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

عنوان :

شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی در میگوی عاری از بیماری خاص

مجری:
مریم میربخش

شماره ثبت
۵۰۷۱۱

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه : شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی در میگوی عاری از بیماری خاص

شماره مصوب پروژه : K۹۱۰۱-۹۱۰۰۱-۹۱۰۶-۱۲-۸۰-۱۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مریم میربخش

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

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مریم میربخش

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سید جلیل ذریه زهرا، وحید یگانه، بابک قائدنیا، عقیل دشتیان نسب، عصمت محمدی باغملایی، محمدرضا مهرابی، عیسی کشتکار، محمد علی نظاری، نادر سامانی، لاله پارسا یگانه، محمد افشارنسب

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : رضا آذربایجانی

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان بوشهر

تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱

مدت اجرا : ۲سال 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 : شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی در میگوی عاری از بیماری خاص

کد مصوب : ۹۱۰۱K-۹۱۰۰۱-۹۱۰۶-۱۲-۸۰-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۷۱۱ تاریخ : ۹۵/۹/۳

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مریم میربخش دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۵/۸/۳ 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- تعریف میگوی عاری از بیماری خاص ۲
۱-۲- اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص ۴
۱-۳- پاتوژنهایی که میگوی عاری از بیماری خاص باید از آنها عاری باشد ۵
۱-۴- خصوصیات پاتوژن های باکتریایی ۶
۱-۴-۱- بیماری نکروز عفونی پانکراس ۷
۱-۴-۲- بیماری سل میگو ۸
۱-۴-۳- بیماری ویبریوزیس ۹
۱-۴-۴- برخی ازگونه های مهم و بیماریزای ویبریو در آبزی پروری ۱۱
۱-۵- بیماری های قارچی ۱۵
۱-۵-۱- فوزاریوزیس ۱۶
۱-۵-۲- مایکوزیس لاروی ۱۶
۱-۶- تاریخچه روش ریبوتایپینگ ۱۷
۱-۷- اصول بکارگیری rRNA و ژن های rRNA به عنوان ابزار طبقه بندی و تشخیص ۱۷
۱-۸- ساختار اپرون ریبوزومی ۱۸
۱-۹- تکنیک ریبوتایپینگ ۱۹
۱-۱۰- بیماریهای شایع در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی میگوی وانامی ۱۹
۲- مروری بر منابع ۲۰
۲-۱-سوابق تحقیق در زمینه شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی میگو در خارج از کشور ۲۰
۲-۲- سوابق تحقیق در زمینه شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی میگو در داخل کشور ۲۱
۳- مواد و روشها ۲۲
۳-۱- مواد ۲۲
۳-۲- روش ها ۲۴
۳-۲-۱- آزمایشات باکتری شناسی آب و مراحل مختلف میگوهای دارای علایم بالینی ۲۴
۳-۲-۲- شناسایی بیوشیمیایی سویه های باکتری در حد جنس ۲۵
۳-۲-۳- آزمایشات قارچ شناسی (Lightner, 1996) ۲۷

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۴-۲-۳- روش ریبوتایپینگ ۲۸
۵-۲-۳- روش شناسایی باکتری بیماری نکروز عفونی پانکراس ۳۰
۴- نتایج ۳۵
۱-۴- انواع و تعداد کل نمونه های مورد آزمون ۳۵
۲-۴- نتایج آزمون نمونه های مورد پایش ۳۵
۳-۴- آنالیز مولکولی باکتری های غالب جداسازی شده ۳۸
۴-۴- درخت فیلوژنی باکتری های شناسایی شده ۳۸
۵- بحث و نتیجه گیری ۴۴
پیشنهادها ۴۹
منابع ۵۱
چکیده انگلیسی ۵۶

چکیده

در حال حاضر صنعت آبزی پروری به منظور ارائه دستورالعمل های مناسب در زمینه مدیریت بهداشتی از جمله تولید میگوی عاری از پاتوژن(Specific Pathogen Free (SPF ، نیاز به روش های حساس و قابل اعتماد برای تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم های پاتوژن دارد. روش های مولکولی مورد استفاده در تشخیص میکروارگانیسم ها دارای قدرت تمایز بالای تاکسونومیک بوده و در ارتباط با کتابخانه های به روز دنیا است از سوی دیگر شناسایی دقیق میکروارگانیسم ها، تهیه بانک اطلاعات ژنتیکی پاتوژن های میگو و نگهداری این سویه ها گامی در جهت سبب پیشبرد پژوهش های آتی در زمینه مکانیسم پاتوژنز عوامل بیماریزا، تشخیص، درمان، پیشگیری از بیماری ها، تولید کیت های شناسایی بومی و تشخیص بیماری های نوظهور و نوپدید و منشاء آن ها خواهد بود. لذا در این پروژه با استفاده از روش ریبوتایپینگ به شناسایی باکتری ها و قارچ های پاتوژن بومی جداسازی شده، تهیه بانک اطلاعات ژنتیکی آن ها و ثبت آن ها در بانک جهانی ژن پرداخته شد و در طی نمونه برداری از میگو و آب مرکز تولید میگوی عاری از پاتوژن، ۴۰ ایزوله باکتری جداسازی شد که ۸ ایزوله‌ای بیشترین فراوانی را داشتند مورد شناسایی مولکولی براساس توالی یابی 16S rDNA قرار گرفتند. باکتری های مورد شناسایی عبارتند از: *Vibrio nigripulchritudo* strain IS013(GenBank:KP843725)، *Vibrio brasiliensis* strainIS014 (GenBank:KR186076)، *Vibrio rotiferianus* strain IS015 (GenBank:KR186077)، *Vibrio azureus* strain IS012 (GenBank:KJ018724.1)، *Vibrio owensii* strain IS016 (GenBank:KR186078)، *Agarivorans gilvus* strain IS017 (GenBank:KR186079)، *Vibrio brasiliensis* IS018 (GenBank:KR186080) و *Vibrio alginolyticus* strain IS019 (GenBank: KT223764) که در بانک جهانی ژن ثبت شدند. در طی این پژوهش ایزوله قارچی جداسازی نشد.

