویروس‌ها می‌باشند. در حال حاضر بیش از بیست ویروس که در میگوهای خانواده پنائیده بیماریهای مهلک و مرگ و میر شدید ایجاد می نمایند، شناسایی شده است. بیماریهایی نظیر سندرم تورا (TS)، سندرم لکه سفید (WSS)، کله زرد (YHD) و نکروزعفونی بافتهای زیر پوستی و خونساز (IHHN) را میتوان مهمترین تهدید برای صنعت تکثیر و پرورش میگو درجهان محسوب نمود

در باکتری‌ها جنس ویبریو بدلایل مختلفی اهمیت دارد. همانطور که گفته شد برخی از ویبریوها برای میگو بیماریزا هستند. برخی دیگر برای سایر آبزیان بیماریزا می باشند. بسیاری از ویبریوها در آب دریا زیست

می‌نمایند و فلور طبیعی آب و دستگاه گوارش آبزیان شناخته می شوند و بدون ایجاد بیماری بر روی سطح آبشش‌ها و در دستگاه گوارش آبزیان به حیات خود ادامه می‌دهند.

عوامل قارچی بیماری‌زای میگو را می توان به دو گروه عمده تقسیم کرد:

گروه اول شامل عوامل قارچی در شاخه اوومیست‌ها و گروه دیگر شامل قارچ های حقیقی از شاخه اسکومایست‌ها است. قارچ‌های متعلق به شاخه اوومیست‌ها، در مراحل لاروی میگوهای پرورشی مشکل ساز بوده در حالی که عوامل مربوط به شاخه اسکومایست‌ها فرصت‌طلب هستند و بیشتر در استخرهای پرورشی که شرایط مناسبی ندارند، یافت می‌شوند.

اغلب قارچ‌هایی که موجب بروز بیماری عفونت قارچی لاروی می‌شوند، انگل گیاهان محسوب بوده و اجداد جلبک‌ها محسوب می‌شوند. یکی از شناخته‌شده‌ترین قارچ‌های بیماری‌زا در مراحل لاروی میگو، *لاژینیدیوم کالینکتس* و گونه‌های *سیرولپیدیوم* می‌باشد که می‌توانند تلفات زیادی در مراحل اولیه لاروی ایجاد نمایند. گونه‌های مورد اشاره، بطور نامحدود رشد کرده و هایف‌های آنها در بافت‌های بدن لاروها گسترش می‌یابد تا به طور کامل لارو را بپوشاند. در این زمان، اسپورزایی در درون بدن میگو، تشکیل لوله‌های ترشحی و در نهایت آزادسازی زئوسپورها شروع می‌شود. تخم‌ها ، لاروها و پست لاروهای آلوده، ضعیف و دارای ظاهری سفید رنگ و کدر بوده و ممکن است در طی ۱ یا ۲ روز تلف شوند (مجدی نسب، ۱۳۷۶).

فوزاریوم سولانی (*Fusarium solani*) عامل بیماری مایکوز بزرگسالی، یک قارچ فرصت‌طلب است که به راحتی در بافت‌های آسیب دیده استقرار یافته و موجب عفونت می‌شود. این فارچ در خاک و مواد درحال تجزیه وجود داشته و پراکندگی جغرافیایی وسیعی دارد و حتی از اعماق گل و لای دریاچه‌ها و منابع آبی دریایی نیز جدا شده است. این قارچ در آب‌های شیرین، لب شور و شور وجود دارد. قارچ عامل بیماری در ضایعات جلدی وارد شده و پس از نفوذ به بافت میزبان، موجب بروز پاسخ‌های التهابی می گردد که اغلب منجر به ملانیزه شدن گسترده در آبشش‌ها و قاعده‌ی ضمائم و کوتیکول می‌شود. عفونت فوزاریومی معمولا باعث مرگ و میر نمی‌شود ولی میگوهای مبتلا به دلیل ظاهر ملانیزه و تیره‌رنگشان غیرقابل مصرف بوده و حذف می‌شوند. همه‌ی میگوهای پنائیده میزبان این قارچ شناخته می‌شوند. مرحله عفونی در میگو، مرحله جوانی و بزرگسالی است و میگوی سفید غربی(*Litopenaeus vannamei*) حساسیت متوسط به این بیماری دارد (مجدی نسب، ۱۳۷۶ و حسین خضری ۱۳۸۳).

مقوله بهداشت و بیماریهای میگو یکی از چالشهای اساسی صنعت میگو پروری است، به طوریکه در اواخر دهه ۸۰، شیوع این بیماریها در چین باعث شد که سهم این کشور در تولید آسیا از ۲۱٪ در سال ۱۹۸۷ به ۴٪ در سال ۱۹۸۹ برسد. در دهه ۹۰ وقایع مشابهی در تایلند، چین، هند، کامبوج و بنگلادش روی داده و خسارات اقتصادی سنگینی به این کشورها وارد شد. به عنوان مثال با اینکه تایلند پیشگام تولید میگوی ببری سیاه در جهان محسوب می‌شود، تنها خسارت ناشی از بیماری ویروسی کله زرد (Y.H.D) در این کشور در سال ۱۹۹۲ بالغ بر۶ میلیون

دلار بوده است. در اواخر دهه ۸۰ میلادی ویروس IHHN چنان خسارات سنگینی بر ذخایر میگوی *Penaeus stylirostaris* در آمریکای جنوبی و مرکزی (از پرو تا مکزیک) وارد ساخته که باعث نابودی تقریبی این میگو شده است و کشورهای مورد اشاره را وادار کرده تا برای احیای ذخایر، مولدین را از سایر نقاط دنیا وارد کنند کشور فیلیپین نیز با مشکل بیماریهای لکه سفید (WSD)، کله زرد و باکتریهای درخشان (*ویبریو هاروی*) مواجه بوده و سالانه خسارات سنگینی از این بابت متحمل می‌شود. در بنگلادش تلفات ناشی از اپیدمیهای ویبریوزیس و لکه سفید به طور معمول ۱۰٪-۳٪ است واین تلفات در سال ۱۹۹۴ به ۷۰٪-۵۰٪ رسید و در سال ۱۹۹۷ اتحادیه اروپا واردات میگو از این کشور ممنوع کرد و این کشور میلیون‌ها دلار متضرر شد. در سال ۱۹۹۶ کشور هند از بیماری لکه سفید در میگوهای ببری سیاه و سفید هندی ۱/۵ میلیارد دلار خسارت دید. در سالهای ۱۹۹۲ تا ۲۰۰۱ کشورهای شرق آسیا به دلیل شیوع بیماری لکه سفید (WSD) بیش از ۶-۴ میلیارد دلار متضرر شدند؛ همچنین کشورهای آمریکایی پس از بروز بیماری لکه سفید از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۱ بالغ بر یک میلیارد دلار خسارت دیده‌اند. سایر بیماریهای ویروسی نظیر تورا سندروم(TSD)، کله زرد(YHD) وIHHNV طی سال‌های بروز تا ۲۰۰۱ به ترتیب بیش از سه میلیارد دلار خسارت اقتصادی به مزارع پرورش میگو وارد کرده اند (Lightner, 2003) در ایران نیز در سال ۱۳۸۱ مزارع پرورشی خوزستان حدود ۶ میلیارد تومان خسارت مستقیم ناشی از بیماری لکه سفید متحمل شده است که با احتساب خالی بودن مزارع فوق در سال‌های بعد و عدم اشتغال بخشهای مرتبط خسارت خیلی بیشتر میزان برآورد اولیه می باشد. همین بیماری ویروسی در سال ۱۳۸۴ موجب انهدام بیش از ۵۰۰۰ تن میگوی پرورشی در استان بوشهر شد و در سال ۱۳۸۷ نیز پرورش میگو در استان سیستان و بلوچستان به تعطیلی کشاند.

امروزه با توجه به مخاطرات و حساسیتهای اقتصادی و اجتماعی ناشی از بیماریهای آبزیان به منظور پیشگیری و کنترل بیماریها و افزایش تولید، سرمایه‌گذاری‌های سنگینی و اجرای پروژه های تحقیقاتی مهمی از طرف کشورهای پیشگام این صنعت شده و این امر باعث شده است با وجود بیماری‌ها نه تنها در جهان کاهش تولید اتفاق نیافتد بلکه شاهد افزایش تولیدات آبزی‌پروری هم باشیم؛ برای مثال تولید میگوی کشور چین در سال ۱۹۹۲، معادل ۱۴۵هزار تن بود که در سال ۱۹۹۳ به دلیل اپیدمیک شدن بیماریها به ۳۰ هزار تن رسید اما با سرمایه گذاریهای خوبی که انجام شد در سال ۲۰۱۰ تولید میگوی این کشور بالغ بر یک میلیون تن رسیده است یا در ایالات متحده پس از بروز بیماری IHHNV در اواخر دهه ۸۰ و اوایل دهه ۹۰ و کاهش تولید میگو در این سال‌ها، محققین با تولید میگوهای عاری از بیماری خاص (SPF) تولید میگو را به بیش از میزان قبلی رساندند و پس از شیوع بیماری تورا سندروم در سالهای ۹۵ تا ۹۸ با تولید میگوهای مقاوم به بیماری(SPR) یک‌بار دیگر تولید میگو افزایش یافت. در سال ۱۹۹۹ ویروس لکه سفید (WSV) گریبان صنعت میگو را گرفت و تولید میگو به دلیل مرگ و میرهای ناشی از بیماری بسیار کاهش یافت که این‌بار با تدوین برنامه‌های ایمنی‌زیستی دوباره به بالاترین مرز از تولید رسید (Moss, et al. 2004). رشد روز افزون سطح اطلاعات علمی متخصصین این رشته،

بهینه‌سازی سیستم‌های تشخیص سریع بیماری‌ها، تولید محصولات دارویی متنوع و محرک‌های سیستم ایمنی، پروبیوتیک‌ها، مواد ضد باکتریایی و آنتی‌بیوتیک‌های نوین، تولید میگوهای عاری و مقاوم به بیماریهای مختلف (SPF و SPR) همگی شاهد اهمیت مقوله بهداشت و بیماری‌ها می‌باشند (Lightner, 2006). توزیع و گسترش بعضی از این بیماری‌ها در ابتدا منحصر به نیمکره شرقی و یا غربی بود ولی نقل و انتقالات و تجارت بین‌المللی منجر به جابه‌جایی گسترده عوامل ویروسی بین کشورها و قاره‌های مختلف شده است. به عنوان مثال صادرات میگوی منجمد باعث انتقال ویروس لکه سفید از قاره آسیا به کشورهای آمریکایی گردید و ویروس سندرم تورا به وسیله مولدین آلوده از آمریکای مرکزی به آسیا وارد شد. اگرچه بیماری‌های ویروسی میگو از جمله لکه سفید سالانه میلیاردها دلار خسارت اقتصادی بر جای می‌گذارند ولی علیرغم پاندمی‌های ویروسی، صنعت پرورش میگو راه‌های لازم برای بازگرداندن تولید به سالهای قبل از بیماری را یافته است (Lightner, 2005). دو راه اصلی برای این کار شامل اقدامات مدیریتی بهتر(Good management practice) GMP و امنیت زیستی می‌باشد. امنیت زیستی شامل مجموعه اقداماتی است که در جهت ممانعت از ورود یک عامل بیماری‌زا به یک مزرعه و همچنین کاهش یا ممانعت از گسترش یک بیماری در درون یک مزرعه یا یک منطقه اتخاذ می‌گردد (Horowitz 2003). برنامه امنیت‌زیستی در مزارع پرورش میگو شامل پایش و مراقبت منظم بیماری‌ها، اقدامات پیشگیرانه، مدیریت موثردر هنگام شیوع بیماری‌ها، ضدعفونی و نظافت بین دوره‌های پرورش و اقدامات عمومی حفاظتی می‌باشد.

مهمترین عوامل عفونی ایجاد کننده بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگوی ایران، ویروسها می‌باشند. از مهمترین ویروسهای گزارش شده طی بررسی‌های موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در استانهای خوزستان و بوشهر ویروس بیماری لکه سفید (WSSV)، ویروس سندرم تورا (TSV)، ویروس بیماری شبه‌پارو هپاتوپانکراس (HPV)، ویروس بیماری باکولوویروس میگوی ببری سیاه (MBV) و ویروس ایجادکننده بیماری نکروز عفونی بافتهای خونساز و بافتهای زیر پوستی (IHHNV) می‌باشند. مهمترین ویروسهای گزارش شده در استان هرمزگان دو ویروس بیماری شبه پاروهپاتوپانکراس(HPV) و ویروس بیماری باکولوویروس میگوی ببری سیاه (MBV) و در استان سیستان بلوچستان ویروس بیماری لکه سفید (WSSV) می‌باشند. از مهمترین باکتریهای ایجاد کننده بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگو کلیه استانهای جنوبی، باکتریهای خانواده ویبریو می‌باشند. از قارچ های شناسایی شده نیز می توان به قارچهای فوزاریوم، موکور، کلادوسپوریوم، آسپرژیلوس، پنیسیلوم و مخمرها اشاره کرد. مهمترین انگل‌های میگو در مراکز تکثیر و پرورش، شامل *زوتامنیوم*، *اپیستیلیس* و *ورتیسلا* بوده‌اند. براساس گزارشات رسمی سازمان دامپزشکی کشور فقط بیماریهای ویرسی IHHN و WSD در فهرست مشترک بیماریهای میگو در منطقه آسیا – اقیانوسیه توسط سازمانهای (NACA) و OIE ثبت شده‌اند. توجه به موارد اشاره شده، اهمیت هرچه بیشتر فیلتراسیون و پایش مستمر آب ورودی مراکز تکثیر و مزارع پرورش را متذکر می‌شود.

۱-۱-تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص

شروع تکثیر و پرورش میگو در آمریکا به سال ۱۹۶۷ باز می گردد و در نهایت این صنعت در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ به سرعت در آمریکا گسترش یافت. مهمترین گونه میگوی پرورشی در آمریکا، گونه سفید غربی بود که ظاهراً به بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و بافت زیرجلدی IHHNV (Infection Hypodermal and Heamatopoitic Necrosis Virus) مقاوم بود. از علائم مشخص این بیماری که خم شدن میگوها و کاراپاس آنها می باشد و به همین دلیل Runt deformity syndrome (RDS) نیز نامیده می‌شود و موجب بیش از ۳۰٪ تلفات موجود در مزارع می‌باشد.

اما در سال ۱۹۸۱ این بیماری تلفات شدیدی در میگوی *P.stylirastris* در آمریکای لاتین ایجاد کرد و در میگوی سفید غربی نیز موجب بیماری شدیدی گردید.