کلمات کلیدی: باکتری، قارچ، ریبوتایپینگ، 16S rDNA، میگو، عاری از پاتوژن

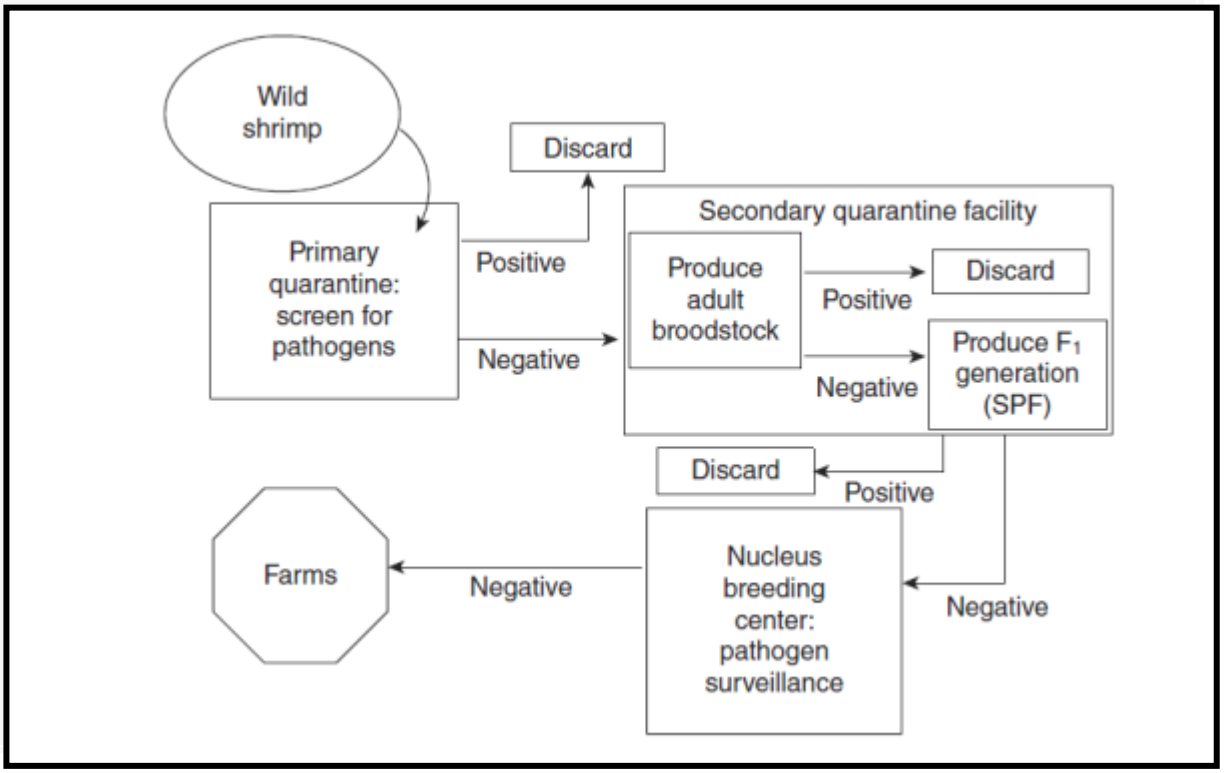
۱-مقدمه

طبق گزارش سازمان خواروبار جهانی، تولید جهانی میگوهای پنائیده دریایی از مزارع تا سال ۲۰۰۹ نزدیک به ۳/۵ میلیون تن بوده است که نزدیک به نیمی از کل میگوی عرضه شده جهانی است. بنابراین صنعت تکثیر و پرورش میگو یکی از فعالیت های عمده آبزی پروری می باشد که می‌تواند به عنوان راه حلی در برطرف کردن مشکل عمده کمبود مواد غذایی در جهان باشد. ولی مزارع و مراکز تکثیر، همواره در معرض حملات میکروارگانیسم ها از جمله : باکتری‌ها و قارچ‌ها می باشند و از آن جهت که بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها بصورت غیربومی بوده و از منابع اگزوژن وارد استخرها شده و سبب بروز تلفات در مراکز تکثیر و پرورش می گردند، لذا آگاهی از میکروارگانیسم‌های بومی (اندوژن) منطقه جهت آمادگی برای پیشگیری و کنترل بیماری های حاصل از میکروارگانیسم‌های غیر بومی ضروری است، لذا شناسایی، جداسازی و نگهداری میکروب های موجود در میگوهای پرورشی و زیستگاه آن ها می‌تواند در ارتقای سطح بهداشت، سلامت و مدیریت مزارع پرورشی و مراکز تکثیر یاری دهنده باشد و همچنین در حال حاضر صنعت آبزی پروری به منظور ارائه دستورالعمل های مناسب در زمینه مدیریت بهداشتی نیاز به روش های حساس و قابل اعتماد برای تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم های پاتوژن دارد و از آن جهت که روشهای مرسوم که بر پایه خصوصیات فنوتیپی نیازهای رشد و خصوصیات، پروفایل تخمیر و مطالعات سرولوژی است دارای یک سری نقایصی می باشد، امروزه تکنیک های انگشت نگاری مولکولی مختلف، ماکرهای ژنتیکی متعددی در تشخیص زیرگونه ها و سویه استفاده می شوند. یکی از تکنیک های مولکولی رایج در شناسایی عوامل باکتریایی و قارچی ریبوتایپینگ می باشد که در این پژوهش از آن استفاده شد.

۱-۱- تعریف میگوی عاری از بیماری خاص

از آن جهت که این پژوهش بخشی از طرح کلان تولید میگوی عاری از بیماری خاص می باشد در مقدمه تعریفی از میگوی عاری از بیماری خاص ارائه می گردد.

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 جغرافیایی و گونه میگو متفاوت است. به عنوان مثال اگر میگوها در شرایط ویژه تولید که در اصطلاح Nuclear Breeding Center (NBC) می نامند تولید شوند آنها را عاری از بیماری خاص گویند و در شرایط NBCمیگوها برای دو سال تحت مراقبت بوده و برای کلیه بیماری‌های خاص غربالگری می‌شوند. اگر میگوها را به سطوح ایمنی زیستی متوسط منتقل نماییم آنها را میگوهای با سلامتی بالا یا High Health (HH) می نامند (تصویر ۱).



تصویر ۱- نمودار مراحل تولید میگوی عاری از بیماری خاص

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.

به عنوان مثال برخی از گونه های ویبریو[۶] می توانند سبب بروز بیماری شده و به طور قابل ملاحظه ای در میگو ها قابل تشخیص بوده، ولی نمی توان آن ها را در لیست پاتوژن های میگوی عاری از بیماری خاص قرار داد زیرا این باکتری ها جزو فلور طبیعی میگو بوده ودر شرایط خاص بیماریزا می شوند.

عاری از بیماری خاص بودن میگو به حضور یا عدم حضور پاتوژن های خاص در میگو بستگی داشته و این وضعیت بستگی به درجه ایمنی زیستی تغییر میکند. بنابراین پرورش دهندگانی که بدنبال خرید میگوی عاری از بیماری خاص می باشند لازم است این سوالات را از تولیدکنندگان میگوی عاری از بیماری خاص کنند:

چه پاتوژن هایی در لیست تولید میگوی عاری از بیماری خاص از طرف تولید کنندگان قرار دارد که آنها را حذف می کنند؟

---

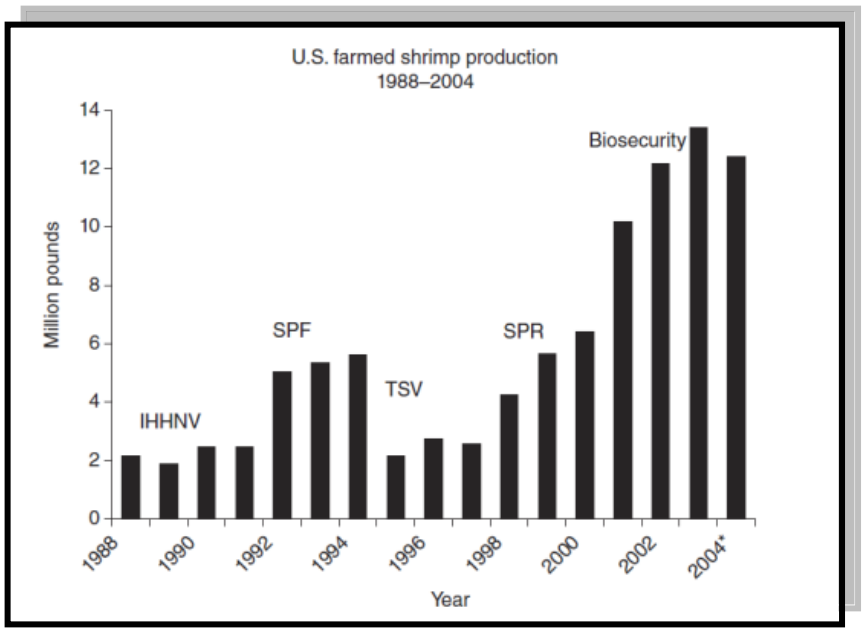
[6] Vibrio sp.

چه ابزار تشخیصی برای شناخت پاتوژن ها در مرکز تولید عاری از بیماری خاص برای غربالگری استفاده شده است ؟
در چه زمانی آخرین غربالگری و توسط چه کسی انجام شده است ؟
تولید کننده میگوی عاری از بیماری خاص از چه برنامه مراقبتی برای پایش ذخایر عاری از بیماری خاص استفاده نموده است ؟
تاریخچه بیماری در تاسیسات تولید عاری از بیماری خاص چگونه است؟
همچنین خریداران میگوی عاری از بیماری خاص باید یک گواهی از غربالگری مهمترین بیماری ها را نیز دریافت دارند.

۲-۱- اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص

اهداف اصلی در تولید میگوهای عاری از بیماری خاص عبارتند از: ایجاد ذخیره میگوی عاری از پاتوژنهای خاص، افزایش بازماندگی، افزایش شاخص های رشد و در نهایت افزایش راندمان تولید که این امر با در واقع با پیشگیری از شیوع بیماری ها محقق می گردد. در نمودار ۱ تاثیر معرفی میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص و میگوی مقاوم به بیماری در بهبود ایمنی زیستی مزارع میگوی امریکا به خوبی نشان داده شده است.

کاهش شیوع و در مرحله بعد با برنامه ریزی درست در زمینه اصلاح نژاد و اجرای آن می توان از تلاقی نژادهای یکسان یا هم خونی[۷] جلوگیری نمود.



نمودار ۱- تاثیر معرفی میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص و میگوی مقاوم به بیماری خاص در بهبود ایمنی زیستی مزارع میگوی امریکا

[7] Inbreeding

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

سازمان جهانی بهداشت دام[8] هر ساله، برخی از عوامل بیماریزای خطرناک آبزیان (از جمله میگو) که می توانند مرگ و میر شدید در مراکز تکثیر، پرورش و مولدسازی میگو ایجاد نمایند را به عنوان بیماریهای اخطار کردنی[9] تعیین نموده و فهرست آن ها را در کتاب سلامت آبزیان سازمان بهداشت جهانی دام[10] اعلام نموده است، کلیه کشورهای جهان موظفند براساس روش‌های استاندارد ویکسان تشخیص بیماری‌های مذکور که در کتاب راهنمای آزمون‌های تشخیصی بیماریهای آبزیان[11] موجود می باشد، نسبت به انجام آزمایشات اقدام و در صورت تائید بروز این قبیل بیماریها، موارد را به سازمان جهانی بهداشت دام گزارش نمایند. نقل و انتقال آبزیان بدون اخذ گواهی بهداشتی مبنی بر عاری بودن آبزی مورد نظر از بیماریهای قید 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 پنه ای[12] و بیماری نکروز روده میانی باکلوویروسی[13] که از ویروس های باکلوویروسی بوده و در میگوهای مونودن گزارش نشده در لیست قرار نمی‌گیرند. پاتوژن هایی 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 ۱ 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[14] در این لیست نبوده و بعداً به لیست اضافه شده است، یا در سال ۲۰۰۲ بیماری بیماری نکروز عفونی عضلات میگو[15] به لیست اضافه و امروز این لیست شامل ۹ ویروس می‌باشد و چه بسا با شناخت پاتوژن های جدید این لیست تغییر نماید.