در نهایت پژوهشگران آمریکایی نسبت به توسعه میگوهایی که از این بیماری عاری باشند مبادرت نمودند. اولین تجربه آزمایشگاهی تولید میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در سال ۱۹۸۹ توسط لایتنر و همکاران در دانشگاه آریزونا انجام و در این سال ۱۵۰۰۰ پست لارو میگوی سفید غربی از یک هچری در مکزیک تهیه و به آمریکا منتقل شد و آن را استوک میگوی سفید غربی عاری از ویروس نکروز عفونی بافت خونساز و بافت زیرجلدی نام‌گذاری کردند.

در سال ۱۹۹۰ اتحادیه ICES قوانین و مقرراتی برای تولید میگوی عاری از بیماری خاص تنظیم و توسط آقای wyben و همکارانش در سال ۱۹۹۳ و با اعتبارات US Marine Shrimp Farming Program (USMSFP) و رعایت قوانین و مقررات اعلام شده اولین ذخیره میگوی عاری از بیماری خاص را در امریکا تولید نمودند. این قوانین تصریح می کند که فقط بیماری‌هایی که قابل شناسایی بوده و بطور اختصاصی موجب تلفات در میگوها می‌شوند مورد توجه قرار می گیرند.

۲-۱- تعریف میگوی عاری از بیماری خاص

تعریف واقعی میگوی عاری از بیماری خاص به معنی عاری بودن از هرگونه پاتوژن یا میکروارگانیسمی اختصاصی است که موجب مرگ و میر و تلفات در میگوها می‌شود. این فرآیند بسته به سطوح ایمنی‌زیستی و محیط جغرافیایی و گونه میگو متفاوت است. پاتوژنهایی که درلیست اختصاصی میگوهای عاری از بیماری خاص قرار می گیرند دارای شرایط ذیل می باشند:

- باید با اطمینان قابل تشخیص باشند.
- بتوان به صورت فیزیکی آنها را از سیستم تکثیر و پرورش جدا نمود.
- به طور مشخص باعث تهدید و آسیب به صنعت تکثیر وپرورش شوند.

هدف از اجرای این پژوهش، اعمال ساختار سخت‌افزاری و نرم افزارهای لازم برای جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا از سیستم تامین آب مراکز تولید میگوی عاری از بیماری می‌باشد.

برخی از گونه های ویبریو(*Vibrio spp.*) می‌توانند موجب بروز بیماری شده در میگوها قابل تشخیص بوده، ولی نمی‌توان آنها را در لیست پاتوژن‌های میگوی عاری از بیماری خاص قرار داد زیرا این باکتری‌ها جزو فلور طبیعی میگو محسوب می‌شوند و در شرایط خاص، توان ایجاد بیماری و تلفات را خواهند داشت.

میگوهای عاری از بیماری خاص، به بیماری‌ها مقاوم نبوده و با مفهوم مقاوم به پاتوژن خاص تفاوت داشته ولی می‌توان میگوهای عاری از بیماری خاص را به یک یا چند بیماری مقاوم نموده و میگوی مقاوم به پاتوژن خاص تولید نمود. همچنین میگوی عاری از بیماری خاص را می‌توان در یک زمان به یک یا چند بیماری مقاوم نموده و میگوی عاری از بیماری خاصی که مقاوم به پاتوژن خاص باشد نیز تولید کرد. مفهوم تحمل به پاتوژن خاص نیز به میگوهایی اتلاق می‌شود که از نظر ژنتیکی به یک بیماری مقاوم باشند. همچنین ویژگی‌های میگوهای عاری از بیماری خاص به نسل بعدمنتقل نشده و ارثی نمی‌باشند و این خصوصیات از مادر به فرزندان منتقل نمی‌شود. مفهوم عاری از بیماری خاص بسته به محل پرورش و تولید میگو و سطوح ایمنی زیستی متفاوت بوده و اگر در شرایط ویژه، که اصطلاحاً Nuclear Breeding Center (NBC) نامیده می‌شوند، تولید شوند آنها را عاری از بیماری خاص می‌نامند. در شرایط NBC میگوها برای حداقل دو سال تحت مراقبت بوده و برای تمامی بیماری‌های اخطارکردنی غربالگری انجام می‌شود. اگر میگوها را به سطوح ایمنی‌زیستی متوسط منتقل نماییم آنها را میگوهای با سلامتی بالا (High Health) می‌نامند.

۳-۱- مهمترین پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد

سازمان جهانی بهداشت دام (The World Organisation for Animal Health, OIE) برخی از عوامل بیماریزای خطرناک آبزیان که می توانند مرگ و میر شدید در مراکز تکثیر، پرورش و مولدسازی میگو ایجاد نمایند را به عنوان بیماریهای اخطارکردنی تعیین نموده و در کتاب سلامت آبزیان سازمان بهداشت جهانی دام، فهرست کرده است. کشورهای فعال در صنعت آبزی‌پروری موظفند براساس روش‌های استاندارد ویکسان که در در کتاب راهنمای آزمون‌های تشخیصی بیماریهای آبزیان (Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals) ذکر شده است، نسبت به انجام آزمایش‌ها اقدام و در صورت تایید بیماری‌ها، موارد را به سازمان جهانی بهداشت دام گزارش نمایند. نقل و انتقال آبزیان بدون اخذ گواهی بهداشتی مبنی بر عاری بودن آبزی از بیماریهای لیست شده در این فهرست منع شده است. بسته به محیط و سطوح ایمنی و نوع میگو، تعداد پاتوژن هایی که باید در تولید عاری از بیماری خاص مورد توجه قرار گیرند متفاوت بوده، بطوریکه برا ی تولید میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص، ۹ ویروس ولی برای تولید میگوی مونودن عاری از بیماری خاص، ۷ ویروس مورد توجه بوده و بیماری های باکلوویروس پنه‌ای (*Baculovirus Penaei*) و بیماری نکروز روده میانی باکلوویروسی

(Baculoviral Midgut Necrosis) که از ویروس‌های باکلوویروسی بوده و در میگوهای مونودن گزارش نشده و در لیست قرار نمی‌گیرند. پاتوژن‌هایی که به عنوان عامل بیماری و مرگ ومیر در میگوی سفید غربی که مهمترین گونه تولیدی عاری از بیماری خاص می‌باشد شامل ۹ ویروس، یک باکتری و سه پروتوزوا می‌باشند که در جدول اسامی آنها ارائه گردیده است. لازم به ذکر است که این جدول در طی زمان های مختلف تغییرات فراوانی نموده است، بطوریکه تا قبل از سال ۱۹۹۲بیماری لکه سفید در این لیست نبوده و بعداً به لیست اضافه شده است، یا در سال ۲۰۰۲ بیماری بیماری نکروز عفونی عضلات میگو (Infection Myonecrosis Virus, IMNV) به لیست اضافه شده و در حال حاضر این لیست شامل ۹ ویروس می‌باشد و چه بسا با شناخت پاتوژن‌های جدید این لیست تغییر نماید.

بخشی از پاتوژن‌های اعلام شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام، به عنوان پاتوژن‌های قابل گزارش اعلام گردیده و کلیه کشورها موظفند در صورت بروز این قبیل بیماری ها موارد را به مجامع بین المللی گزارش نموده و همچنین از نقل و انتقال میگو با داشتن این پاتوژن ها خودداری نمایند. بهتر است میگوهای مولد اولیه که برای تولید عاری از بیماری خاص انتخاب می‌شوند از مرکزی باشند که دارای ایمنی بالایی بوده و به سلامت آنها اطمینان شده و سپس در چرخه تولید مولد سازی استفاده گردد.

این پاتوژن ها نیز خود به سه دسته یا category تقسیم می‌شوند :

C–۱ (دسته اول) : پاتوژن هایی که استثنایی بوده و توانایی ایجاد مرگ و میر شدید در یک گونه یا تعداد زیادی از گونه های میگو را دارند .

C–۲ (دسته دوم): پاتوژن هایی که خطرناک بوده و می‌توانند موجب تخریب شوند.

C–۳ (دسته سوم): پاتوژن هایی که حداقل اثرات را دارند ولی باید از مزارع یا مرکز تولید مولد دور بمانند.

جدول۱- فهرست مهمترین پاتوژن‌هایی که باید در میگوهای عاری از بیماری خاص نباشد.

ردیف	نام بیماری	عامل بیماری	دسته پاتوژن‌ها
۱	White Spot Syndrome virus(WSSV)	ویروس	C1
۲	Tauar Syndrome Virus(TSV)	ویروس	C1
۳	Yellow Head Virus/ Gill-Associated Virus(YHV/GAV)	ویروس	C1-2
۴	Infection Myonecrosis virus(IMNV)	ویروس	C1-2
۵	Hepatopancreatic Parvolike Virus(HPV)	ویروس	C1-2
۶	Infection Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus(IHHNV)	ویروس	C2
۷	Baculovirus Penaei(BP)	ویروس	C2
۸	Baculovirus Midgut Gland Necrosis Virus(BMN)	ویروس	C2
۹	*Penaeus monodon*	ویروس	C2

ردیف	نام بیماری	عامل بیماری	دسته پاتوژن‌ها
	Baculovirus(MBV)		
۱۰	Necrotizing Hepatopancratis(NHP)	باکتری	C2
۱۱	Microsporidia	انگل	C2
۱۲	Haplosporidia	انگل	C2
۱۳	Gregarines	انگل	C3

۱-۳-۱- خصوصیات پاتوژن‌های باکتریایی

باکتری هایی که در بروز بیماری میگودرگیرهستند به دو دسته طبقه بندی می‌شوند:

- عوامل باکتریایی فرصت‌طلب مانند اکثر باکتریهای خانواده *ویبریوناسه*
- عوامل باکتریایی پاتوژن مانند باکتری عامل بیماری نکروز عفونی پانکراس

پاتوژن اصلی زمانی موجب عفونت می‌شود که شرایط برای بیماری زایی مساعد باشد ولی پاتوژن‌های فرصت طلب عمدتاً زمانی می‌توانند بیماری را ایجاد کنند که وضعیت فیزیولوژیک میزبان و وضعیت محیطی سیستم پرورشی مناسب نباشند. بیماریهای باکتریایی درمیگو ممکن است موجب تلفات، ضایعات جلدی، نکروز، کدر و مات شدن عضلات بدن، تغییر رنگ آبشش‌ها، کاهش رشد، از دست دادن کوتیکول، ایجاد روده سفید، بی‌حالی و کاهش مصرف غذا شوند (Lightner, 1996)).

۱-۱-۳-۱- روش انتقال

گونه‌های *ویبریو* در آب مورد استفاده برای تکثیر و پرورش میگو و همچنین در بیوفیلم تشکیل شده بر روی ساختارهای در تماس با آب در سالن‌های تکثیر و مزارع پرورش میگو؛ وجود دارد. باکتری از طریق زخم منافذ پوشش حیوان یا تغذیه وارد بدن میگو می‌شود. منبع اصلی *ویبریو هاروی* در سالن تکثیر محتویات روده میانی میگوهای ماده آماده تخم‌ریزی است که در طی تخم‌ریزی از بدن آن خارج می‌شوند (Lightner, 1996).

۲-۱-۳-۱- زیست‌پذیری و بقاء

مطالعات زیادی بر روی اثرات انجماد بر ویبریوزیس میگوی جداسازی شده از مزارع آلوده انجام شده است. شواهد موجود حاکی از آن است که *ویبریو هاروی* می‌تواند در رسوبات استخر حتی بعد از کلر زنی یا آهک‌پاشی بقاء یابد (Lightner, 1996).

۳-۱-۳-۱- پیشگیری و درمان

ویبریوزیس را می‌توان با مدیریت مناسب بهداشتی آب کنترل نمود تا از این طریق مانع بروز ویبریوزیس در محل تکثیر و پرورش میگو گردید و همچنین میزان استرس وارده به میگوها را کاهش داد. عوامل موثر در انتقال

بیماری شامل: انتخاب مکان مناسب، طراحی خوب استخر، و آماده سازی قبل از ریختن بچه میگو می‌باشد. افزایش تعویض آب روزانه و کاهش توده زیستی موجود در استخر در زمان پرورش به منظور کاهش تلفات ناشی از ویبریوزیس توصیه شده است. همچنین زه‌کشی، خشک کردن و آهک‌پاشی استخرها پس از برداشت توصیه می گردد.

به منظور کنترل ویبریوزیس درخشان سالن تکثیر، شستن تخم‌ها با ید و فرمالدئید و همچنین جلوگیری از آلوده شدن تخم‌ها با مدفوع میگو، توصیه می شود. از دیگر راهکارهای مناسب برای پیشگیری از بروز ویبریزیس می‌توان به ضد عفونی آب توسط کلر، استفاده از پروبیوتیک‌ها و مواد محرک سیستم ایمنی اشاره نمود.

۲-۳-۱- بیماری ویبریوزیس (Vibriosis)

باکتری‌های جنس *ویبریو* از نظر مرفولوژی میله‌ای کوتاه، به سایز ۰.۵ – ۱.۰ × ۱.۰ – ۴.۰ µm با یک تاژک منفرد قطبی و گرم منفی می باشند که واکنش اکسیداز آنها مثبت بوده، قادر به تخمیر کربوهیدرات‌ها می‌باشد و تولید اسید بدون گاز می نماید و نسبت به مواد مهارکننده رشد *ویبریو* مانند O_{129} مقاوم هستند. قادر به تولید ایندول، لیزین و ارنیتین‌دی‌کربوکسیلاز هستند اما آرژنین‌دی‌کربوکسیلاز تولید نمی‌کنند، از سلوبیوز، گلوکز و ساکارز، ترهالوز اسید تولید می‌کنند، احیای نیترات را انجام می‌دهند، در غلظت ۱- ۶٪ (w/v) سدیم کلراید رشد می‌کنند، خون، DNA، و ژلاتین را تجزیه می‌کنند، و واکنش ووگس– پروسکائور آنها مثبت نمی‌باشد(Lightner, 1996; Wijayati, 2004).

مهمترین گونه‌هایی که در میگو موجب بروز بیماری می شوند عبارتند از : *V.harveyi*، *V.vulnificus*، *V.parahaemolyticus* و *V.alginolyticus* که به ترتیب فراوانی در هچریها ایجاد بیماری می کنند. در مزارع پرورشی و نرسری‌ها بیشتر گونه‌ها *V.parahaemolyticus*، *V.alginolyticus*، *V.harveyi* و *V.vulnificus* به ترتیب ایجاد بیماری می‌کنند. در پاره ای مواقع *V.damsela* و *V.fluviallis* نیز موجب بروز بیماری می‌شوند (Lightner,1996).