بخشی از پاتوژن های اعلام شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام، به عنوان پاتوژن های 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.

---

[8] The World Organisation for Animal Health (OIE)
[9] Notifiable Diseases
Code [10] OIE Aquatic Animal Health
Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [11]
[12] *Baculovirus Penaei*
[13] Baculoviral Midgut Necrosis
[14] White Spot Disease
[15] Infection Myonecrosis Virus (IMNV)

جدول ۱- 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* Baculovirus(MBV)	ویروس	C2
۱۰	Necrotizing Hepatopancratis(NHP)	باکتری	C2
۱۱	Microsporidia	انگل	C2
۱۲	Haplosporidia	انگل	C2
۱۳	Gregarines	انگل	C3

۴-۱- خصوصیات پاتوژن های باکتریایی

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

- عوامل باکتریایی پاتوژن مانند باکتری عامل بیماری نکروز عفونی پانکراس
- عوامل باکتریایی فرصت طلب مانند اکثر باکتریهای خانواده ویبریوناسه

عوامل باکتریایی پاتوژن، 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 باعث مرگ و میر، ضایعات جلدی، نکروز، کدر و مات شدن عضلات بدن، تغییر رنگ آبششها، کاهش رشد، از دست دادن کوتیکول، ایجاد روده سفید، بی حالی و کاهش مصرف غذا را به همراه داشته باشند (Goarant, et al., 2006; Horowitz, et al., 2001; Jayasree, et al., 2006; Lightner, 1996; Nunan, et al., 2005).

۱-۴-۱- بیماری نکروز عفونی پانکراس[16]

۱-۱-۴-۱- عامل

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم منفی، چند شکلی و پاتوژن اجباری داخل سلولی می باشد. از نظر تاکسونومی این باکتری متعلق به خانواده پروتئوباکتریاسه[17] می باشد. این باکتری را آلفا پرتئوباکتریوم[18] نیز می نامند. 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[19] 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 (Loy, et al., 1996).

۲-۱-۴-۱- اپیدمیولوژی

بیماری تاکنون در میگوهای آزتکوس[20] ، پنئوس استلیفروس[21]، لیتوپنئوس استیلیورستیس[22]، لیتوپنئوس وانامی و پنئوس کالیفرنینسیس[23] 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.

۳-۱-۴-۱- 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 یوروپد[24] و پلئوپد[25] 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).

---

[16] Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP)
[17] Proteobacter
[18] *Alfa proteobacterium*
[19] Helical
[20] *P.aztecus*
[21] *P. steliferus*
[22] *L. styliorostis*
[23] *P.californiensis*
[24] Uropods
[25] Pleopods

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, et al., 1990 Lightner, 1996).

۴-۱-۴-۱- آسیب شناسی

در آسیب شناسی آتروفی ملایم تا شدید به همراه نقاط شدید گرانولوماتوز در مجاری هپاتوپانکراس دیده می شود 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, et al., 1990, Lightner, 1996).

تصویر ۱- علایم ظاهری بیماری NHP

۲-۴-۱- بیماری سل میگو[۲۶]

عامل ایجاد کننده بیماری یک باکتری گرم مثبت، اسید فست و استوانه ای شکل بنام مایکوباکتریوم[۲۷] بوده که معمولاً با ایجاد ندولهای ملانوزه و ضایعات گراتولوماتوزی همراه می باشد. برای جدا سازی این باکتری نیاز به محیطهای اختصاصی بوده و یک بیماری مشترک با انسان می باشد 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 : مایکوباکتریوم مارینوم[۲۸] و مایکوباکتریوم فورتوئیتوم[۲۹] (Lightner, D.V. 1993, Lightner, D.V. $ Redman, R.M., 1996)

[26] Shrimp Tuberculosis
[27] *Mycobacterium*
[28] *M.marinum*
[29] *M.fortuitum*

۱-۲-۴-۱- 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.

۲-۲-۴-۱- آسیب شناسی

در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین 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[۳۰] که رنگ آمیزی های خاص باکتریهای اسید – فست می باشد، رنگ باکتری ها به صورت قرمز روشن مشاهده می شود(Lightner, 1993, 1996; Lightner & Redman, 1986).

۳-۴-۱- بیماری ویبریوزیس[۳۱]

جنس ویبریو

خانواده ویبریوناسه

جنس ویبریو یکی از اعضای خانواده ویبریوناسه و متشکل از حداقل ۳۴ گونه شناخته شده است (Tantillo, G.M. et al., 2004). ویبریوناسه یکی از ۲۲ خانواده از ۱۴ راسته شاخه گاماپروتئو باکتریها می باشد. در حال حاضر این خانواده شامل شش جنس: ویبریو، آلوموناس[۳۲] ،انهیدروباکتر[۳۳] ، لیستونلا[۳۴]، فتوباکتریوم[۳۵] و سالینی ویبریو[۳۶] می باشد که هر جنس خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک متمایز خود را دارد. (Anderson I, 1987 #1) ویبریو نام خود را از کلمه لاتین ویبرار ، به معنی "به موج" گرفته است. اتو مولر اولین بار کلمه ویبریو را در قرن هجدهم برای توصیف باکتری هایی با اشکال کشیده مشاهده شده در کشت مورد استفاده قرار داد (Rossello-Mora and Amann, 2001).

[30] Carbol fuchsine
[31] Vibriosis
[32] Allomonas
[33] Enhydrobacter
[34] Listonella
[35] Photobacterium
[36] Salinovibrio

۱-۳-۴-۱- خصوصیات مورفولوژیکی وشیمیایی

جنس ویبریو شامل باکتری های گرم منفی و اکسیداز مثبتی است که قادر به رشد در محیط کشت تیوسولفات بایل سوکروز آگار، اکسیداسیون و تخمیر قندها می باشند. علاوه بر این دارای ویژگی هایی هیدرولیزآرژنین، لیزین، اورنی تین ، تولید آمیلاز، آزمون ایندول، استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن تولید اوره آز، ایندول، رشد در نمک ۰٪، ۶ ٪و ۸٪ ، رشد در دمای ۴، ۳۵ و ۴۰ سانتی گراد، حساسیت یا مقاومت در برابر با O /۱۲۹، تولید اسید از برخی از قندها، و غیره می باشند که به تفکیک گونه های آن کمک می نماید (Khouadja et al.,2013).

۱-۳-۴-۲- زیستگاه

جنس ویبریو ساکنان بومی محیط های دریایی و مصب رودها می باشند آنها در محیط های آبی شور (et , Chikwendu et al., 2014 ;Reynaud et al.,2013;Khouadja et al.,2013; Gopal Sh et al.,2005 Tantillo, GM et al., 2004) در محدوده دمایی ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد (Chikwendu et al.,2014) و به دو صورت آزاد در آب و چسبیده به سطوح جاندار یا بی جان زندگی می کنند (Farmer and Hickman-Brenner ,1992). خانواده ویبریوناسه یکی از مهمترین گروه باکتری هتروتروف اکوسیستم های دریایی است که به خوبی مورد مطالعه قرارگرفته است.آنها نقش مهمی را در آب های سطح بالایی بازی می کنند.

ویبریوها همچنین همزیست ارگانهای ماهی نورانی می باشند. در این اجتماع همزیستی، باکتری مواد مغذی را از ارگان نورانی دریافت کرده و نور تولید شده سبب جذب شکار (ماهی ماهی گیر)، فرارشکارچیان از طریق پرتاب نور می گردد. تولید نور در بسیاری ازاعضای ویبریوناسه توسط پدیده کوروم سنسینگ کنترل می‌شود و امروزه پژوهشهایی پیرامون کاربرد این پدیده به عنوان ابزاری در پیشگیری از بروزبیماریهای میگو و سایر آبزیان انجام شده است (محمدی باغملایی و همکاران، ۱۳۹۳).

۱-۳-۴-۳- بیماریزایی

بیش از ۲۰ گونه بیماریزای ویبریو شناسایی شده اند که بعضی از آنها پاتوژن انسان هستند مانند ویبریو کلرا، ویبریوپاراهمولایتیکوس ، ویبریو ولنیفیکوس (Messelhäusser et al.,2010) و بعضی گونه ها پاتوژن موجودات آبزی همچون میگوهستند (ویبریوآلجینولیتیکوس ،ویبریوپاراهمولیتیکوس، ویبریوآنگویلاروم، ویبریوپنئیسیدا، ویبریواسپلندیدوس ،ویبریوهاروی ،ویبریو اردالی ،ویبریو ارینتالیس ،ویبریوپلاجیکوس، ویبریودامسلا، ویبریوفیشری، ویبریوکامپبلی، ویبریو ولنیفیکوس و غیره (Otta et al., 1999).