۱-۲-۳-۱- اپیدمیولوژی

ویبریوزیس یکی از بیماری‌های مهم منجر به مشکلات در صنعت آبزی‌پروری می‌باشد. ویبریوزیس بیماری باکتریایی است که عامل تلفات میگوهای پرورشی در سراسر جهان می‌باشد. گونه‌های ویبریو بطور وسیعی در تسهیلات پرورش میگوی جهان انتشار یافته‌اند. عفونت ناشی از *ویبریو* عمدتاً در مراکز تکثیر رخ می‌دهد، اما همه‌گیری‌هایی نیز در استخرهای پرورش گونه‌های مختلف میگو دیده شده است. این بیماری توسط یک باکتری گرم منفی از خانواده *ویبریوناسه* ایجاد می‌شود. شیوع این بیماری زمانی رخ می‌دهد که عوامل محیطی تکثیر سریع باکتری را تحریک کنند، این باکتری‌ها در شرایط طبیعی با سطوح کم در خون میگو وجود داشته و

توسط جانور تحمل می‌شود. پوشش محافظ خارجی آبزی مانع فیزیکی موثر در مقابل پاتوژن‌هایی است که سعی دارند از سطوح خارجی سخت‌پوست وارد بدن آن شوند؛ این مسئله در مورد مجاری گوارشی فوقانی و تحتانی آبزی نیز صادق است. آبشش با لایه نازکی پوشیده شده و بنابراین نسبت به نفوذ باکتری حساس‌تر می‌باشد، اما سطوح آن توسط استوبرانش‌ها تمیز می‌شوند. روده‌های آبزی با پوسته‌ای پوشیده نشده است، بنابراین مستعد ترین نقطه برای نفوذ پاتوژن‌های موجود در آب، خون و سایر رسوبات می‌باشد (Lightner, 1996).

ویبریو هاروی باکتری گرم منفی، درخشنده می‌باشد که یکی از مهمترین علل اصلی منجر به تلفات در تکثیر لاروهای *پنئوس مونودن* و *لیتوپنئوس وانامی* در سیستم‌های پرورش بوده است. هزاران واحد تکثیر و تولید لارو در جهان به این آلودگی مبتلا شده اند و ضررهای اقتصادی زیادی را تجربه کردند (Johnson, 1978). از میان گونه‌های *ویبریو هاروی* جداسازی شده، بعضی بیماری‌زا بوده و تعدادی بیماری‌زا نیستند، که حاکی از وجود تنوع ملکولی و ژنتیکی زیاد این گروه از باکتری می‌باشد. اخیراً مکانیسم بیماری‌زایی آن را به باکتریوفاژ اختصاص داده‌اند.

ویبریوزیس دارای گسترش جهانی در سراسر دنیا و در میان تمامی سخت پوستان دریایی حساس به آن از جمله میگوها می باشد و در تمام فصول سال شیوع می یابد. اپیدمی‌های ویبریویی در تمامی مراحل زندگی میگو رخ می‌دهد، اما بیشتر در تخم ریزی‌ها شایع است. اپیدمی‌های بزرگی از ویبریوزیس در *پنئوس مونودن* از مناطقی در اندونزی و سواحل اقیانوس آرام، *پنئوس ژاپونیکوس* در ژاپن، و *لیتوپنئوس وانامی* از اکوادور، پرو، کلمبیا و آمریکای مرکزی گزارش شده است (Lightner,1996). این بیماری بصورت مجموعه ای از علائم یا همان سندرم بیان می‌شود که شامل ویبریوزیس دهانی و روده ای، ویبریوزیس ضمائم و پوست، ویبریوزیس موضعی زخم، بیماری پوسته، ویبریوزیس سیستمیک و کبدی پانکراسی سمی می‌باشند (Lightner,1996).

عوامل ایجاد کننده ویبریوزیس شامل انواعی از گونه‌های باکتری ویبریو مانند: *ویبریو هاروی* ، *ویبریو وولنیفیکوس* ، *ویبریو پاراهمولتیکوس* ، *ویبریو آلجینولتیکوس* ، *ویبریو پنایسیدیا* (Lightner,1990) ایجاد می‌شود. گزارشات متفرقه‌ای مبنی بر وقوع ویبریوزیس در اثر ویبریو دامسلا و ویبریو فلوویالیس و سایر گونه‌های ناشناخته نیز وجود دارد (Lightner,1996) گونه‌های *ویبریو* جزء فلور طبیعی میکروبی میگوهای وحشی و پرورشی می‌باشند (Sindermann, 1990; Brock and Lightner, 1990) و زمانی که مکانیسم‌های دفاعی طبیعی جانور تضعیف می‌شوند، به پاتوژن‌های فرصت طلب تبدیل می‌شوند که این امر بواسطه عوامل مستعد کننده متعددی ایجاد می گردد.

۲-۲-۳-۱- علایم کلینیکی

این بیماری باعث مرگ و میر شدید بالاخص در پست لاروها و میگوهای جوان می شود. میگوهای آلوده به بیماری علائمی از قبیل هیپوکسی و آمدن به سطح استخر و کناره های استخر را نشان می دهند. با توجه به

اینکه میگوها جهت دریافت اکسیژن به سطح می آیند، پرندگان دریایی جهت گرفتن میگوها در روی استخرها به فراوانی دیده می شوند. معمولاً در شب میگوهای آلوده حالت نورافشانی[6] از خود نشان می دهند. عفونت ناشی از ویبریوها در میگو ممکن است جلدی[7] ، روده ای[8] یا عمومی[9] باشد. این حالت ها بالاخص در لاروها و پست لاروها مشاهده می شود. میگوهای آلوده (لاروها و پست لاروها) آلوده به ویبریوهای نورافشان به طور مشخص کلنی های باکتریایی زیادی به رنگ آبی و به شکل پلاک نشان می دهند. در بزرگنمایی بالا این پلاکها به صورت تجمعی از باکتریهای میله ای شکل در سطح کوتیکول یا قسمتهای دهان، زوائد حرکتی و در سطح کوتیکول مری و قسمتهای دستگاه گوارش و معده دیده می شوند (Sindermann, 1990; Brock and Lightner, 1990).

به همراه علائم سطحی آلودگیهای باکتریهایی سطح دهان و قسمت پیش معده دستگها گوارشی، معمولاً مجاری هپاتوپانکراس و اپی تلیال روده میانی نیز گرد و کنده شده و بداخل مجاری هپاتوپانکراس رها شده و به همین دلیل بیماری را Bolitias blancas یا Little white balls گویند.باکتریهایی مهاجم به سطح روده میانی و مجاری هپاتوپانکراس ممکن است موجب گسترش پلاکهای باکتریایی شده و باعث ایجاد عفونت سیستمی و عمومی شده و مرحله نهایی بیماری شروع شود (Sindermann, 1990).

۳-۲-۳-۱- آسیب شناسی

علایم آسیب شناسی در میگوهای جوان و بالغ متفاوت بوده و با توجه به اینکه این باکتریها ممکن است جزء میکروفلور طبیعی این میگوها بوده، در اثر ضربه یا تأثیرات شدید محیطی یا به صورت عفونت ثانویه ناشی از سایر باکتریها یا در نتیجه افزایش میزان گونه های بیماریزا، باعث بروز بیماری در این دسته از میگوها می شود. عفونتهای ناشی از این باکتریها در میگوهای جوان و بالغ یا به صورت زخم های سطحی بوده که به طور مشخص بوسیله کپسولی از هموسیتها یا درپوشی به صورت ملانوزه احاطه شده است و باکتریها به طور مشخص در داخل زخم ها یا کناره های آن قابل دیدن می باشد (Lightner, 1996).

در مقاطع بافتی تهیه شده از میگوی مبتلا به ویبریوزیس سیستمیک معمولا ندولهای هموستیک عفونی در اندامهای لنفی، قلب، بافت پیوندی آبشش ها، هپاتوپانکراس، غدد شاخکی، طناب نخاعی، تلسون و عضلات مشاهده می گردد. هپاتوپانکراس آلوده ممکن است به صورت بافتی با تخلخل و حفره کم ظاهر شود که نشانگر کم بودن ذخائر چربی و گلیکوژن می‌باشد. ویبریوزیس با تصویر گیری اسفروئیدها در اندامهای لنفی همراه است (Lightner, 1996).

---

[6] Luminescent
[7] cuticular
[8] enteric
[9] systemic

۴-۲-۳-۱- تشخیص

تشخیص عفونت ویبریوزیس براساس نشانه‌های بالینی و مطالعات بافت‌شناسی می‌باشد. از دستگاه گوارش و هپاتوپانکراس مقطع تهیه شده و ممکن است از همولمف و هپاتوپانکراس بر روی پلیت‌های حاوی آگار عمومی یا آگار انتخابی ویبریو (TCBS) کشت داده شوند. در بررسی پست لارو کل جانور را له کرده و سپس بر روی پلیت حاوی آگار انتخابی تلقیح می‌نمایند. گاه کلنی‌های درخشان در مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت پس از گرم‌خانه‌گذاری پلیت ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده می‌شوند (Sindermann, 1990; Brock and Lightner, 1990).

تصویر ۱- باکتری درخشان (ویبریو هاروی)

گونه‌های ویبریو به روش‌های متفاوتی شناسایی می شوند از جمله رنگ آمیزی گرم، تست تحرک، تست اکسیداز، شیوه مصرف گلوکز، رشد در حضور کلرید سدیم، کاهش نیترات و تست درخشندگی. که برای این منظور می توان از کیت های تجاری مانند API و Biolog بهره برد. البته امروزه از روش های ملکولی مانند توالی یابی ژن 16S rDNA به منظور تشخیص دقیق گونه ها و سویه های باکتریایی استفاده می‌گردد. روش دیسک کربی-بائور یا تست حداقل غلظت مهاری (MIC) برای شناسایی گونه‌های ویبریو استفاده می‌شود (Lightner, 1996).

۳-۱-۳- بیماری نکروز عفونی پانکراس (Necrotizing Hepatopancreatitis, NHP)

عامل

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم منفی، چند شکلی و پاتوژن اجباری داخل سلولی می‌باشد. از نظر تاکسونومی این باکتری متعلق به خانواده پروتئوباکتریاسه می‌باشد. این باکتری را آلفا پرتئوباکتریوم (*Alfa proteobacterium*) نیز می‌نامند. دو شکل از این باکتری در بیماری نکروز عفونی پانکراس مشخص شده است.

یک فرم شکل استوانه ای ریکتزیا مانند با اندازه ۰/۹ × ۰/۳میکرون که فاقد تاژک می باشد. فرم دیگر آن حالت مارپیچی و حلزونی مانند بوده و اندازه آن ۲/۹× ۰/۲ میکرون می باشد. فرم مارپیچی آن دارای ۸ تاژک بوده که در قسمت نوک این باکتری قرار گرفته است. همچنین یک تار و تاژک اضافه نیز در قسمت تیغه مارپیچی وجود دارد. مطالعات ژنوتیپی نشان داده است که کلیه سویه های باکتری ایجاد کننده بیماری نکروز عفونی پانکراس در نقاط مختلف دنیا خیلی بهم نزدیک می باشد (Sindermann, 1990)

۱-۳-۳-۱- اپیدمیولوژی

بیماری تاکنون در میگوهای آزتکوس (*P.aztecus*)، پنئوس استلیفروس (*P. steliferus*)، لیتوپنئوس استیلیورستیس (*L. styliorostis*)، لیتوپنئوس وانامی و پنئوس کالیفرنینسیس (*P.californiensis*) و از کشورهای آمریکای لاتین از جمله پرو، اکوادور، برزیل، ونزوئلا، پاناما و کاستاریکا و اخیراً از کشورهای آسیای جنوب شرقی از جمله تایلند، سنگاپور، مالزی وچین نیز گزارش شده است.

۲-۳-۳-۱- علایم کلینیکی

علایم کلینیکی بیماری شامل کاهش مصرف غذا، لاغری و روده ها خالی، افزایش ضریب تبدیل غذایی،کاهش رشد، نسبت طول میگو به وزن میگو و پهنای بدن میگو کاهش یافته و میگوها لاغر می شوند. پوسته میگو نرم و بدن میگوها سست می شود. آبشش های میگوها سیاه و تیره شده و رنگدانه های کروماتوفور در قسمتهای انتهایی اندامهای حرکتی میگو بالاخص Uropods و Pleopods گسترش یافته و باکتریهای رسوب کننده در سطح پوسته میگو افزایش یافته و میگوها بی حال شده و بعد از مدتی از بین می روند (Lightner et al., 1994).

هپاتوپانکراس میگوها آتروفی و کوچک شده و مرکز هپاتوپانکراس سفید بی رنگ شده و کاملاً با حالت طبیعی هپاتوپانکراس قابل تمایز می باشد. همچنین در بافت هپاتوپانکراس رگه هایی سیاه ناشی از ملانوزه شدن مجاری هپاتوپانکراس مشاهده می شود و بافت هپاتوپانکراس نرم و آبکی شده و حالت ادماتوز داشته و مرکز آن آبکی است (Johnson, 1990; Lightner, 1996).

۳-۳-۳-۱- آسیب شناسی

در آسیب شناسی آتروفی ملایم تا شدید به همراه نقاط شدید گرانولوماتوز در مجاری هپاتوپانکراس دیده می‌شود که ممکن است در یک یا چند مجاری وجود داشته باشند. سلول‌های مجاری هپاتوپانکراس از حالت ستونی به حالت مربعی تغییر شکل داده و این سلولها حاوی مقدار کمی مولکولهای چربی بوده وفاقد واکوئل می باشند به ویژه در R-cell و به طور مشخص تعداد سلولهای ترشحی آنها کاهش یافته است همچنین تجمعی از باکتری های ایجاد کننده بیماری در مجاری هپاتوپانکراس قابل تشخیص است (Johnson, 1990; Lightner, 1996).

تصویر ۲- علایم ظاهری بیماری NHP

۴-۳-۱- عفونت‌های ریکتزیایی (Ricketsial infection)

ریکتزیا یا باکتری های ریکتزیایی شکل[۱۰] با اندازه ۱/۶μm – ۰/۸× ۰/۷ – ۰/۲ از مهمترین عوامل عفونی در این بیماری می‌باشند. این باکتریها گرم منفی بوده و به صورت استوانه‌ای می‌باشند. باکتری بوسیله یک پوشش سلولی احاطه شده که خود دارای سه لایه داخلی ، میانی و خارجی می باشند. مهمترین اندامهایی که باکتری به آنها حمله می کند شامل ارگان لنفاوی، بافت پیوندی (به صورت سیستمی) همولنف، فاگوسیتها و اپی تلیال سطح کوتیکول و هپاتوپانکراس می باشد. این باکتری انگل اجباری داخل سلولی بوده و فقط در سیتوپلاسم سلولهای بافت هدف رشد می کند ولی در پاره ای مواقع در هسته نیز رشد می کند (Brock and Lightner, 1990).

۱-۴-۳-۱- علایم کلینیکی

علایم کلینیکی بیماری بسته به نوع عفونت متفاوت می باشد. در پاره ای مواقع عامل ایجاد کننده بیماری ممکن است با حمله به بافت پیوندی ایجاد عفونت سیستمیک نموده و در این حالت میگو بی حال بوده، غذا نمی‌خورند و در محل های کم عمق استخرها در کناره های لبه ها تجمع می کنند. در پاره ای از میگوها که در کناره ها جمع شده اند دارای آبشش قهوه ای رنگ، عضلات شکمی میگوها کدر و هپاتوپانکراس آنها شکننده می باشند. در پاره ای مواقع عامل بیماری فقط هپاتوپانکراس را مورد تهاجم قرار داده و این حالت به ویژه در میگوهای *P.marginatus* ، *P.mergucensis* و *P.stylirostris* مشاهده می شود. در این میگوها هپاتوپانکراس آتروفی شده و بی رنگ می باشند. همچنین میگوها بی حال بوده و تمایلی به غذا خوردن ندارند (Brock and Lightner, 1990).

۲-۴-۳-۱- آسیب شناسی

در مطالعات آسیب شناسی در اغلب اوقات باکتری را در داخل سیتوپلاسم دیده و به صورت کلنی‌های کوچک به شکل اینکلوژن بادی می‌باشند. اطراف باکتری‌ها یک پوشش با غشاء سه لایه وجود دارد و اندازه این

میکروکلنی ها ۵-۵۰µm می باشد . با رنگ آمیزی H&E رنگ آبی را جذب نموده و گرم منفی بوده و با رنگ آمیزی Feulgen مثبت می باشند. با رنگ آمیزی گیمسا و درشت نمایی ۴۰۰ اطلاعات مهمتری از این باکتری به دست می آید. البته رنگ آمیزی نقره به منظور مشاهده باکتریهای داخل سلولی اطلاعات کاملتری را نشان می دهد (Lightner, 1996).

سلولهای هپاتوپانکراس در عفونت RLB به صورت چند شکلی تغییر یافته و معمولاً دو اندازه مشخص از باکتری ممکن است در سلولها دیده شود. در عفونت سیستمی باکتری‌ها که در بافت‌ها و سلول‌های مختلف از جمله در سلول‌های فاگوسیتوز، بافت پیوندی، غدد آنتنی، ارگان لنفاوی ثابت شده‌اند دیده می‌شوند. میگوهای آلوده به صورت ثابت نشان دهنده یک واکنش ثابت ، سیستمی و مشخص از سلول‌های همولمف می‌باشند و این موضوع احتمالاً بیشتر در عفونت ریکتزیا اتفاق می‌افتد. ضایعات التهابی ممکن است مرکزی بوده و به خوبی در ندولها مجزا نمی باشد. تجمع زیادی از سلولهای لنفاوی معمولاً باعث بستن مجاری و ایجاد واکوئل می‌شود. مهمترین قسمتی که چنین حالتی مشاهده می‌شود، عروق آبشش‌ها می باشد (Lightner, 1996).

۵-۳-۱- بیماری سل میگو (Shrimp Tuberculosis)

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم مثبت، اسید فست و استوانه‌ای شکل بنام *Mycobacterium* بوده که معمولاً با ایجاد ندول‌های ملانوزه و ضایعات گراتولوماتوزی همراه می‌باشد. برای جداسازی این باکتری به محیط‌های اختصاصی نیاز بوده و یک بیماری مشترک با انسان می‌باشد و موجب ایجاد ضایعاتی بر روی دست‌های پرورش دهندگان میگو یا کارگران واحدهای عمل آوری می نماید. از مهمترین گونه هایی که ایجاد بیماری می کنند عبارتند از : *M.marinum* و *M.fortuitum* (Lightner, 1993, 1996; Brock and Lightner, 1990).

۱-۵-۳-۱- علایم کلینیکی

علایم ظاهری همراه این بیماری به صورت تعداد زیادی کانونهای ملانوزه در قسمتهای مختلف بدن میگو و نواحی عضلات، تخمدان، قلب و آبشش مشاهده می شود. در پاره ای مواقع یک زخم های بزرگ غیر منظم در سطح کوتیکول ظاهر می شود و نقاط ملانوزه متعدد دیده نمی شود.

۲-۵-۳-۱- آسیب شناسی

در رنگ آمیزی H&E ضایعات ایجاد شده بر روی بدن و اندامهای مختلف شامل کانونهای ملانوزه با تجمعی از سلولهای هموسیت و یا ضایعات گرانولوماتوزی مشاهده می شود. در این ضایعات و کانونهای ملانوزه باکتریهای آبی کم رنگ استوانه ای شکل ممکن است به همراه تجمع سلولهای هموسیتی مشاهده شود. در رنگ آمیزی گرم این باکتریها در ندولها یا گره‌ها به صورت گرم مثبت بوده و در رنگ آمیزی زیل نلسون یا کربول

فوشین (Carbol fuchsine) که رنگ آمیزی های خاص باکتریهای اسید– فست می باشد، رنگ باکتری‌ها به صورت قرمز روشن مشاهده می شود (Brock and Lightner, 1990).

۴-۱- فرضیه

- آب ورودی به سیستمهای پرورش میگو دارای عوامل نامطلوب باکتریایی و قارچی است.

۵-۱- اهداف تحقیق

- تعیین فراوانی باکتریایی در آب ورودی سیستم تکثیر و استخرهای پرورش میگوی عاری از بیماری خاص
- تعیین فراوانی فارچی در آب ورودی سیستم تکثیر و استخرهای پرورش میگوی عاری از بیماری خاص
- تعیین فراوانی باکتریهای خانواده *Vibrionaceae* در آب ورودی سیستم تکثیر و استخرهای پرورش میگوی عاری از بیماری خاص
- تعیین فراوانی قارچ های *Fusarium spp.* در آب ورودی سیستم تکثیر و استخرهای پرورش میگوی عاری از بیماری خاص

۶-۱- مروری بر منابع

۱-۶-۱- تاریخچه تولید میگوی عاری از بیماری خاص در آمریکا و آسیا

اولین بار در سال ۱۹۸۵ پست لارو میگوی وانامی از پاناما به کارولینای جنوبی آمریکا وارد شد و هر ساله برمیزان جمعیت و تولید آن بعنوان گونه اصلی تکثیر و پرورش در آمریکای شمالی افزوده میشود. شش گونه از میگوهای خانواده پنائیده شامل *P. vannamei*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. japonicus*, *P. chinensis* و *P. indicus*برای مقاصد تحقیقاتی و پرورشی به هاوایی وارد گردیدند ولی فقط تولید میگوی وانامی عاری از بیماری خاص در حال حاضر موفقیت آمیز و تجارتی شده است، هرچند سایر گونه ها هنوز نگهداری و مورد تحقیق قرار میگیرند (فقط گونه سفید هندی *P. indicus* بدلیل عدم امکان عاری شدن از عوامل بیماریزای مهم، مورد حذف قرار گرفت).

در سال ۱۹۸۹ لایتنر و همکارانش در دانشگاه آریزونا، از یک مرکز تکثیر واقع در مکزیک ۱۵۰۰۰ پست لارو میگوی ایتوپنئوس وانامی را به آمریکا منتقل نمودند تا نسبت به تولید میگوهای مولد عاری از بیماری IHHN اقدام شود. سپس آقای wyban و همکارانش در سال ۱۹۹۳ با استفاده از بودجه دولتی "برنامه پرورش میگوی دریایی آمریکا" (USMSFP) و با رعایت قوانین و مقررات اتحادیه ICES که در سال ۱۹۹۰ وضع شده بود، اولین ذخیره میگوی عاری از بیماری خاص که عاری از عوامل مهم بیماریزای قابل شناسایی تا آن زمان بود را از گونه وانامی تولید نمودند.

در قاره آسیا اولین بار واردات میگوی وانامی عاری از بیماری خاص در سال ۱۹۹۶ از هاوایی آمریکا به تایوان انجام شد. پس از موفقیت درایجاد رسیدگی جنسی مولدین، تولید پست لارو و پرورش این گونه، موج عظیمی از درخواستها برای واردات مولد وانامی ایجاد شد و متعاقب آن اولین محموله های مولدین وحشی از کشورهای مختلف آمریکای لاتین در سال ۱۹۹۷ وارد گردید. تولید ۱۲ تن در هکتار میگوی وانامی ۱۵-۱۲ گرمی ظرف مدت ۷۵ روز رکورد بسیار چشمگیری بود که در تایلند و اندونزی نیز تکرار شد. در اواسط سال ۱۹۹۸ پرورش‌دهندگان چینی و تایوانی نسبت به مولدسازی میگوهای پرورشی وانامی تولیدی خودشان اقدام نمودند ولی شیوع بیماری تورا سندرم TS ناشی از واردات میگوهای مولد وحشی از آمریکای لاتین موجب تلفات بیش از ۸۰٪ میگوهای جوان ظرف سه روز در تایوان شد. پس از آن بروز تلفات ناشی از بیماری ویروسی لکه سفید و وقوع بیماریهای کندی رشد و سندروم بد شکلی و کوتولگی ناشی از فرم مزمن بیماری Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) نیز مشاهده شد. در چین پس از یکسال موفقیت در برداشت زیاد میگو در واحد سطح مزارع پرورشی ، مشکلات حاصل از واردات مولدین غیر عاری از بیماری خاص از تایوان وتولید مولدین پرورشی وانامی بدون توجه به مسائل همخونی و ایمنی زیستی در سالهای بعد، گسترش یافت و بیماریهای بیشتری نظیر سندروم تورا در مراکز تکثیر و پرورش میگو ایجاد شد که مرگ و میر پست لاروها و میگوهای جوان را بدنبال داشت. وضعیت نقل و انتقالات میگوی وانامی در کشورهای مختلف و برخی تبعات آن در جدول مشاهده می شود. بیماریهای که در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی میگوی وانامی شایع هستند نیز در جداول جدول و **Error! Reference source not found.** آورده شده اند.

جدول ۲- مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مراکز تکثیر

انگل	قارچ	باکتری	ویروس
1.*Vorticella* sp. 2.*Zothamnium* sp.	1.*Laginidium* sp. 2.*Sirolpidum* sp.	1.*Vibrio* sp 2.Fouling bacteria	1.BP 2.IHHNV 3.HPV 4.REO 5.RPS 6.TSV 7.LOVV

جدول ۳- مهمترین عوامل بیماریزای میگوی وانامی در مزارع پرورشی

انگل	باکتری	ویروس
1.Nematods 2.Microsporidiae	1.*Vibrio* sp. 2.NHP	1.BP 2.IHHNV 3.HPV 4.LOVV 5.TSV 6.IMNV 7.WSSV

۲-۶-۱- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی در داخل کشور

علی رغم تمایل بخش خصوصی و دولتی برای راه‌اندازی مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خاص، تا پیش از این پژوهش، تولید میگوی SPF در داخل کشور تحقق پیدا نکرده بود، ولی پایش بیماریهای ویروسی، باکتریایی و قارچی با اهداف مختلف صورت پذیرفته است.

در ایران از مزارع پرورش میگوی سفید هندی در سایت حله استان بوشهر باکتری های *Vibrio parahaemolyticus*، *Vibrio anguillarum* و *Vibrio harveyi* جداسازی شده است (کیسمی، ۱۳۷۷).

نبوی و همکاران در سال ۱۳۷۸ طی تحقیقی بیان نمود که رایج‌ترین باکتری‌هایی گونه *ویبریو* که می‌توان از سطح بدن میگو پرورشی جداسازی نمود بترتیب فراوانی عبارتند از: *Vibrio parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. marinus*، *V. Fluvialis*، *V. vulnificus* و *V. mimicus* که فراوانی سه گونه آخر یکسان بوده است.

گنجور در سال ۱۳۸۰ گزارش نمود که رایج‌ترین ویبریوهایی را که از آبشش میگو جداسازی نموده است بترتیب فراوانی *Vibrio parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus* و *V. Fluvialis* بوده است.

در مطالعهٔ انجام شده توسط قائدنیا و همکاران در سال ۱۳۸۲، ۵۷۸ عدد میگوی ببری سبز پرورشی (*Penaeus semisulcatus*) استان بوشهر (سایت حله) مورد بررسی قرار گرفت. مجموعا ۷۱۹ مورد کلنی قارچی از سطح خارجی، آبشش، همولنف، هپاتوپانکراس و آب استخرهای پرورش میگو جداسازی و شناسایی شد. از این تعداد ۵۲۶ کلنی کپکی (۷۳/۱۵ درصد)، ۱۷۹ کلنی مخمری (۲۴/۸۹ درصد)، ۱۲ مورد میسیلیوم استریل (۱/۶۶درصد) و ۲ مورد کلنی ناشناخته (۰/۲۷ درصد) شناسایی شد. از بین قارچهای جدا شده گونه‌های آسپرژیلوس (۹/۴۵ در صد)، گونه های فوزاریوم (۷/۷۸ درصد)، گونه های کلادوسپوریوم (۶/۳۵ در صد)، آسپرژیلوس نایجر (۶/۱۱ درصد)، رودوترولا روبرا (۵/۹۸ درصد)، آسپرژیلوس فلاووس (۵/۹۸ درصد) گونه‌های پنیسیلیوم (۵/۸۴ درصد)، آلترناریا آلترناتا (۵/۲۸ درصد)، کاندیدا آلبیکنس (۵/۲۸ درصد) و سایر گونه‌های کاندیدا (۵/۱۴ درصد) به ترتیب بیشترین فراوانی را داشتند و ۳۷/۶۰ درصد سایر گونه های قارچی بودند. هیچ کدام از کلادوسپوریم‌های جدا شده توانای هیدرولیز ژلاتین ۱۲ درصد را نداشته، لذا بیماریزا نبودند. از بین آسپرژیلوس‌های جدا شده ۲ مورد (۴/۶۵ درصد) توانایی تولید آفلاتوکسین را دارا بودند.

طی سالهای ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷، طرح ملی به منظور شناسایی و پایش بیماریهای میگو در مراکز تکثیر و مزارع پرورش استانهای جنوبی کشور انجام شده است که در این طرح ۵ نوع ویروس از لیست OIE تشخیص داده شده است (افشارنسب و همکاران ۱۳۸۸)، همچنین منابع وحشی (خرچنگها و میگوهای پرورشی) به منظور وجود یا عدم وجود بیماری لکه سفید در استان بوشهر و خوزستان بررسی شده است که در بوشهر نتیجه عدم وجود ویروس مذکور در منابع وحشی ذکر شده (مهرابی و همکاران ۱۳۸۹) و در خوزستان میگوهای وحشی به ویروس بیماری لکه سفید آلوده بوده اند (افشار نسب و همکاران۱۳۸۲).