عامل بیماری های باکتریایی در میگو های خانواده پنائیده ، بیشتر باکتری های جنس ویبریو گزارش شده اند و تاکنون بیش از ۱۴ گونه ویبریو از میگوهای مبتلا به ویبریوزیس جداسازی شده است، که برخی از آن‌هاعبارتند از: ویبریو هاروی، ویبریو اسپلندیدوس، ویبریوپاراهمولیتیکوس، ویبریوآلجینولیتیکوس، ویبریو

میمیکوس،ویبریو آنگویلاروم، ویبریو ولنیفیکوس، ویبریو کامپبلی، ویبریو فیشری، ویبریو دامسلا، ویبریو پلاجیکوس، ویبریو اینتالیس، ویبریو اردالی و ویبریو مدیترانیه ای می باشند(Mahbub,2011).

۴-۳-۴-۱- فاکتورهای بیماریزایی

گونه های بیماری زیا ویبریو قادر به تولید فاکتورهای بیماریزایی مختلف از جمله انتروتوکسین، همولیزین، سیتوتوکسین، پروتئاز، لیپاز، فسفولیپاز، سیدروفور، فاکتورهای اتصال و یا هماگلوتینین می باشند.حدت سویه های ویبریو پاراهمولیتیکوس معمولا با بیان همولیزین TDH وهمولیزین مرتبط با TRH، که توسط ژن های tdh و trh کد گذاری می شوند، مرتبط است. بیان ژن tdh، توسط همولیز β روی واگاتسوما آگار و بیان ژن trh، با تست اوره آز مثبت مشخص می شود، همچنین بسیاری از پروتئازهای خارج سلولی نقش مهمی در بیماریزایی گونه های ویبریو دارند. در مطالعه‌ای، پروتئاز به عنوان عامل بیماریزایی مهم در ویبریو پاراهمولیتیکوس tdh و trh منفی شناسایی شده و این آنزیم فعالیت سیتوتوکسیک در سلولهای CHO و ورو نشان داده است (Khouadja et al.,2013).

۴-۴-۱- برخی ازگونه های مهم و بیماریزای ویبریو در آبزی پروری

همان طور که اشاره شد،گونه های ویبریو از عوامل اصلی ایجاد کننده ویبریوزیس در میگو می باشند که در اینجا به شرح مختصری از برخی گونه ها می پردازیم.

۱-۴-۴-۱- ویبریو آلجینولیتیکوس

ویبریو آلجینولیتیکوس یک بیماریزای فرصت طلب مهم است که سبب ایجاد ویبریوزیس در می‌گردد. (George et al.,2005, Chikwendu et al.,2014). البته بعضی گزارشات نیز توانایی این باکتری را به عنوان پروبیوتیک در کنترل عفونت ویبریوزیس در هچری میگو اثبات نموده اند (George M.R., et al.,2005).

این باکتری در نمونه های آب محیط های دریایی، صدف دو کفه ای و ماهی یافت می شود. از پایان دهه ۸۰ این میکروارگانسیم ها با عفونتهای انسانی قرین شده اند. محل عفونت در میزبان (محیط چشم وزخم های باز) در ترکیب با میکروفلورا می باشند. ویبریو آلجینولیتیکوس در انسان سبب سپتی سمی ناشی از استفاده از آب دریا و یا غذاهای دریایی آلوده به خصوص درکودکان می شود. پاتوژنز این باکتری کاملاً مشخص نیست، اما عوامل گوناگونی شامل ایزوآنزیم هایی مانند الاستاز، کلاژناز، دی ان ای آز، کندرویتیناز، ژلاتیناز، لیستیناز و کراتیناز می توانند موثر باشند (Lafisca, A., 2008).

۲-۴-۴-۱- ویبریو میمیکوس[۳۷]

ویبریومیمیکوس باکتری میله ای گرم منفی منحنی یا کاما شکل، هوازی- بیهوازی اختیاری می باشد که دارای یک تاژک قطبی و اکسیداز مثبت است (Abd, H. et al.,2010; Bi, K. et al.,2000). ویبریو میمیکوس تولید کلنی هایی به قطر۲ تا ۳ میلیمتر در آگار خوندار، و کلنی های سبز رنگ در تیوسولفات سیترات ساکارز می نماید. این گونه آنالوگ ویبریو کلرا است اما سوکروز را تخمیر نمی کند. ویبریو میمیکوس در اکوسیستم های آبی(Abd, H. et al.,2010; Bi, K. et al.,2000) از جمله آب دریا، آب شیرین و آب شور زندگی می کند و به عنوان یک باکتری با زندگی آزاد و در ارتباط با زئوپلانکتونها، سخت پوستان، نرم تنان ، تخم لاک پشت، و ماهی عنوان شده است (Chowdhury et al.,1987; Colwell and Huq ,1994).

این گونه ویبریو یک باکتری مهم از نظرپزشکی در میان گونه های ویبریو است زیرا در انسان سبب ایجاد گاستروانتریت می شود و با زخم و عفونت گوش میانی ارتباط دارد ولی به دلیل اینکه اکثر جدایه های ویبریو میمیکوس سم وبا (CT) تولید نمی کند، بر خلاف ویبریو کلرا، با شیوع اسهال مانند وبا همراه نیست (Abd, H. et al.,2010; Bi, K. et al.,2000)گزارشاتی از گاستروانتریت ناشی از ویبریو میمیکوس در بنگلادش و ژاپن به علت مصرف ماهی و میگوی خام وجود دارد (Abd H et al.,2010). اگر چه تعدادی از عوامل پاتوژنز شناخته شده در ویبریو میمیکوس مانند: انتروتوکسین مقاوم به حرارت ، انتروتوکسین حساس به حرارت، همولیزین، پروتئاز، فسفولیپاز، آریل استراز، سیدروفور و هماگلوتینین مانند عامل وبا است اما پاتوژنز آن کاملاً مشخص نیست(Bi, K. et al.,2000)

۳-۴-۴-۱- ویبریو پاراهمولیتیکوس

ویبریو پاراهمولیتیکوس یک باکتری گرم منفی، نمک دوست و قابل انتقال توسط مواد غذایی است (Gopal et al.,2005; Ganesh et al.,2010). آنالیز فیلوژنیک گوناگونی ژنتیکی بالایی را این باکتری نشان داده است. توزیع این گونه در آب های ساحلی گرمسیری و معتدل بوده و عامل اسهال منتقله از غذا می باشد Ganesh et al.,2010). ویبریو پاراهمولایتیکوس بخشی از میکرو فلورای طبیعی مصب رودها و آب سواحل دریایی است و در غذاهای دریایی، به خصوص صدف و نرم تنان دو کفه ای وجود دارد (Khouadja et al.,2013). این باکتری عامل اسهال مسافرتی و گاستروانتریت در سراسر جهان بوده و در نتیجه مصرف غذاهای دریایی آلوده نپخته، به خصوص صدف ایجاد می شود، همچنین بر اثر تماس با آب دریای آلوده سبب عفونت چشم یا زخم نیز می گردد (Chikwendu et al.,2014). این باکتری دارای فاکتورهای پاتوژنزی مانند: همولیزین TDH و همولیزین TRH می باشد که به ترتیب توسط ژن های tdh و trh کد می شود(Alipour, et al., 2012) و سیستم ترشحی نوع ۳ ،(TTSS1) و (TTSS2) را دارا می باشد. نژادهایی که دارای ژنهای کد کننده TDH، TRH، و TTSS2 هستند به طور کلی

[37] *V.mimicus*

بیماری زا و مسئول اکثریت قریب به اتفاق موارد بالینی می‌باشند. در میان گونه های ویبریو پاراهمولیتیکوس تنها درصد کوچکی از گونه ها بیماری زا هستند (Su, et al., 2007)

به علت مشابهت فیزیولوژیک ویبریو پاراهمولیتیکوس با سایر ویبریوها، این باکتری از آبهای سراسر جهان، آبهای شیرین، میگوهای پرورشی و حتی ماهی های اقیانوسی و رودخانه ای گزارش شده است.. مهمترین روش پیشگیری از عفونت های این باکتری رعایت نکات بهداشتی می باشد. شستشوی مناسب میگو با آب شرب، استفاده از یخهای تهیه شده با آب شرب، استفاده از کلر در حد ۷-۲ قسمت در میلیون در آب شستشو و آب مورد استفاده در تهیه یخ در نگهداری کوتاه مدت میگو توصیه می‌شود. در صورت نگهداری طولانی مدت لزوم نگهداری در شرایط انجماد لازم است. گونه های ویبریو نسبت به حرارت بسیار حساس هستند و به راحتی دردمای پخت از بین می روند. لذا پخت کامل فرآورده های دریایی جهت از بین بردن آلودگیهای احتمالی توصیه میشود(رحیمی وهمکاران، ۱۳۹۰).

۴-۴-۴-۱- ویبریو ولنیفیکوس

این گونه را می توان از صدف و سخت پوستان دیگر، ماهی، زئوپلانکتون و خرچنگ جدا کرد، ویبریو ولنیفیکوس عضو بومی میکروبیوتای اکوسیستم های دریایی استوایی ومعتدل است (Reynaud et al.,2013 Pfeffer et al.,2003;). این باکتری می تواند برای انسان بسیار بیماری زا باشد و عفونت زخم و سپتی سمی اولیه ایجادکند. عفونت می تواند به ۵۰٪ مرگ و میر در میزبان حساس) افراد با عملکرد سیستم ایمنی ضعیف و در نتیجه بیماری کبد، دیابت، سرطان، هموکروماتوزیز، سرکوب کننده های ایمنی و دیگر شرایط مزمن) منجر شود(. (Pfeffer et al.,2003; Reynaud et al.,2013)

ویبریو ولنیفیکوس در حال حاضر علت اصلی (۹۵٪) مرگ مربوط به غذاهای دریایی در ایالات متحده آمریکا نشان داده شده است، که به طور عمده در نتیجه مصرف صدف خام بوده است . بر اساس بیوتایپینگ باکتری بر اساس خواص بیوشیمیایی، سرولوژیکی و ژنتیکی و دامنه میزبانی، گونه ویبریو ولنیفیکوس در سه بیوتیپ طبقه بندی شود: بیوتیپ ۱ سویه هایی را تشکیل می دهند که اکثر این باکتری ها مسئول عفونت های انسانی هستند. بیوتیپ ۲ سویه های پاتوژنی می باشند که در درجه اول پاتوژن مار ماهی هستند، اما در برخی موارد عفونت انسان توسط بیوتیپ ۱ سروار E ایجاد شده است. بیوتیپ ۳ ترکیبی موزاییک دارد و تنها بیوتیپی است که در ارتباط با شیوع بیماری انسانی در اسرائیل بوده است (Reynaud et al.,2013).

ویبریو ولنیفیکوس دارای عوامل پاتوژنز گوناگونی مانند: چندین آنزیم ، سیدروفورها ، سم RtxA و یک کپسول پلی ساکاریدی است. در حالی که سایر عوامل ممکن است به بیماریزایی کمک کند، پلی ساکارید کپسولی (CPS) به عنوان عامل بیماریزایی عمده در نظر گرفته شده و برای محافظت باکتری از فاگوسیتوز و کشتار به واسطه سیستم ایمنی میزبان گزارش شده است(Pfeffer et al.,2003.)

۵-۴-۴-۱- ویبریو هاروی

ویبریو هاروی یک باکتری گرم منفی است که در همه محیط های دریایی زندگی آزاد داشته و در روده برخی از حیوانات دریایی زندگی می نماید. نام این باکتری ابتدا آکروموباکتر هاروی، لوسی باکتریوم هاروی و بنکا هاروی بود و در نتیجه تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rDNA، در طبقه بندی فعلی به عنوان ویبریو هاروی نامیده می شود Austin (and Zhang,2006). ویبریو هاروی به عنوان پاتوژن اصلی در پرورش بسیاری از گونه های بی مهرگان از جمله میگو در سراسر جهان شناخته شده است و مرگ و میر بالایی در میگو به ویژه در مراحل لاروی ایجاد می کند (Mirbakhsh, M., et al., 2014, Alavandi S.V., et al., 2006).

ویبریو هاروی باعث زخم مزمن پوست در کوسه، گاستروانتریت در پرورش ماهی گروپر و جلبک قرمز می گردد. این باکتری سبب ایجاد ویبریوسیس در ماهی نیز می‌گردد، که با علایم بالینی مانند بی اشتهایی، تیره شدن تمام بدن ماهی، خونریزی های محلی ، زخم در دهان یا سطح پوست، دم و باله، فاصله کانونی، ضایعات نکروتیک در عضلات همراه با روده متورم و کدورت چشم مشخص می گردد.شدت بیماریزایی گونه های ویبریو هاروی وابسته به گونه میزبان، دوز، زمان در معرض قرار گرفتن، سن و فاکتورهای بیماریزایی سویه باکتری می باشد. با این حال، مکانیسم های بیماریزایی بطور دقیق مشخص نشده است، اما توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم، کوروم سنسینگ، تولید آنزیم های خارج سلولی مانند: پروتئازها، همولیزین ها، لیپوپلی ساکارید و تعامل با باکتریوفاژ و مواد شبه باکتریوسین می تواند در پاتوژنز این باکتری موثر باشد. قابلیت این باکتری، در اتصال به کیتین با استفاده از یک مکانیسم پروتئین واسط خاص، کلونیزاسیون و پس از آن عفونت میزبان جالب توجه است. همچنین به نظر می رسد توانایی اتصال به آهن می تواند مهمترین فاکتور بیماریزایی باشد. علاوه بر این، عامل تداوم و بقای ویبریو هاروی در مراکز تکثیر میگو به علت توانایی تشکیل بیوفیلم همراه با مقاومت در برابر مواد ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیک گزارش شده اشت (Austin and Zhang,2006).

۶-۴-۴-۱- ویبریو آنگوئیلاروم

ویبریو آنگوئیلاروم یک باکتری دریایی است که در همه آبهای ساحلی حضور دارد و به عنوان یک بیماریزای فرصت طلب در ماهیهای جوان و میگو محسوب می گردد(Vaseeharan, B., et al., 2008).

ویبریوزیس ناشی از ویبریو آنگوئیلاروم، به عنوان یکی از مهم ترین بیماری های عفونی در ماهی، صدف و سخت پوستان گزارش شده است. علائم شامل لکه های قرمز در مناطق شکمی و جانبی ماهی ها و ضایعات متورم و تیره پوست است که می تواند زخم و خونریزی ایجاد کند. علاوه بر این سبب کدورت، زخم و اگزوفتالمی چشم ها می گردد. روده متسع و کاملا روشن، چسبناک و حالت سیال پیدا کند. شیوع این بیماری اغلب با میزان مرگ و میر بالا همراه می باشد. عفونت تحت تاثیر کیفیت آب و درجه حرارت، میزان استرس تحمیل شده بر ماهی و فشار و حدت باکتری است. از ۲۳ سروتیپ شناسایی شده تنها سروتیپ O1 وO2 و به

میزان کمتر سروتیپ O3با ویبریوسیس ارتباط دارند. دیگر سروتیپ های ویبریوآنگوئیلاروم موجود در محیط زیست از رسوب، پلانکتون ها و یا آب دریا جدا شده اند که عمدتا غیر بیماری زا بوده اند. به طور کلی، فاکتورهای پاتوژنز ویبریو آنگویلاروم که برای کموتاکسی، حرکت،اتصال و تهاجم ضروری هستند طبقه بندی شده اند که شامل پروتئازها، همولیزین، لیپوپلی ساکارید هستند (Frans et al.,2013).

۵-۱- بیماری های قارچی

قارچ ها عوامل میکروبی فرصت طلبی هستند که دارای انتشار جهانی می باشند. تاکنون بیش ار ۵۰۰ گونه قارچی از آب دریا و محیط زیست سخت پوستان جداسازی شده است که این تعداد حدود یک درصد کل گونه های قارچی را تشکیل می دهد. قارچها در تمامی محیط های خشکی و آبی اعم از آب شیرین و شور یافت می شوند. تعدادی از گونه های قارچی به عنوان عوامل پاتوژن میگو شناخته شده اند. گونه های لاژینیدیوم[۳۸] و سیرولیپیدیوم[۳۹] از انواع عوامل قارچی رایج در میگو هستند که به ویژه در مرحله لاروی سبب میکوزیس می گردند. در حالیکه گونه های فوزاریوم[۴۰] بر روی مرحله پست لاروی و جوان میگو موثر بوده و بیماریزا می باشند. مطالعات بر روی پاتوژنیسته ، قدرت و مکانیسم بیماریزایی قارچ ها در حال انجام است ولی هنوز اطلاعات کاملی در دسترس نمی باشد(Guzman, A., et al., 2000).

جدول ۲-گونه های قارچی پاتوژن میگو

شاخه	گونه قارچ	میزبان	علایم بالینی
قارچ های ناقص[۴۱]	*Fusarium solani*	لیتوپنئوس وانامی، پنئوس استیلیرستریس[۴۲]	آبشش سیاه، زخم بافت توام با ملانیزه شدن ضمایم، حضور اسپور قارچ در آبشش
	Fusarium oxysporum	پنئوس دوراروم[۴۳]	
قارچ های حقیقی[۴۴]	*Lagenidium callinectis*	تمام گونه های جنس پنائوس	کاهش فعالیت لارو، وجود اسپور قارچ در آبشش و ضمایم، مرگ ومیر لارو (۹۰ درصد) در مدت ۲ الی ۳ روز
	Lagenidium mycelaon	لیتوپنئوس وانامی، پنئوس استیلیرستریس	
	Sirolpidium sp.	تمام گونه های جنس پنائوس	
	Haliphthrous myfordensis	پنئوس ستیفروس[۴۵]	

[38] *Langenidium* sp.
[39] *Sirolpidium* sp.
[40] *Fusarium* sp.
[41] Deutromycotina
[42] *Penaeus stylirostris*
[43] *Penaeus duorarum*
[44] Eumycota
[45] *Penaeus setiferus*

۱-۵-۱- فوزاریوزیس[۴۶]

گونه های قارچ فوزاریوم یکی از شایعترین عوامل بیماریزای قارچی میگوهای خانواده پنائیده در تمام مراحل زندگی می باشند و عامل بیماری فوزاریوزیس یا آبشش سیاه است. انواع گونه های فوزاریوم عامل این بیماری عبارتند از: فوزاریوم سولانی[۴۷]، فوزاریوم مولینی فرم[۴۸]، فوزاریوم اکسیسپوروم[۴۹] و قارچ اتکینسیلا دوبیا[۵۰]. این قارچ ها همگی پاتوژن فرصت طلب بوده و در شرایط مساعد می توانند سبب مرگ و میر ۹۰ درصدی در مزارع شوند. میگوهای زنده در انتقال افقی این قارچ ها نقش داشته و بهترین روش تشخیص آزمایش مستقیم آبشش و ضمایم میگو با میکروسکوپ نوری است (Guzman, A., et al., 2000).