در مطالعه خضری که در سال ۱۳۷۸بر روی میگوی سفید هندی پرورشی استان بوشهر از تیرماه لغایت آبان ماه انجام شد، ۱۶ گونه قارچی از اندام های مختلف میگو جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. در همه استخرهای بررسی شده بیشترین آلودگی در پوشش خارجی و آبشش و کمترین میزان آلودگی در همولنف مشاهده گردید. قارچهای جداسازی شده از تمام اندامهای میگو، در کلیه استخرها از نوع *پنی‌سیلیوم*، *کلادوسپوریوم*، *آسپرژیلوس نیجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، میسیلیوم استریل، *ریزوپوکس*، *مخمر*، *فوما*، *آکرومونیوم*، *فوزاریوم*، *آلترناریا*، *تریکودرما* و *پسیلومایسیس* بوده و در همه استخرها جنس *پنی‌سیلیوم* دارای بالاترین تراکم بوده و همچنین میزان فلور قارچی در استخرهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشته است. او خاطرنشان کرده است که عوامل قارچی شناسایی شده در این پژوهش فرصت طلب بوده و ابتلا به بیماری در اثر این عوامل بستگی به وجود استرس های وارده به میگو بواسطه سوء مدیریت (نظیر گل آلودگی آب، کمبود اکسیژن محلول در آب و وجود مواد فاسد بویژه غذا در بستر) دارد.

بر اساس مطالعه دشتیان‌نسب و همکاران (۱۳۸۹) بر عوامل بیماریزای باکتریایی در مراکز تکثیر میگوی سفیدهندی و سفید غربی استان بوشهر در سالهای ۸۵ و ۸۶ ، شش گونه ویبریو از مراکز تکثیر استان بوشهر شامل *ویبریو آلجینولیتیکوس*[11]، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو* هاروی، *ویبریو فلاویالیس*، *ویبریو ولنیفیکوس* و *ویبریو آنگوئیلاروم* و یک گونه ویبریوی ناشناخته جداسازی گردید که بیشترین فراوانی در سال ۱۳۸۵ مربوط به *ویبریو آلجینولیتیکوس* و در سال ۸۶ مربوط به ویبریو پاراهمولیتیکوس بود .

میربخش و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه ای بر روی میزان فراوانی و گوناگونی گونه های ویبریو در میگوهای پرورشی سفید غربی استان بوشهر، ۹ گونه ویبریو شامل: *V. alginolyticus* ۳۰/۹۵ درصد ، *V. anguillarum* ۱۷/۹۲ درصد، ویبریو پاراهمولیتیکوس ۱۷/۴۶ درصد، *V.mimicus* ۶/۲۶ درصد(، *V.metschnikovii* ۶/۲۶ درصد *V. vulnificus* ۴/۸۷ درصد *V.cincinnatiensis* ۴/۸۷ درصد، *V.damsela* ۱/۸۵ درصد، *V.fluvialis* ۱/۸۵ درصد و گونه‌های ویبریوی ناشناخته جداسازی و شناسایی کردند که گونه *V. alginolyticus* با فراوانی ۳۰/۹۵ درصد بیشترین فراوانی را دارا بود و میانگین تعداد کل باکتری‌ها در هپاتوپانکراس میگوها بیشتر از سایر ارگان‌های مورد بررسی بود.

۳-۶-۱- سوابق تحقیق در زمینه پایش عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی در خارج از کشور

از دهه ۱۹۹۰ باکتری های خانواده ویبریو به خصوص *V.harveyi* سبب ضررهای اقتصادی بسیاری به صنعت تکثیر و پرورش میگو در کشورهای آمریکای جنوبی ، آسیا و استرالیا گردیده است که گاه میزان این تلفات به ۱۰۰ درصد می رسید .

در مطالعه Song و همکارانش (۱۹۹۰) تلفات سنگین از مزارع پرورش میگوی کروما (*Mursopenaeus japonicus*) را در تایوان گزارش کردندکه عامل آن باکتری *Vibrio flavialis* بود.

در سال ۱۹۹۰ Lavilla و همکاران مرگ و میر لاروهای میگوی *Penaeus monodon* را به دلیل شیوع باکتری *V.harveyi* و *V.splendidus* در مراکز تکثیر فیلیپین گزارش کرده‌اند.

در بررسی Gomez و همکاران (۱۹۹۸) از هپاتوپانکراس میگوهای غیر بیمار سفید غربی *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *ویبریو دامسلا* و گونه ناشناخته دیگری جداسازی کردند.

در مطالعاتی که در خلیج مکزیک و فلوریدا بر روی میگو های پرورشی و وحشی *Litopenaeus vannamei* ، *Farfantepenaeus aztecus*، *Litopenaeus* setiferus و همچنین بر روی خرچنگ ها صورت گرفته است همگی نشانگر این است که سه تک یاخته نامبرده از شایع‌ترین هم‌خورهای سطحی‌زی بر روی بدن سخت‌پوستان می باشند ودارای گسترش جهانی می‌باشند.

در مطالعه Heidelberg و همکاران در سال ۲۰۰۲ تعداد برخی از گونه های *ویبریو* را در نمونه های آب که از رودخانه چوپانک (خلیج چیزاپیک) طی ۱۵ آوریل تا ۱۶ دسامبر جمع آوری شده بود، شمارش نمودند. آنها تعداد *Vibrio vulnificus*، *V. cholerae*، *V. mimicus* و *V. cincinnatiensis* را در یک لیتر نمونه آب بترتیب ۱۰۰ ؛ ۲ تا ۶۰ ؛ ۲ تا ۶۰ و ۵ تا ۸۰ عدد عنوان نموده است. آنها اظهار نمودند که پایش باکتریها در فصل تابستان نشان دهنده تعداد فراوانتر باکتریها در این فصل نسبت به پاییز بوده است.

در سال ۲۰۰۴ Wen و همکاران اظهار نمودند که برای شمارش باکتریهای هتروتروف هوازی و نیز برای شمارش کل ویبریوها بترتیب از محیطهای کشت TSA وTCBS استفاده کرده اند در این تحقیق نیز از همین محیطها استفاده گردید و میزان نمک آنها در حد ۲ درصد تنظیم شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تجهیزات مورد نیاز

دستگاه ترمال سایکلر، دستگاه میکروسانترفیوژ، دستگاه گرداننده، میکروپیپت، سیستم تصویربرداری دیجیتال، اتوکلاو، انکوباتور، ترازو، هیتر، هود لامینار، چراغ گاز آزمایشگاهی.

۲-۱-۱- لوازم شیشه‌ای و غیره

ظروف نمونه برداری استریل، لوله آزمایش، ارلن، پی پت، پلیت استریل، هاون چین، میله شیشه‌ای ال شکل، قیچی، اسکالپل، پنس و جا لوله ای و وسایل رایج آزمایشگاه میکروبیولوژی

۲-۱-۲- مواد مصرفی

محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA)، محیط کشت سابورودکستروز آگار (SDA)، محیط کشت تیوسولفات سیترات نمک صفراوی ساکارز آگار (TCBS)، کلرید سدیم (NaCl)، اتانول ۹۵ درجه و آب مقطر

۲-۲- محل اجرا

استان بوشهر در جنوب غربی کشور و در فاصله ۲۷ درجه و ۱۷ دقیقه تا ۳۰ درجه و ۱۷ دقیقه عرض جغرافیایی و ۵۰ درجه و ۸ دقیقه تا ۵۲ درجه و ۵۸ دقیقه طول جغرافیایی واقع شده است. این استان از شمال به استان خوزستان و کهکیلویه و بویراحمد، از جنوب خلیج فارس و استان هرمزگان، از شرق به استان فارس و از غرب به خلیج فارس محدود می شود. این پروژه در مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خلیج فارس اجرا شد.

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب نظیر دما، pH، اکسیژن محلول به صورت روزانه (صبح و عصر) اندازه‌گیری و فاکتورهای تعداد کل باکتریها (total count)، تعیین تعداد ویبریوها (*Vibrio* count)، آمونیاک محلول درآب، نیتریت، آمونیوم، نیترات و شوری نیز به صورت هفتگی اندازه‌گیری و در فرم های خاص ثبت شده و نسبت به تغییرات آنها بررسی های لازم صورت گرفت.

برای تعیین تعداد کل باکتریها و تعیین تعداد ویبریوها به روش زیر اقدام شد. از نمونه های آب جدا شده از مکان‌های تعیین شده در طول مسیر انتقال آب از دریا به تانک ها و استخرها، رقت تهیه شد و از هرکدام از رقت‌های تهیه شده (استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷)، ۰/۱ میلی لیتر از آزمونه را با رعایت شرایط استریل روی پلیت حاوی محیط کشت Tryptic Soy Agar تهیه شده با آب دریا (TSA نمکی) ریخته و روی سطح محیط پخش گردید. پس از جذب نمونه تلقیحی پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و تعداد کلنی‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش و ثبت گردید. نتایج محاسبه شده تا دو رقم معنی‌دار گرد شده و به صورت تعداد N باکتری درهر میلی لیتر آب گزارش شدند.

شمارش کلی باکتری های خانواده ویبریوناسه در نمونه های آب استخرهای پرورش میگو مطابق با روش شمارش کلی باکتری های هتروتروف هوازی و بی هوازی اختیاری انجام گردید (استاندارد ملی ایران ۱-۸۹۲۳ و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹) ولی از محیط کشت تیوسولفات - سیترات - نمک صفراوی - ساکارز آگار (TCBS) استفاده شد. ضروری است به صورت دوره‌ای نسبت به نمونه‌گیری از آب تانک‌های پرورشی جهت انجام آزمونهای میکروبیولوژی (باکتری و قارچ) اقدام شد.

برای افزایش احتمال جداسازی قارچ ها از نمونه های آب از محیط های مختلف استفاده می شود. محیط‌های مورد نظر شامل مالت اکسترکت آگار، سیب زمینی دکستروز آگار و روزبنگال آگار می باشد و برای جلوگیری از رشد کردن باکتریها بر روی محیط‌های قارچی و ایجاد اختلال در فرآیند جداسازی و شناسایی آنها از افزودن کلرامفنیکل به تمامی محیط های بهره برده شد. با توجه به حساسیب برخی از ساپروفیت ها به این آنتی‌بیوتیک ضدباکتریایی، همزمان از محیط های فاقد آنتی بیوتیک نیز استفاده گردید..

برای شناسایی قارچ‌های جدا شده از نمونه‌ها، براساس روش‌های رایج در آزمایشگاه و با توجه به کلیدهای تخصصی موجود برای شناسایی قارچ های رشته‌ای (بر اساس اختلاف‌های مرفولوژیک آنها روی محیط کشت) و اقدام گردید.

محیط (Czapek Yeast extract Agar CYA) با فرمولاسیون ارائه شده توسط pitt و Hoking (۲۰۰۹) تهیه و مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

K_2HPO_4	۱ گرم
محیط کشت Czapek	۱۰ میلی لیتر
پودر عصاره مخمر	۵ گرم
Sucrose	۳۰ گرم
Agar	۱۵ گرم
distilled Water	۱ لیتر

برای بررسی دقیق ساختار زایای قارچ ها از روش کشت روی لام استفاده می شود. برای این منظور در یک پلیت خالی استریل مقداری از محیط سابرودکستروز و صبر می‌کنیم تا منعقد شود. بعد با استفاده از اسکالپل استریل مقداری از محیط به ابعاد یک سانتیمتر مربع بریده و در شرایط استریل آنرا روی لام قرار می‌دهیم (می توان لام را چند بار از روی شعله عبور داده تا استریل شود). بعد از اینکه آگار کاملا در مرکز لام قرار گرفت آنرا روی لوله "یو" شکل که درون یک پلیت شیشه‌ای بزرگ است بصورت افقی قرار می‌دهیم. بعد با استفاده از آنس استریل، سوش قارچی مورد نظر را در ۴ نقطه از محیط روی لام تلقیح کنید. یک لامل برداشته و پس از استریل کردن بر روی شعله و خنک کردن در مجاورت شعله آن را روی قطعه آگار تلقیح شده قرار می دهیم. بعضی از

ریسه ها بعد از رشد از آگار خارج شده و به قسمت زیرین لامل می چسبد بطوریکه به آسانی زیر میکروسکوپ دیده می شوند. برای جلوگیری از خشک شدن قطعات آگار در طول مدت انکوباسیون حدود ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل را در داخل پلیت می ریزیم و دقت می کنیم تا آب روی قطعه آگار یا لام و لامل نریزد و درب پلیت را می بندیم. پلیت را بمدت یک هفته در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم. در صورت تبخیر آب درون پلیت می توانید مجدداً به آن آب اضافه کنیم. بعد از انکوباسیون می‌توان لامل را جدا کرده و در زیر میکروسکوپ آنها را بررسی می‌نماییم.

پایش بیماریهای باکتریایی و قارچی در مرحله پست لاروی قبل از ذخیره سازی انجام شد و این مراحل پایشی در F_2 و F_3 نیز تکرار گردید. در هر مرحله از پایش که آزمون باکتری شناسی یا قارچ شناسی مثبت می‌شد، در صورت امکان درمان انجام می گردید.

۳-۲- تعیین جمعیت های اولیه برای تولید میگوی مولد عاری از بیماری خاص

با توجه به اینکه مراکز تکثیر، در طی سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱، مولدین خود را از مولدین پرورشی مراکز پرورش به ویژه در استان‌های بوشهر و هرمزگان تهیه نموده بودند، نسبت به ترسیم تاریخچه مولدین مراکز تکثیر اقدام و مراکز پرورش میگو جهت تهیه و جمع‌آوری مولد انتخاب شد. از این رو در تاریخ ۹۱/۰۶/۰۵ لیست مراکز پرورش میگو همراه با تاریخ تقریبی زمان برداشت برای مولد سازی میگوی عاری از بیماری خاص ارائه گردید. بر اساس مراکز انتخاب شده و به منظور پایش، جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی در تاریخ‌های ۲۵ و ۹۱/۰۶/۲۶ از دو مزرعه در سایت پرورش میگوی حله و در تاریخ‌های ۸ و ۹۱/۰۷/۰۹ از مزارع انتخاب شده در سایت‌های پرورش حله، رودشور و دلوار ۱۴، دلوار ۲ و بندر ریگ، هرکدام ۶۰ قطعه بطور تصادفی نمونه‌گیری صورت گرفت و به آزمایشگاه میکروبشناسی منتقل گردید.