۲-۵-۱- مایکوزیس لاروی

این عفونت بواسطه عوامل قارچی مانند: گونه های لاژنیدیوم [۵۱]، لاژنیدیوم کالینستس [۵۲]، گونه های *سیرولپیدیوم*[۵۳]، *هالیفتروس میلفوردنسیس* [۵۴]، *گونه های فیتیوم* [۵۵] و *لپتولگنیا مارینا*[۵۶] ایجاد می شود. تمام گونه‌های میگو به ویژه در مرحله زوآ و مایسس به این قارچ ها حساس هستند. در میگوهای بالغ، میکوزیس لاروی در هنگام تضعیف سیستم ایمنی، سوء تغذیه، مشکلات فیزیولوژیک، استرس و... ایجاد می شود. بیماری بر اثر اتصال و چسبیدن تسپورهای قارچی به ضمایم سطح کوتیکول میگو به وجود می آید و میسلیوم های قارچی بدون دیواره عرضی که دارای انشعابات زیادی هستند در ضمایم و بافت میگو انتشار می یابند. علایم بالینی ناشی از حضور عوامل قارچی معمولاً ۳ الی ۴ روز بعد از عفونت اولیه مشاهده می شود و ۲۴ ساعت بعد از ظهور علایم، تلفات لاروها آغاز می گردد. مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ نوری، تهیه لام مرطوب و تهیه مقاطع بافت شناسی از روده، کوتیکول و عضلات شکمی روش هایی هستند که برای تشخیص این بیماری کاربرد دارند. ضدعفونی کردن تانک ها، وسایل و آب ورودی روشی مناسب در کنترل این بیماری می باشد. استفاده از آنتی بیوتیک ها در مراکز تکثیر رایج است(Guzman, A., et al., 2000). ولی مواد زیست یار و پروبیوتیک ها نیز دارای اثرات مشابه آنتی بیوتیک ها در کنترل بیماری می باشند و فاقد اثرات سوء انتی بیوتیک ها نیز می باشند.

---

[46] Fusariosis
[47] *Fusarium solani*
[48] *Fusarium moniliforme*
[49] *Fusarium oxysporum*
[50] *Atkinsiella dubia*
[51] *Lagenidium* spp
[52] *Lagenidium callinectes*
[53] *Sirolpidium* spp.
[54] *Haliphthoros milfordensis*
[55] *Phythium spp*
[56] *Leptolegnia marina*

۶-۱- تاریخچه روش ریبوتایپینگ

در اوایل دهه ۱۹۶۰ همزمان با پیشرفت دانش ویژگی های DNA و پیشرفت زیست شناسی مولکولی این ایده در مجامع علمی شکل گرفت که طبقه بندی و شناسایی باکتری ها از طریق مقایسه ژنومشان امکان پذیر است. در آغاز این طبقه بندی بر اساس ترکیب بازهای DNA (C+G٪) صورت گرفت . درصد سیتوزین + گوانین باکتریها در گونه های مختلف اختلاف مشهود دارد. از آن جهت که این طبقه بندی فقط اطلاعات سطحی را در مقایسه ارائه می دهد و مطالعات دقیق تری مورد نیاز است. بنابراین تکنیک هیبریداسیون DNA-DNA [۵۷] توسعه یافت. مزیت عملی مهم این تکنیک عبارت است از تعریف دقیقی از سویه های یک گروه[۵۸] که بر اساس خصوصیات فنوتیپی یکسان در نظر گرفته می شدند. در تعریف فیلوژنی، بطورکلی یک گونه شامل سویه هایی است که میزان تطابق هیبریداسیون DNA-DNA آنها حدود ۷۰ درصد یا بیشتر است و ΔT_m آنها ۵ درجه سانتیگراد یا کمتر است. این تکنیک هنوز در باکتری شناسی سیستماتیک مهم است ولی دارای محدودیت هایی از جمله عدم امکان مقایسه بیش از دو سویه در یک زمان می باشد که یکی از سویه ها باید سویه رفرنس باشد(Kashyap, S.K. et al., 2014).

اگرچه پیشرفت هایی در زمینه سایر تکنیک های مولکولی مانند RAPD[۵۹]، AFLP[۶۰] و RFLP[۶۱] در علم باکتریولوژی صورت گرفته است اما طبق مصوبه کمیته AD hoc ۲۰۰۲ DNA-DNA re-association و توالی یابی 16S rDNA روش های اصلی در تعیین و تعریف گونه های باکتریایی می باشند (Stackerbrandt et al., 2002).

۷-۱- اصول بکارگیری rRNA و ژن های rRNA به عنوان ابزار طبقه بندی و تشخیص

ریبوزوم اندامک درون سلولی است که دارای منشاء باستانی و جهانی می باشد. هر سلولی برای ترجمه به ریبوزوم نیاز دارد، تعداد ریبوزوم ها در یک سلول از چندصد تا صد هزار متغیر است و خاص هر گونه ای می باشد.از آن جهت که مرکز اصلی ترجمه در سلول ریبوزم ها می باشند لذا ساختار اولیه آنها منسجم است. ریبوزوم از پروتئین و RNA ریبوزومی تشکیل شده است. ریبونوکلئیک اسید، مولکول مرکزی فرایند ترجمه است. لذا دارای نیازهای دقیتری می باشد بطوری که کمترین تغییرات در توالی نوکلئوتیدهای rRNA اثر مخربی بر ترجمه خواهد داشت. بنابراین در طی تکامل rRNA، توالی های اصلی آن ثابت و محافظت شده بوده است و بدین ترتیب مکانیسم ترجمه کارایی بالایی داشته باشد. شاید به همین دلیل است که توالی ژن های rRNA به صورت افقی در بین اعضای یک گونه گسترش نیافته است. این اختلافات بین rRNA سلول های مختلف نشانگر جدایی (انفصال) اتفاق افتاده بین اجداد اولیه و سلول های امروزی است و این امر آن ها را شاخص مناسبی برای

---

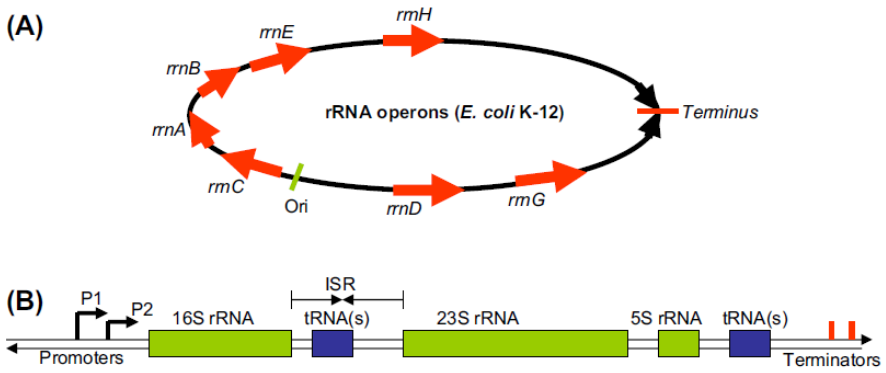
[57] DNA-DNA hybridization

[58] Cluster
[59] Amplified Fragment Length Polymorphism
[60] Randomly Amplified Polymorphic DNA
[61] Restriction Fragment Length Polymorphism

مطالعات فیلوژنی می نماید و تعداد و پراکنش ژنهای rRNA مختلف شاخص اندازه گیری گوناگونی زیستی می باشد(Kashyap, S.K. et al., 2014).