۴-۲- روش شمارش و جداسازی باکتری های خانواده ویبریوناسه و باکتری های هوازی- بی هوازی اختیاری

تهیه محلول های رقیق کننده:

محلول نمکی ۲/۵ درصد:	مقدار
کلرید سدیم (NaCl)	۲۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده شد سپس محلول حاصل را به میزان ۹ میلی لیتر در لوله آزمایش تقسیم کرده و پس از پنبه گذاری، لوله ها را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید (استاندارد ملی ایران ۷۲۲۳).

نمونه گیری به صورت هفتگی، از آب محل تکثیر یا پرورش در ظروف نمونه‌برداری استریل صورت گرفت (برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد).

- آغاز نمونه‌گیری از آبان ۱۳۹۱، نمونه برداری از:
  - از آب دریا در محیط پیرامون ایستگاه پمپاژ، استخر رسوب‌گیر، استخر کلرزنی و تانک های سالن قرنطینه
- در بهمن و اسفند ۹۱ و فروردین ۹۲ نمونه برداری از:
  - آب دریا (استخرهای رسوب گیر و کلرزنی)
  - تانک‌های سالن قرنطینه
  - استخرهای گلخانه
- در اردیبهشت و تیر ۹۲ نمونه برداری از:
  - آب دریا (استخرهای رسوب‌گیر و کلرزنی)
  - بعد از فیلتراسیون
  - تانک های مولدین نر
  - تانک های مولدین ماده
- در مرداد تا مهر ماه سال ۹۲ نمونه‌گیری از:
  - آب دریا (استخرهای رسوب‌گیر و کلرزنی)
  - بعد از فیلتراسیون
  - تانک‌های نگهداری مولدین
- از آبان ماه سال ۹۲ تا اردیبهشت ماه سال ۹۳ نمونه‌گیری از:
  - آب دریا (استخرهای رسوب‌گیر و کلرزنی)
  - بعد از فیلتراسیون
  - تانک‌های سالن قرنطینه
  - استخرهای گلخانه
- از خرداد تا مرداد ماه سال ۹۳ نمونه‌گیری از:
  - آب دریا (استخرهای رسوب‌گیر و کلرزنی)
  - بعد از فیلتراسیون
  - تانک‌های سالن قرنطینه

تهیه رقت از نمونه:

در صورتی که نمونه نیاز به رقیق شدن داشته باشد در کنار شعله و توسط پی پت استریل، ۱ میلی‌لیتر از نمونه را به ۹ میلی لیتر محلول نمکی ۲/۵ درصد استریل اضافه و به آرامی مخلوط گردید (رقت ۰/۱).

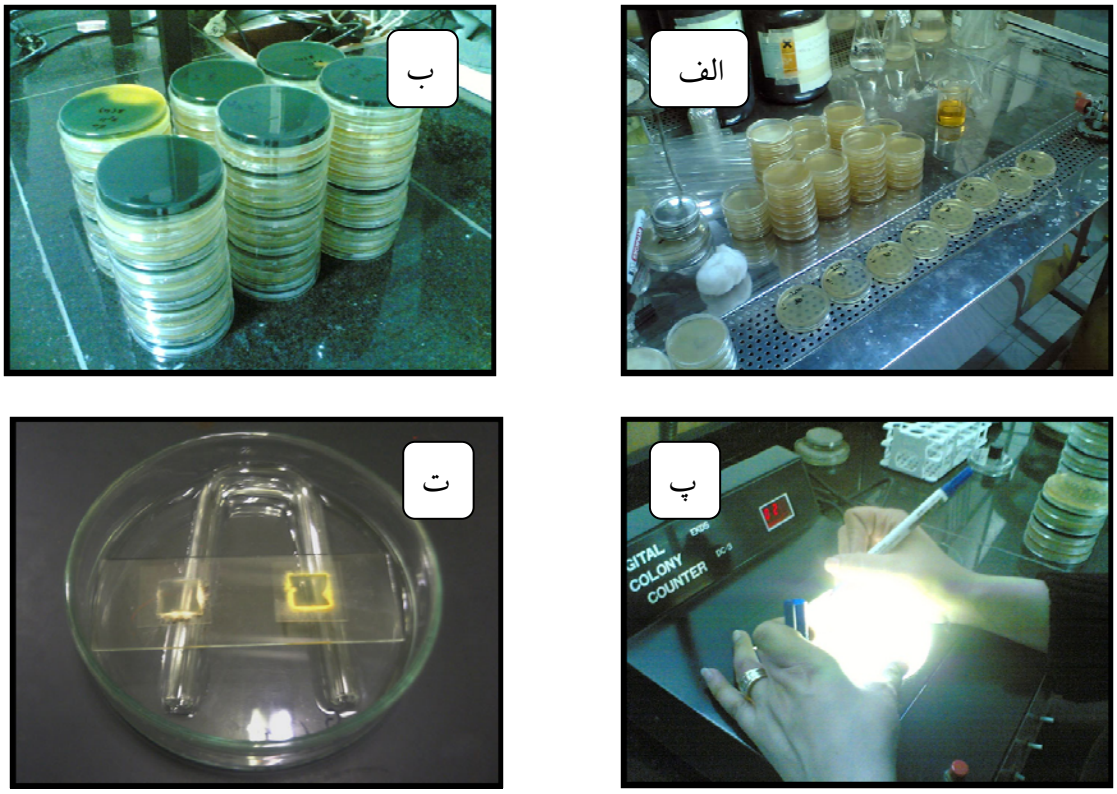
از لوله اول (رقت ۰/۱) ۱ میلی لیتر به ۹ میلی لیتر محلول نمکی ۲/۵ درصد استریل اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید (رقت ۰/۰۱) و این مراحل را تا تهیه رقت مورد نظر، به گونه ای که تعداد مورد انتظار کلنی های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد و تعداد کل کلنی های تیپیک و غیرتیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ باشد ادامه داده شد.

روش کشت:

برای هر رقت حداقل دو پلیت محیط کشت در نظر گرفته شد، تمام نمونه ها و رقت های تهیه شده توسط شیکر مکانیکی به مدت ۱۵ ثانیه خوب مخلوط گردید و سپس ۰/۱ میلی لیتر از آزمونه روی پلیت ریخته شد و با میله شیشه ای ال شکل که قبلاً توسط الکل ۷۰درصد و شعله استریل شده است روی سطح محیط پخش گردید. پس از جذب نمونه تلقیحی، پلیت ها را به صورت وارونه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. تعداد کلنی ها روی پلیت ها در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش وثبت گردید.

۵-۲- مطالعات موردی

در کلیه مراحل اجرای پروژه، بر اساس نیاز از میگوهای مشکوک، تجهیزات ضدعفونی آب و غیره نمونه‌گیری و مطابق با اصول میکروب‌شناسی آزمون های ضروری صورت گرفت.



الف و ب) کشت از رقت های مختلف، بر روی محیط های TSA و TCBS، پ) شمارش کلنی‌ها به کمک کلنی‌کانتر، ت) کشت روی لام (Slide Culture) برای مشاهد دقیق اندام زایای کلنی های کپکیو شناسایی آنها

۳- نتایج

جدول ۴- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – آبان ماه ۱۳۹۱

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست آبان ۹۱	ایستگاه پمپاژ	24.26±0.31	7.59±0.11	*Aspergillus spp.* *Candida albicans* *Penicillium spp.* *Cladosporium spp.* *Mucor spp.*
	استخر رسوب‌گیر	15.96±0.48	8.31±0.31	*Aspergillus spp.* *Aspergillus niger*
	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	سالن قرنطینه	5.3±0.11	1.57±0.11	
نیمه دوم آبان ۹۱	ایستگاه پمپاژ	27.95±0.3	23.26±0.42	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Alternaria spp.* *Mucor spp.* *Rhizopus spp.* *Unkown colony*
	استخر رسوب‌گیر	23.35±0.42	19.2±0.37	
	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	سالن قرنطینه	14.01±0.42	11.97±0.1	*Aspergillus niger*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۵- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – آذر ماه ۱۳۹۱

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست آذر ۹۱	ایستگاه پمپاژ	27.9±0.23	21.49±0.55	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Cladosporium spp.* *Mucor spp.* *Geotrichum spp.*
	استخر رسوب‌گیر	19.11±0.31	17.08±0.88	*Aspergillus flavus*
	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	سالن قرنطینه	14.67±0.18	12.54±0.26	

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
Candida albicans *Penicillium spp.* *Cladosporium spp.* *Mucor spp.* *Geotrichum spp.*	6.44±0.22	12.57±0.38	ایستگاه پمپاژ	نیمه دوم آذر ۹۱
	6.75±0.91	14.62±0.13	**استخر رسوب‌گیر**	
	0±0*	0±0*	**استخر کلرزنی**	
Penicillium spp. *Aspergillus niger*	2.33±0.78	3.48±0.91	**سالن قرنطینه**	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول۶ - شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – دی ماه ۱۳۹۱

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
Aspergillus flavus *Candida albicans* *Alternaria spp.* *Rhodotorula spp.* *Mucor spp.*	34.28±0.22	28.94±0.87	ایستگاه پمپاژ	نیمه نخست دی ۹۱
Aspergillus spp.	31.08±0.25	20.18±0.24	استخر رسوب‌گیر	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
Aspergillus niger	3.12±0.4	2.37±0.41	سالن قرنطینه	
Penicillium spp. *Fusarium spp.* *Mucor spp.* *Geotrichum spp.*	24.29±0.79	17.24±0.09	ایستگاه پمپاژ	نیمه دوم دی ۹۱
	20.97±0.45	10.35±0.82	استخر رسوب‌گیر	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
Aspergillus niger	2.94±0.27	1.84±0.26	سالن قرنطینه	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول۷- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – بهمن ماه ۱۳۹۱

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
Aspergillus spp. *Penicillium spp.* *Mucor spp.*	29.60±0.31	31.12±0.24	ایستگاه پمپاژ	نیمه نخست بهمن ۹۱
Aspergillus spp. *Alternaria spp.*	33.11±0.42	27.27±0.35	استخر رسوب‌گیر	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
	2.08±0.33	3.44±0.60	سالن قرنطینه	
Aspergillus flavus *Candida albicans* *Penicillium spp.* *Rhodotorula spp.* *Mucor spp.*	29.39±0.55	15.34±0.15	ایستگاه پمپاژ	نیمه دوم بهمن ۹۱
	22.52±0.51	11.47±0.89	استخر رسوب‌گیر	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
Penicillium spp. *Aspergillus niger*	3.08±0.88	2.64±0.97	سالن قرنطینه	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۸۰- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – اسفند ماه ۱۳۹۱

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
Aspergillus spp. *Cladosporium spp.*	3.40±0.02	3±0.00	استخر گلخانه ۱	نیمه نخست اسفند ۹۱
Cladosporium spp.	6.30±0.05	3±0.00	استخر کلخانه ۲	
Aspergillus flavus	82.00±2.1	0±0*	استخر کلرزنی	
Aspergillus spp.	73.32±4.62	49.64±8.36	استخر ذخیره آب	
	4.21±0.08	4.14±0.11	استخر گلخانه ۱	نیمه دوم اسفند ۹۱
Aspergillus spp.	5.86±0.48	5.27±0.54	استخر کلخانه ۲	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
	58.38±3.47	7.78±1.83	استخر ذخیره آب	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۹- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – فروردین ماه ۱۳۹۲

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
Aspergillus flavus *Penicillium spp.*	263.24±21.44	124.31±18.21	استخر گلخانه ۱	نیمه نخست فروردین ۹۲
Aspergillus spp. *Aspergillus niger*	59.67±17	39.38±11.47	استخر کلخانه ۲	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
Mucor spp.	6.20±0.33	3.88±0.11	استخر ذخیره آب	
Penicillium spp. *Cladosporium spp.*	33.62±9.27	20.14±8.07	استخر گلخانه ۱	نیمه دوم فروردین ۹۲
Alternaria spp.	12.84±3.12	6.44±38.33	استخر کلخانه ۲	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	
Mucor spp.	9.12±1.08	1.53±0.40	استخر ذخیره آب	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۰- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – اردیبهشت ماه ۱۳۹۲

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
	0.3±0.00	0±0*	استخر کلرزنی	نیمه نخست اردیبهشت ۹۲
Aspergillus spp.	1.25±0.00	0±0*	استخر ذخیره آب	
	11.87±0.10	12.66±0.40	تانک مولدین نر	
Aspergillus spp.	15.03±10	0±0*	تانک مولدین ماده	
	1.55±0.27	0±0*	استخر کلرزنی	نیمه دوم اردیبهشت ۹۲
	3.41±0.78	4.14±0.39	استخر ذخیره آب	
	9.87±0.30	16.07±0.37	تانک مولدین نر	
Aspergillus spp.	19.11±2.64	6.24±0.19	تانک مولدین ماده	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۱- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – خرداد ماه ۱۳۹۲

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
	1.03±0.01	0±0*	استخر کلرزنی	نیمه نخست خرداد ۹۲
Aspergillus spp. *Aspergillus flavus* *Mucor spp.*	65.26±5	3.35±0.03	استخر ذخیره آب	
	1.64±0.01	2.19±0.24	تانک مولدین نر	
Aspergillus spp.	10.27±1	8.66±1.09	تانک مولدین ماده	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	نیمه دوم خرداد ۹۲
Mucor spp.	33.34±3.47	8.70±2.07	استخر ذخیره آب	
Aspergillus spp.	4.68±0.12	2.28±0.08	تانک مولدین نر	
Aspergillus spp. *Aspergillus niger*	8.51±1.89	10.08±2.73	تانک مولدین ماده	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول۱۲- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – تیر ماه ۱۳۹۲

گونه قارچ	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	شمارش باکتری / مکان نمونه برداری	
Aspergillus flavus *Candida albicans*	12.87±2.15	25.00±2.50	استخر کلرزنی	نیمه نخست تیر ۹۲
–	–	–	استخر ذخیره آب	
Aspergillus spp. *Penicillium spp.*	1890±74.95	10±0.16	تانک مولدین نر	
Aspergillus flavus	660±32.48	0.18±0.0156	تانک مولدین ماده	
	0±0*	0±0*	استخر کلرزنی	نیمه دوم تیر ۹۲
Mucor spp.	8.34±0.88	4.28±1.06	استخر ذخیره آب	
Aspergillus spp. *Aspergillus niger*	22±4.95	14±2.24	تانک مولدین نر	
Aspergillus spp. *Aspergillus niger*	28±5.76	19.63±4.09	تانک مولدین ماده	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۳- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – مرداد ماه ۱۳۹۲

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست مرداد ۹۲	استخر کلرزنی	0.45±0.036	4±1.21	*Aspergillus flavus*
	استخر ذخیره آب	0.13±0.012	9.82±1.89	*Aspergillus spp.*
	تانک‌های مولدین	12.88±2.15	23.6±4.12	
	تانک‌های پست لارو	3.33±0.10	12.79±3.04	
نیمه دوم مرداد ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	5.29±1.44	4.22±0.09	*Aspergillus spp.*
	تانک‌های مولدین	19.72±2.66	72.25±7.22	*Penicillium spp.*
	تانک‌های پست لارو	0.88±0.02	77.66±7.48	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۴- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – شهریور ماه ۱۳۹۲

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست شهریور ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0.181±0.0181	5.45±0.73	
	تانک‌های مولدین	33.54±3.492	829.09±77.65	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus* *Penicillium spp.*
	تانک‌های پست لارو	38.18±3.726	947.27±83	
نیمه دوم شهریور ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0.909±0.01	17.27±8.13	
	تانک‌های مولدین	2.72±0.01	44.54±12.73	*Aspergillus spp.*
	تانک‌های پست لارو	3.18±0.04	80.9±17.15	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۵- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – مهر ماه ۱۳۹۲

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست مهر ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	1.00±0.00	6.00±0.53	*Aspergillus niger*
	تانک‌های مولدین	20.35±0.45	394.11±39.7	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus*
	تانک‌های پست لارو	2.50±0.02	224.61±29.93	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus*
نیمه دوم مهر ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	1.06±0.001	12.67±1.93	*Penicillium spp.*
	تانک‌های مولدین	13.54±0.67	177.19±26.61	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus*
	تانک‌های پست لارو	2.77±0.05	56.22±47.54	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول۱۶- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – آبان ماه ۱۳۹۲

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست آبان ۹۲	استخر کلرزنی	1.12±0.01	2.08±0.02	*Penicillium spp.*
	استخر ذخیره آب	1.61±0.01	4.22±0.01	
	تانک‌های مولدین	10.50±4.47	91.57±19.08	*Aspergillus spp.*
	استخرهای گلخانه	24.00±6.85	96.95±18.01	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus* *Cladosporium spp.* *Aspergillus niger*
نیمه دوم آبان ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	2.50±0.01	7.08±0.05	
	تانک‌های مولدین	20.50±6.32	71.16±16.85	
	استخرهای گلخانه	46.51±9.59	139.34±21.58	*Aspergillus spp.*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۷- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – آذر ماه ۱۳۹۲

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست آذر ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	4.75±0.96	6..15±14.97	*Alternaria spp.*
	تانک‌های مولدین	2.37±0.35	3.52±0.02	
	استخرهای گلخانه	1.53±0.01	34.22±11.66	*Aspergillus flavus* *Cladosporium spp.*
نیمه دوم آذر ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	1.64±0.001	0±0*	
	تانک‌های مولدین	15.08±5.38	64.51±16	
	استخرهای گلخانه	2.09±0.01	69.71±16.61	*Penicillium spp.* *Alternaria spp.* *Aspergillus niger*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۸- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – دی ماه ۱۳۹۲

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست دی ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	2.54±0.11	7.08±0.21	
	تانک‌های مولدین	14.14±1.67	79.28±17.78	*Aspergillus spp.*
	استخرهای گلخانه	5.27±0.02	44.42±16.61	*Aspergillus spp.*
نیمه دوم دی ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	2.55±0.24	7.33±0.34	
	تانک‌های مولدین	63.5±11.22	91.56±19.08	*Aspergillus flavus* *Penicillium spp.*
	استخرهای گلخانه	6.55±0.00	37.39±16.61	*Cladosporium spp.* *Alternaria spp.* *Aspergillus niger*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۱۹ - شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – بهمن ماه ۱۳۹۲

مکان نمونه برداری / شمارش باکتری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست بهمن ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	16.22±1.41	2.88±0.07	
	تانک‌های مولدین	6.61±0.01	68±16.61	*Aspergillus flavus*
	استخرهای گلخانه	3.53±0.41	430.22±41.52	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Aspergillus niger* *Geotrichum spp.*
نیمه دوم بهمن ۹۲	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	4.50±0.11	15.07±0.08	
	تانک‌های مولدین	2.27±0.10	79.61±17.89	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.*
	استخرهای گلخانه	1.52±0.01	273.14±17.11	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Alternaria spp.* *Geotrichum spp.*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۲۰- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و گونه های قارچی در نمونه‌های آب – اسفند ماه ۱۳۹۲

مکان نمونه برداری / شمارش باکتری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست اسفند ۹۲	استخر کلرزنی	8.42±0.14	3.34±0.09	*Aspergillus flavus* *Aspergillus niger*
	استخر ذخیره آب	68.08±0.14	6.12±0.66	*Aspergillus spp.*
	تانک‌های مولدین	188.44±1.83	99.11±6.30	*Penicillium spp.* *Aspergillus niger*
	استخرهای گلخانه	1.07±0.02	7.21±0.02	
نیمه دوم اسفند ۹۲	استخر کلرزنی	198.40±1.00	1.23±0.07	
	استخر ذخیره آب	17.42±1.21	5.88±0.02	*Aspergillus spp.*
	تانک‌های مولدین	141.15±1.41	91.17±19.18	
	استخرهای گلخانه	0.12±0.01	337.65±36.77	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus* *Alternaria spp.* *Aspergillus niger*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۲۱ - شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب - فروردین ماه ۱۳۹۳

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		ویبریوناسه CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست فروردین ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	16.51±1.41	24.22±2.10	*Aspergillus spp.* *Mucor spp.*
	تانک‌های مولدین	0.58±0.03	56.54±15.11	
	استخرهای گلخانه	6.73±0.03	176.35±26.61	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.*
نیمه دوم فروردین ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0±0*	9.56±0.84	*Aspergillus spp.* *Alternaria spp.* *Mucor spp.*
	تانک‌های مولدین	14.51±1.16	114.47±21.45	*Penicillium spp.* *Aspergillus niger*
	استخرهای گلخانه	9.32±0.06	110.51±21.07	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus* *Penicillium spp.* *Alternaria spp.* *Mucor spp.*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۲۲- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب - اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		ویبریوناسه CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست اردیبهشت ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	1.25±0.28	8.44±1.08	*Aspergillus flavus* *Alternaria spp.*
	تانک‌های مولدین	3.94±0.03	178.49±26.76	
	استخرهای گلخانه	40.08±9.22	262.31±32.43	*Aspergillus spp.* *Aspergillus niger*
نیمه دوم اردیبهشت ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	21.31±0.99	
	استخر ذخیره آب	4.14±0.14	29.24±1	*Aspergillus spp.* *Mucor spp.*
	تانک‌های مولدین	33.51±8.24	317.65±35.67	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Cladosporium spp.*
	استخرهای گلخانه	5.58±0.20	131.81±22.98	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Aspergillus niger*

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۲۳- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب - خرداد ماه ۱۳۹۳

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		ویبریوناسه CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست خرداد ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0±0*	24.18±0.35	*Mucor spp.*
	تانک‌های مولدین	3.59±0.02	30±11.14	*Aspergillus spp.* *Aspergillus niger*
	تانک‌های قرنطینه	5.21±0.15	12.33±3.10	
نیمه دوم خرداد ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0±0*	3.22±0	*Aspergillus niger* *Mucor spp.*
	تانک‌های مولدین	8.22±0.05	39.65±12.65	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus*
	تانک‌های قرنطینه	1.58±0.12	11.65±1.2	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۲۴- شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب - تیر ماه ۱۳۹۳

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		ویبریوناسه CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست تیر ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	2.22±0.01	12.64±1.52	*Mucor spp.*
	تانک‌های مولدین	6.27±0.13	60.91±15.62	*Aspergillus flavus* *Penicillium spp.* *Aspergillus niger*
	تانک‌های قرنطینه	0±0*	12.21±1.45	
نیمه دوم تیر ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0±0*	8.58±0.11	
	تانک‌های مولدین	16.5±5.83	80.82±8.21	*Aspergillus spp.* *Aspergillus niger*
	تانک‌های قرنطینه	4.62±0.01	5.38±0.12	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

جدول ۲۵ - شمارش کلی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و باکتری‌های خانواده ویبریوناسه و گونه های قارچی در نمونه‌های آب - مرداد ماه ۱۳۹۳

شمارش باکتری / مکان نمونه برداری		*ویبریوناسه* CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	هوازی بی هوازی اختیاری CFU ml^{-1} ($\times 10^2$)	گونه قارچ
نیمه نخست مرداد ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0±0*	3.23±0.06	
	تانک‌های مولدین	3±0.01	17±0.06	
	تانک‌های قرنطینه	0.56±0.00	56.58±15.17	*Aspergillus spp.*
نیمه دوم مرداد ۹۳	استخر کلرزنی	0±0*	0±0*	
	استخر ذخیره آب	0.05±0.01	52.30±3.24	*Aspergillus spp.* *Aspergillus flavus*
	تانک‌های مولدین	31.67±0.01	269.19±23.22	*Aspergillus spp.* *Penicillium spp.* *Aspergillus niger*
	تانک‌های قرنطینه	3.19±0.02	13.67±7.48	

* باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نبود.

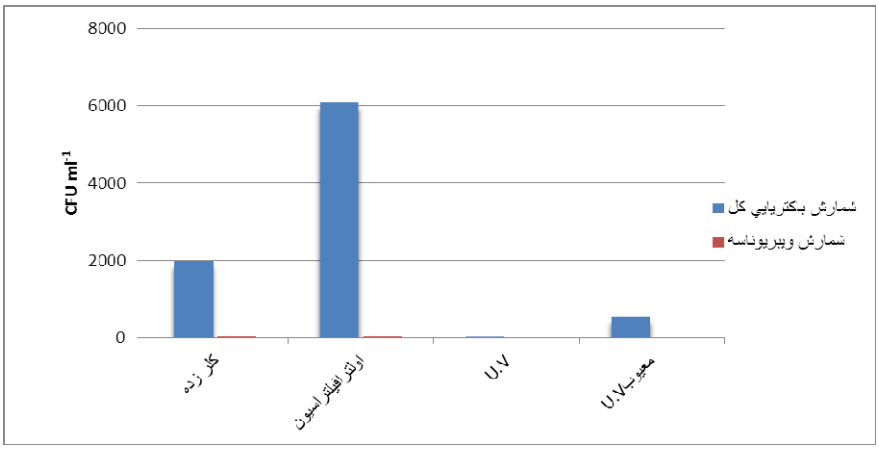
۱-۳- نتایج مطالعات موردی

در بررسی نمونه های کلرزده شده (نیمه دوم شهریور ۱۳۹۱) با توجه به پایین بودن تعداد کل باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* و بالاتر بودن بار باکتریایی کل، می توان اعلام نمود که میزان کلر استفاده شده از کفایت لازم برخوردار نبوده و توصیه شد از دوز تعریف شده در دستورالعمل‌های بهداشتی استفاده شود.

بررسی نمونه‌های دستگاه اولترافیلتراسیون در تیرماه سال ۹۲ نشان داد که اثر مطلوبی بر باکتری‌های خانواده *ویبریوناسه* داشته ولی فراوانی باکتری‌های *ویبریوناسه* را به صفر نمی‌رساند. در شمارش کلی باکتری‌ها مشخص شد که اولترافیلتراسیون آب ورودی، فراوانی باکتری‌ها را تا ۳ برابر افزایش می‌دهد. در این مرحله باکتری‌های موجود در آب دریا وارد محیط شده و موجب تشکیل شدن کلنی‌های باکتریایی در فیلترهای دستگاه می‌شدند. پیشنهاد گردید، دستگاه با مواد ضدعفونی کننده‌ی دیگری بجز کلر (مواد ضدعفونی کننده رنگی مانند آیودین به دلیل تغییر رنگ فیلترهای دستگاه توصیه نشد) ضدعفونی شود.

جدول ۲۶- نتایج آزمون شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش باکتری‌های ویبریوناسه مربوط به بررسی کارایی سیستم کلرزنی، دستگاه اولترافیلتراسیون و UV

ردیف	نوع نمونه	مکان نمونه برداری	تاریخ دریافت نمونه	نتایج آزمون	
				شمارش کل باکتریایی ($\times 10^2$ CFU ml^{-1})	شمارش کل ویبریوناسه ($\times 10^2$ CFU ml^{-1})
۱	آب	استخر کلر زنی	۹۲/۰۴/۱۶	19.8±2.83	0.5±0.14
۲	آب	بعد از اولترافیلتراسیون	۹۲/۰۴/۱۶	60.90±0.92	0.01±0.007
۳	آب	بعد از تیمار با UV سالم (سه خانه)	۹۲/۰۴/۱۶	0.14±0.07	باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نیست
۴	آب	بعد از تیمار با UV معیوب (چهار خانه)	۹۲/۰۴/۱۶	0.42±0.21	باکتری در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نیست



نمودار ۱- نمودار مربوط به شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش باکتری‌های ویبریوناسه مربوط به بررسی کارایی سیستم کلرزنی، دستگاه اولترافیلتراسیون و UV

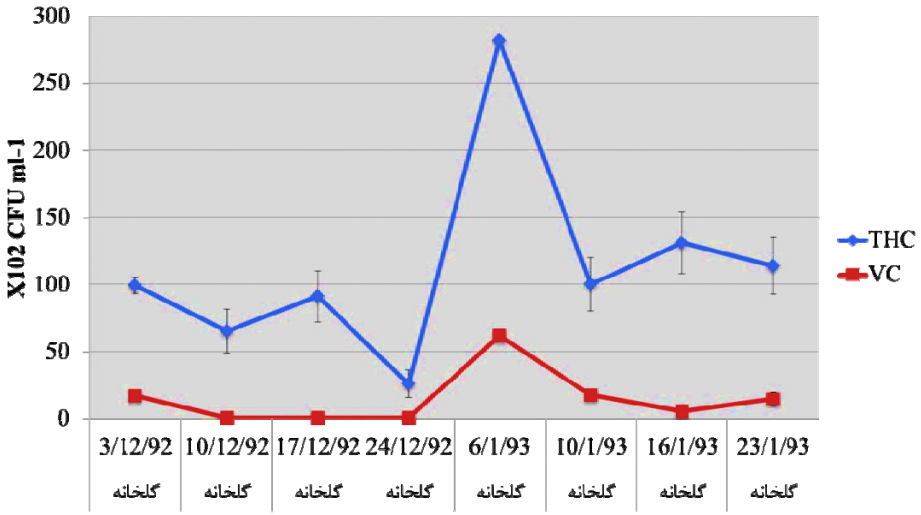
در بررسی دستگاه UV مشخص شد که یک لامپ از مجموع ۴ لامپ دستگاه فاقد عملکرد بوده و به منظور تعیین میزان عملکرد دستگاه، به دو صورت نمونه‌برداری صورت گرفت؛ حالت اول، وقتی که هر چهار کانال باز باشد و حالت دوم، زمانی که کانال دارای لامپ معیوب از سیستم عبور آب خارج گردد. در حالت چهار کاناله، میزان باکتری های خانواده *ویبریوناسه* صفر شد اما میزان کلی باکتریهای هوازی به یک یازدهم تقلیل یافت اما صفر نشد. در حالت سه کاناله، در این حالت میزان باکتری های خانواده *ویبریوناسه* صفر شد و میزان کلی باکتری‌ها بسیار کم شد اما باز هم صفر نشد.