۸-۱- ساختار اپرون ریبوزومی

در پروکاریوت ها، زیر واحد کوچک ریبوزوم (۳۰S) دارای ملکول 16S rRNA (حدود ۱۶۰۰ نوکلئوتید) و زیر واحد بزرگتر (۵۰S) دارای ملکول 23S rRNA (حدود ۳۰۰۰ نوکلئوتید) و 5S rRNA (حدود ۱۲۰ نوکلئوتید) می باشد. ژن های این سه rRNA با یکدیگر در یک اپرون به نام اپرون ریبوزومی قرار دارند (تصویر ۲ الف و ب). این اپرون شامل ژن های 16S rRNA، 23S rRNA و 5S rRNA از سمت '۵ به '۳ است. این ژن ها توسط قطعات کوچک نوکلئوتید به نام نواحی فاصله بین ژنی (ISR)[۶۲] از هم جدا می شوند که احتمالاً مربوط به ژن های برخی از tRNA ها باشند. ژن های rRNA در تمام باکتری ها اندازه ای حدود ۱/۵ کیلوباز دارند و شامل بخش های بسیار محافظت شده، نواحی متغیر و نواحی بسیار متغیر مربوط به گونه، جنس و خانواده می باشند. از میان سه ژن rRNA، توالی ژن 16S rRNA محافظت شده ترین است و گونه هایی که DNA آنها مشابهت ۷۰ درصد یا بیشتر دارد معمولاً توالی ژن 16S rRNA آنها ۹۷ درصد با هم مشابهت دارد. ۳ درصد باقیمانده یا ۴۵ نوکلئوتید خیلی در ساختار اولیه مولکول مشکلی ایجاد نمی کند و بیشتر در ناحیه بسیار متغیر قرار دارند. نواحی ISR نشانگر فیلوژنی بین گونه ای می باشد. بنابراین rRNA و ژن آن بیانگر گروه یا تیپ باکتری ها با استفاده از ابزار مولکولی می باشد و این فرایند ریبوتایپینگ[۶۳] نامیده می شود(Kashyap, S.K. et al., 2014).



تصویر ۲- (الف) ساختار ۷ اپرون مختلف باکتری *E.coli* K-12 (ب) ساختار ژن های rRNA و tRNA و ناحیه فاصله داخلی

[62] Internal Spacer Region
[63] Ribotyping

۹-۱- تکنیک ریبوتایپینگ

اولین بار در سال ۱۹۸۶، الگوهای متعددی از قطعات هیبرید شده ژن های rRNA گونه های مختلف باکتریایی را بدست آوردند و همچنین مشاهده کردند که این گونه ها درای الگوی خاصی هستند که بین آنها ارتباط وجود دارد (Grimont&Grimont,1986). این امر منجر به پیدایش و بکارگیری ریبوتایپینگ به عنوان ابزاری در شناسایی و طبقه بندی باکتری ها شد که در آن از اختلافات ملکول های RNA ریبوزومی یا ژن های کد کننده آن ها استفاده می شود. ریبوتایپینگ، تکنیک انگشت نگاری با قابلیت تکرار پذیری و دقت بالا است. تاکنون بیش از ۲۵۰۰۰۰۰ توالی 16S rRNA گونه های مختلف در دسترس است که بخش عمده ای از آن شامل گونه های غیر قابل کشت است. ریبوتایپینگ اولین تکنیکی است که به منظور تمایز آرکی باکتر ها از یوباکتریا استفاده شد. بر اساس پیشرفت های علم بیوتکنولوژی، تکنیک های مختلفی برای ریبوتایپینگ مورد بررسی است(Kashyap, S.K. et al., 2014).

۱۰-۱- بیماریهای شایع در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی میگوی وانامی

بیماریهای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی که در مراکز تکثیر و مزارع پرورشی میگوی وانامی شایع هستند در جداول ۳ و ۴آورده شده است.

جدول ۳- 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 ۴- 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- مروری بر منابع

۲-۱- سوابق تحقیق در زمینه شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی میگو در خارج از کشور

شناسایی مولکولی باکتری ها بر اساس روش ریبوتایپینگ در عرصه پزشکی و فناوری زیستی کاربردهای فراوانی دارد و به عنوان روشی قابل اعتماد در تشخیص دقیق سویه های باکتریایی و قارچی و همچنین قرابت فیلوژنیک این گونه ها شناخته شده است (Kim et al., 2001 & Urakawa et al.,1997) ولی در زمینه آبزی پروری در سالیان اخیر مورد توجه قرار گرفته و در برخی مقالات به کاربرد آن ها در شناسایی دقیق سویه ها اشاره شده است.

Kim و همکاران (۲۰۰۱) از روش توالی یابی بر اساس 16S rRNA به منظور شناسایی *Vibrio vulnificus* استفاده کردند (Kim et al., 2001).

Kong و همکاران (۲۰۰۱) برای تشخیص دقیق *Aeromonas* spp. توالی یابی ناحیه بین16-23 S rRNA را انجام دادند(Kong et al., 2001).

Liu و همکاران (۲۰۰۴) عفونت ناشی از *Vibrio alginolyticus* در میگوی لیتوپنئوس وانامی را با استفاده از روش ریبوتایپینگ بر اساس 16S rRNA شناسایی کردند (Liu et al., 2004).

Felix و همکاران (۲۰۱۱) گونه های مختلف ویبریو را از میگوی پنئوس مونودون سوماترا و جاوه جداسازی کرده و به منظور شناسایی مولکولی آن از ریبوتایپینگ بر اساس 16S rRNA استفاده کردند و قرابت فیلوژنیک آن ها را مورد بررسی قرار دادند(Felix et al., 2011).

درتایلند، باکتری عامل سندروم مرگ زود رس میگو از هپاتوپانکراس میگوهای آلوده مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت و چهار سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس شناسایی شد که بیماریزایی متفاوتی داشتند (Joshi, et al., 2014).

به دنبال مرگ و میر مراحل لاروی میگوی پنئوس مونودون در کشور هند، باکتری جداسازی شده در محیط کشت تیوسولفات بایل سوکروز آگار، به روش ریبوتایپینگ مورد شناسایی قرار گرفت و ویبریو کلرا سویه O139 گزارش شد که برای انسان نیز بیماریزا می باشد(Joseph, et al., 2015).

در پژوهشی در ویتنام از میگوهای پنئوس مونودون مبتلا به آبشش سیاه، بر اساس شناسایی مولکولی گونه جدیدی از قارچ فوزاریوم به نام *F. incarnatum* شناسایی شد (Khoa et al. 2004).

در دسامبر سال ۲۰۰۶، عفونت ناشی از قارچ *Halioticida* spp. در آبشش میگوهای مانتیس وحشی ژاپن گزارش شد و طبق شناسایی مولکولی دارای ۱۰۰-۹۹ درصد مشابهت ژنتیکی با *Halioticida noduliformans* بود (Atami et al. 2009).

قارچ *Plectosporium oratosquillae* به وسیله تکنیک شناسایی مولکولی از میگوی مانتیس مبتلا به آبشش سیاه در ژاپن شناسایی شد (Duc P.M., et al., 2009).

Karthikeyan و همکاران (۲۰۱۵)، برای اولین بار از آبشش میگوی وانامی مبتلا به بیماری آبشش سیاه، قارچ آسپرژیلوس را جداسازی و با روش های مولکولی مورد توالی یابی قرار دادند و عامل آبشش سیاه میگو *Aspergillus awamori* KM434331 گزارش شد (Karthikeyan, et al., 2015).

۲-۲- سوابق تحقیق در زمینه شناسایی مولکولی عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی میگو در داخل کشور

در استان بوشهر ، باکتری *V.harveyi*، از ناپلی میگوهای لیتوپنئوس وانامی جداسازی شده و بر اساس آنالیز مولکولی و ریبوتایپینگ شناسایی این باکتری انجام و در بانک جهانی ژن با کد(GenBank accession number GU974342.1) و کلکسیون باکتری های بومی ایران با کد PTCC 1755 ثبت شده است (Mirbakhsh, et al., 2014). در مطالعه ای دیگر ۳۱۵ نمونه آب، رسوب و میگو از سه منطقه دلوار، حله و مند در استان بوشهر در طول نمونه برداری شد و باکتری های جداسازی شده مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از روش مولکولی(PCR) نشان داد که ایزوله های باکتریایی جداسازی شده به ترتیب دارای بیشترین مشابهت ژنتیکی با ویبریو آلجینولایتیکوس استرین L67 (۹۶٪)، ویبریو کرالی لایتیکوس استرین ATCC BAA-450 (۹۶٪)، ویبریو آلجینولایتیکوس استرین CIFRI V-TSB1 (۹۶٪) ، ویبریو هاروی (۹۴٪) و ویبریو هپاتاریوس استرین CIBAAG5(۹۷٪) بودند و از میان آنها ویبریو کرالی لایتیکوس فراوانترین گونه بود (باصری، س ۱۳۹۳).

فرضیه

- شناسایی مولکولی میکروارگانیسم های پاتوژن میگو در مدیریت بهداشتی و پژوهش های بهداشت و سلامت میگو مفید است.