نتایج دستگاه UV نشان داد که یکی از دلایل عدم کارایی مورد انتظار دستگاه، از کار افتادن یکی از لامپ‌های UV بود. همچنین با توجه به زنگ زدگی جداره داخلی دستگاه، شیشه کوارتز دستگاه که بین لامپ و آب قرار

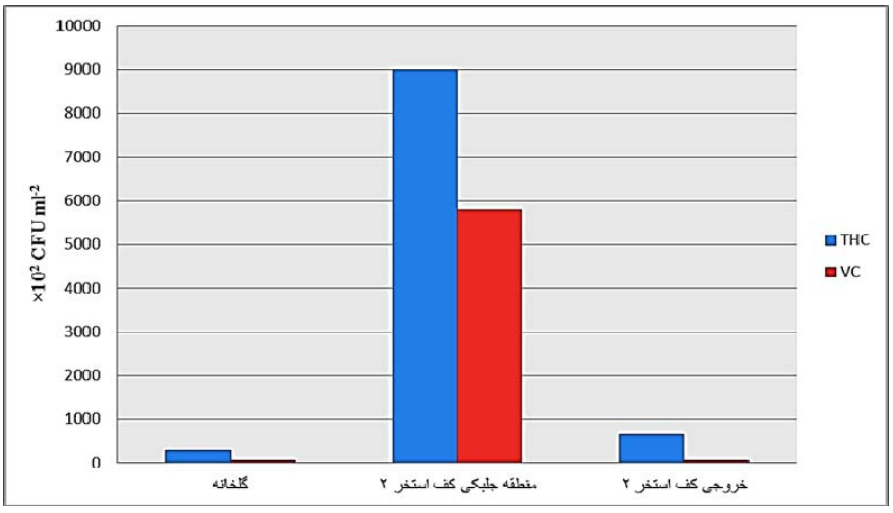
دارد و با کوچکترین آلودگی بر روی این شیشه قدرت تابشی لامپ‌ها کاهش می‌یابد. از این رو اقدامات لازم برای جایگزین کردن لوله و اتصالات PVC با استیل بکار رفته در دستگاه انجام شد.

۲-۳- بررسی علت تلفات میگوها در فروردین ۹۳

در تاریخ ۶ فروردین ۱۳۹۳ ، مرگ و میر میگو از استخر گلخانه گزارش گردید که پس از اعزام کارشناسان و نمونه برداری فراوانی باکتریایی در آب و کف استخر نسبت به اسفند ماه بالاتر بود و نمونه‌برداری جهت احتمال وجود عامل بیماریزای باکتریایی و قارچی نیز صورت گرفت.



نمودار ۲- نمودار فراوانی باکتریایی کل و خانواده ویبریوناسه در گلخانه از اسفند ۱۳۹۲ لغایت فروردین ۱۳۹۳



نمودار ۳- فراوانی باکتری های هتروتروف هوازی و بیهوازی اختیاری و خانواده ویبریوناسه در بخش های مختلف استخر گلخانه پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص (بندرگاه) ۶ فروردین ۱۳۹۳

بر اساس نتایج آزمون های صورت گرفته کلیه عوامل احتمالی میکروبی منفی بود و علت مرگ و میر با توجه به بالا بودن فراوانی باکتریایی در آب و کف استخر و همچنین تجمع جلبکی در کف، کمبود اکسیژن و شکست شکوفایی پلانکتونی اعلام شد که با تعویض آب و انتقال میگوها به استخر مجاور مشکل برطرف گردید.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

تعریف واقعی میگوی عاری از بیماری خاص به معنی عاری بودن از هرگونه پاتوژن یا میکروارگانیسمی اختصاصی است که موجب مرگ و میر وتلفات در میگوها می‌شود. این وضعیت میگوها بسته به سطوح ایمنی زیستی و محیط جغرافیائی و گونه میگو متفاوت است. به منظور تضمین تولید میگوی عاری از بیماری خاص نیاز به برنامه ریزی راهبردی و ایجاد یک شبکه مدیریتی قوی استقرار سیستم های بهداشتی، ایمنی زیستی و برقراری شرایط قرنطینه ای و ایزوله برای عدم ورود، انتقال و سرایت یک عفونت به آب و میگوها در مدت زمان مشخص و نظام‌مند می باشد تا بتوان محافظت در مقابل تهدیدات منابع خارج و داخل تاسیسات را افزایش داد.

پس از استقرار سیستم ایمنی زیستی در پایلوت تولید میگوی عاری از بیماری خاص و اجرای سیستم‌های مراقبتی بر اساس اهداف این پروژه پایش عوامل باکتریایی و قارچی در فازهای اجرا و نسل‌های F_0 تا F_2 صورت گرفت و میزان شیوع عوامل باکتریایی و قارچی در جداول ارائه شده در بخش نتایج درج شده است.

اهداف پیش‌بینی شده در اجرای این پروژه، پایش مستمر عوامل باکتریایی و قارچی و تمهیدات لازم برای بهبود به موقع مشکلات مشاهد شده بود. در صورت مشاهد افزایش باکتریهای ویبریوناسه یا توتال کانت بیش از حد مجاز (که با توجه به استانداردهای بدست آمده از مطالعات قبلی تعریف شده بود، Eslami and Mokhaier, 2001؛ دشتیان‌نسب و همکاران ۱۳۸۹؛ میربخش و همکاران ۱۳۸۹) قبل از ارسال گزارش مکتوب، برای اجتناب از بروز هر گونه مشکل و تسریع در کار، سریعاً اقدامات لازم برای بهبود شرایط به اطلاع همکاران مستقر در پایلئت داده می شد و در زمان مناسب، گزارش تایید شده برای آنها ارسال می گردید.

لازم به تاکید است که گرچه نمونه‌گیری‌های دوره ای از آب، بصورت ۲ هفته در میان انجام گردید ولی نظارت بهداشتی و کشیک‌های پایش استقرار دستورالعمل های مربوط به ایمنی زیستی، بصورت روزانه و با دقت کامل انجام می‌شد. با توجه به نتایج (جداول ۲ الی ۲۴)، مشخص می‌شود که سیستم کلرزنی توانایی حذف مناسب باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی و همچنین باکتری‌های *ویبریوناسه* را داشته و صرفاً در موارد اندکی که شاید دستورالعمل‌های تدوین شده در خصوص محاسبه میزان لازم کلر به درستی انجام نشده بود، حذف کامل باکتری‌ها مشاهد نشد که سریعاً با اصلاح روش کار، یادآوری مجدد اهمیت کلرزنی در ضدعفونی و سلامت آب ورودی و نمونه‌گیری مجدد مشکل برطرف می‌شد.

جنس‌های قارچی جدا شده از تمامی نمونه‌ها، صرفاً جنس‌های ساپروفیت بوده و پاتوژن نمی‌باشند. فقط یک مورد قارچ *Fusarium spp.* در نمونه آب ایستگاه پمپاژ مشاهد شد (نیمه دوم دی ماه ۹۱) و نتایج سایر بررسی ها در طول دوره پرورش نشان می‌دهد که کلرزنی مناسب و رعایت نمودن دستورالعمل‌های مربوط به ضدعفونی کردن آب ورودی به پایلوت، موجب حذف عوامل قارچی در آب ورودی می گردد.

مشاهده قارچ مخمری *Candida albicans* در نمونه های آب ایستگاه پمپاژ نشان داد که آب ورودی به ایستگاه در معرض آلودگی با فاضلاب شهری قرار داشته (Cook and Schlitzer, 1981) و باید ضدعفونی کردن آب، با دقت انجام گردد. با توجه به عدم مشاهد مخمر نامبرده در سایر نمونه های آب، می توان به این نتیجه رسید که ساختار تعبیه شده برای فیلتراسیون و ضدعفونی کردن آب ورودی، در حذف عناصر قارچی نامطلوب، تواناست.

پیشنهادها

- بررسی امکان تولید میگوی عاری از بیماری خاص از گونه های بومی
- تلاش در جهت آموزش فراگیران مراکز تکثیر در خصوص تولید میگوهای با سلامت بالا
- انجام مطالعات تکمیلی، در خصوص به‌گزینی و اصلاح نژاد میگوهای SPF

منابع

۱. استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷، سال ۱۳۸۶، آیین کار آزمون های میکروبیولوژی آب، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۲. استاندارد ملی ایران ۷۲۲۳، سال ۱۳۸۲، آب - جستجو و شناسایی ویبریوکلرا –روش آزمون میکروبیولوژی، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۳. استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹ : سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام–راهنمای الزامات کلی برای آزمون ، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۴. استاندارد ملی ایران ۱-۸۹۲۳ : سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی- قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۵. آوخ کیسمی،م. ۱۳۷۷ .بررسی آلودگی ویبریوزیس در مزارع پرورش میگوی منطقه حله بوشهر. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور.

۶. حسین خضری، پریسا. ۱۳۸۳. بررسی فلور قارچی میگوی سفید هندی در مزارع پرورش میگو واقع در سایت حله – بوشهر. ص ۱۷۷-۱۶۹

۷. دشتیان نسب، ع.، میربخش م.، افشار نسب م.، یگانه و.، قائدنیا ب.، ۱۳۸۹ ، بررسی عوامل بیماریزای باکتریایی در مراکز تکثیر میگوی سفید هندی(*Penaeus indicus*) در استان بوشهر، سومین همایش ملی میگوی ایران، آذر ۸۹

۸. مجدی نسب، ف، ۱۳۷۶، مدیریت بهداشت در استخرهای پرورش میگو. اداره کل آموزش و ترویج معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. ص ۳۵-۲۴.

۹. میربخش م.، دشتیان نسب، ع .، افشار نسب م.، یگانه و.، قائدنیا ب.، ۱۳۸۹ ، بررسی میزان فراوانی و گوناگونی گونه های ویبریو در میگوهای پرورشی سفید غربی استان بوشهر، سومین همایش ملی میگوی ایران، آذر ۸۹

10. Brock, J.A. and Lightner, D.V. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.) Diseases of Marine Animals Vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.
11. Cook WL, Schlitzer RL. Isolation of Candida albicans from freshwater and sewage. Appl Environ Microbiol. 1981 Mar;41(3):840–842.
12. Eslami F, Mokhaier B (2001) Report of infection percentage of *Penaeus semisulcatus* to Epipenaeon elegans in Bushehr provience. Iranian Sientific Fisheries Journal 4: 89-96.
13. Gomez B.G., Mayen L.T., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Goerra F., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus* v*annamei*. Aquaculture 163 ,pp. 1–9.
14. Itani, G., Makoto, K., Shirayama, Y., 2002. Behaviour of the shrimp ectosymbionts, Peregrinamor ohshimai (Mollusca: Bivalvia) and Phyllodurus sp. (Crustacea: Isopoda) through ecdyses. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 82, 69–78.
15. Johnson SK (1978) Handbook of shrimp diseases. Texas A&M University Sea Grant College Program. Texas Publication TAMU-SG, pp 75-603.
16. Lavilla - pitogo, C. R., C. L. Baticados, E. R. Cruz - Lacierda and L. D. de la pena. 1990 Occurance of luminus bacterial dicease of penaeus *monodon larvae* in the Philippines. Aquaculture 91:1-3
17. Lightner D.V. (ed.). 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 pp.

18. Lightner DV (1996) A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 4 The World Aquaculture Society.
19. Pitt J.I.and Hocking A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. New York: Springer.
20. Sindermann CJ. 1990. (eds) Developments in aquaculture and fisheries science. Elsevier, Amsterdam, p 42-47.
21. Song, Y.L., Cheng, W., Wang, C.H., 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. J. Invertebr. Pathol. 61, 24–31.
22. Song, Y.L., Cheng, W.1990. Occurrence of vibrio vulnificus in Taiwan. National science coucil. Taipei, P. 172-179.

Abstract
Shrimp aquaculture as one of the most important activities in the world and Iran is expanding. Bacteria and fungi of the most common infectious agents causing diseases are in the hatchery and shrimp. The most important bacteria causing diseases in the hatcheries and shrimp Farms, bacteria are *Vibrionaceae* family. The fungi can be identified as *Fusarium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* and yeast. Utilized of water supply system in this project for breeding and reproduction of shrimp is a controlled system. The purpose of this action, control and stabilization of water quality during the breeding period and in all sectors. This system act as a part of biological security. Incoming water before the utilization was monitored for the total bacteria count, fungi and as well as *Vibrionaceae* family, each 15 days. If contamination is too predictable, additional tests and necessary treatments were carried out to improve the quality of the water. The water, after use in the system and after passing through the filtration system, was guided out.

Keywords: Specific Pathogen Free, SPF, Bacterial agents, Fungal agents, water coality in shrimp hatchryies and culture system

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shrimp Research Center

---

Project Title : Microbiol agents of water (Bacterial, Viral and Fungi) in Specific Pathogen free Shrimps producing
Approved Number:14-80-12-9104-91001-9101K
Author: Babak Ghaednia
Project Researcher : Babak Ghaednia
Collaborator(s) *:* S.J. Zorieh Zahra, M. Afsharnasab, M. Mirbakhsh, A. Dashtiannasab, M.Kh. Pazir, Sh. Farokhbin, A.H. Mahianeh, R. Banaderakhshan, E. Keshtkar, M.A. Nazari, E. Mohmmadibaghmlaei, S. Omidi, P. Hossin khezri, A. Marzbani, S. Rasti. M. Ardesheri
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 2 Years & 4 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Shrimp Research Center

Project Title :

Microbiol agents of water (Bacterial, Viral and Fungi) in Specific Pathogen free Shrimps producing

Project Researcher :

Babak Ghaednia

Register NO.

50596