اهداف تحقیق

- شناسایی مولکولی و نگهداری باکتری ها و قارچ های پاتوژن جداسازی شده از میگوی پرورشی لیتوپنئوس وانامی
- ثبت اطلاعات ژنتیکی باکتری ها و قارچ های پاتوژن به منظور حفاظت از مالکیت معنوی آنها
- ثبت توالی SrRNA۱۶ و SrRNA۱۸ میکروارگانیسم های شناسایی شده در بانک های ژنی بین المللی مانند NCBI
- نگهداری نمونه های ذخیره (Backup) از میکروارگانیسمها برای استفاده آتی آنها

۳- مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد

۳-۱-۱- تجهیزات موردنیاز

دستگاه ترمال سایکلر - دستگاه میکروسانترفیوژ - دستگاه الکتروفورز - دستگاه UV transluminator -- دستگاه گرداننده[۶۴] - دستگاه حرارتی برای لوله ها – میکروپیپت- سیستم عکس برداری دیجیتال- اتوکلاو- انکوباتور- ترازو- هیتر- هود لامینار- چراغ گاز آزمایشگاه

۳-۱-۲- لوازم شیشه ای و غیره :

ظروف نمونه برداری استریل، لوله آزمایش، ارلن، پی پت مدرج، پلیت استریل، هاون چینی، میله شیشه ای ال شکل، قیچی، سکالپل، پنس، جا لوله ای، سواب، کاغذ صافی

۳-۱-۳- مواد مصرفی:

محیط کشت تریپتیک سوی آگار[۶۵]، محیط کشت تریپتیک سوی براث[۶۶]، تیوسولفات سیترات نمک صفراوی ساکارز آگار[۶۷] ، معرف اکسیداز، گلوکز، اینوزیتول، مانیتول، سوکروز، دیسک O129، کیت رنگ آمیزی گرم، کلرید سدیم، ژل آگارز، آب مقطر

۳-۱-۴- مواد مورد نیاز جهت شناسایی NHPB

کیت تخلیص شامل:

محلول DTAB- محلول CTAB- محلول حلال

کیت آمپلیفیکاسیون توالی ویژه NHPB

پیش مخلوط اولین PCR شامل :

بافر واکنش، dNTPs ، پرایمرهای ویژه NHPB

پیش مخلوط Nested PCR شامل:

بافر واکنش ، dNTPs ، پرایمرهای ویژه NHPB-

محلول استاندارد مثبت:

tRNA مخمر

IQzyme DNA polymerase

6X loading dye

---

[64] Vortex
[65] Tryptic Soy Agar
[66] Tryptic Soy Broth
[67] TCBS

شاخص وزن مولکولی DNA شامل: وزن های مولکولیbp ۸۴۸، bp ۶۳۰ و bp ۳۳۳.

۵-۱-۳- مواد مورد نیاز جهت شناسایی باکتری های خانواده ویبریوناسه

کیت استخراج DNA ژنومیک باکتریایی گرم منفی (IBRC)

کیت استخراج DNA از روی ژل آگارز (IBRC)

کیت خالص سازی محصول PCR (IBRC)

Eubacterial universal primers (Sigma):

forward primer:5'–3'(27F GAGTTTGATCCTGGCTCAG)

reverse primer : 5'–3' (1392R ACGGGCGGTGTGTRC)

محلول های لازم جهت انجام الکتروفورز ژل آگارز

۶-۱-۳- حجم نمونه گیری

مرکز ملی تولید میگوی عاری از بیماری خلیج فارس به عنوان مکان نمونه برداری بود.

در صورت مشاهده میگوی مشکوک به بیماری در هر سه نسل F0، F1 و F2 با توجه به مرحله رشد میگو نمونه گیری به صورت غیر تصادفی انجام شده و در برخی موارد مشکوک پس از نمونه برداری از آب، باکتری غالب مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت.

۷-۱-۳- نمونه های مورد بررسی

انواع نمونه های مورد بررسی و زمان نمونه برداری در هر نسل در فازهای مختلف اجرا مطابق جدول ۵ بود.

جدول ۵ - نمونه برداری های صورت گرفته در هر نسل

نسل ها و مراحل اجرایی در هر فاز		
فاز اول(F_0نسل) شامل: به گزینی و تکثیر مولدینF_0	فاز دوم (نسل F_1) شامل: پرورش لارو های F_1 تا مرحله پیش مولد، مولد سازی میگو هایF_1 تا مرحله رسیدگی جنسی و به گزینی و تکثیر مولدینF_1	فاز سوم (نسل F_2): پرورش لارو هایF_2 تا مرحله پیش مولد و مولد سازی میگو هایF_2
میگوی پیش مولد، آب	میگوی مولد، لارو، آب	مراحل لاروی، آب

۸-۱-۳- نحوه انتقال نمونه ها

نمونه های میگوی تلف شده و یا دارای علایم بالینی خاص و همچنین نمونه های آب در یخدان و دور از نور خورشید، سریع به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده میگوی کشورانتقال داده شد.

۲-۳- روش ها

۱-۲-۳- آزمایشات باکتری شناسی آب و مراحل مختلف میگوهای دارای علایم بالینی

همولنف (مولدین و میگوهای بالغ):

پیش از آزمون سطح میگو را توسط الکل ۷۰ درصد یا بتادین استریل کرده و سپس توسط سرنگ انسولین همولنف میگو آسپیره می گردد.

مراحل لاروی:

تعداد ۱۰ عدد لارو میگو هموژن شده سپس به میزان مشخصی در محیط کشت TSA و TCBS کشت داده شد.

مراحل پست لاروی: از پست لارو میگوها نیز نمونه گیری انجام شده و عملیات باکتری شناسی مطابق مراحل قبل انجام گردید.

بافت عضله، تخمدان و سایر ارگان ها:

پیش از آزمون سطح میگو را توسط الکل ۷۰ درصد یا بتادین استریل کرده سپس با توجه به بافت مورد نظر، توسط قیچی تشریح در شرایط آسپتیک از بافت مورد نظر برداشت و پس از هموژن کردن، یک گرم از نمونه را در شرایط استریل توزین و مطابق زیر از آن رقت تهیه شد.

آب:

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

تهیه رقت از نمونه:

در صورتی که نمونه نیاز به رقیق شدن داشته باشد در کنار شعله و توسط پی پت استریل، ۱ گرم از نمونه (بافت) و یا ۱ میلی لیتر از نمونه (آب) 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 در مواردی که نیاز به غنی سازی بود یک گرم از بافت هموژن شده در محیط کشت تریپتیک سوی براث تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، یک میلی لیتر از مایع به محیط کشت تریپتیک سوی آگار تلقیح و پس از ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرماگذاری، کلونی های دارای بیشترین فراوانی جداسازی و خالص سازی شدند. (استاندارد ملی ایران شماره های ۴۲۰۷، ۷۲۲۳، ۹۸۹۹، ۸۹۲۳).

۲-۲-۳- شناسایی بیوشیمیایی سویه های باکتری در حد جنس

برای شناسایی سویه باکتری مورد بررسی تست های بیوشیمیایی زیر انجام شد:

رنگ آمیزی گرم

رنگ آمیزی کلونی های باکتری مطابق با روش رایج انجام گرفت (Tille, P., 2012)

تست اکسیداز

این تست برای مشخص کردن حضور آنزیم سیتوکروم اکسیداز باکتریایی مورد استفاده در اکسیداسیون ترامتیل-پی- فنیل دی آلانین دی هیدرو کلرید به اندوفنول(محصول بنفش تیره رنگ)، قرار می گیرد. کلونی باکتری پس از مواجهه با معرف در صورتیکه بنفش شد، تست مثبت و در صورتیکه عدم تغییر رنگ، اکسیداز منفی گزارش گردید (**Error! Reference source not found.**).

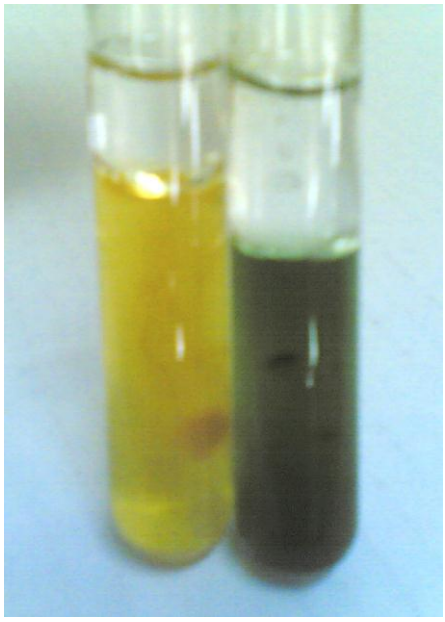
تصویر ۳-تست اکسیداز

تست اکسیداسیون- تخمیر کربوهیدارت[۶۸]

این تست برای مشخص کردن ارگانیسم هایی که از کربوهیدرات برای تولید اسید استفاده می کنند به کار گرفته می شود.

پس از تهیه محیط پایه OF بر اساس روش درج شده بر روی آن و افزودن ۲/۵ درصد نمک، محیط کشت های تهیه شده بر اساس تعداد کربوهیدرات های مورد آزمایش، در ارلن تقسیم شد و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. محلول ۱۰ درصد کربوهیدراتهای مورد نظر را به طور جداگانه تهیه کرده و با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل گردید. پس از این که محیط OF خنک شد، در شرایط استریل به هر ارلن ۱۰۰ میلی لیتر، ۱۰ میلی لیتر از کربوهیدرات اضافه شد (غلظت نهایی کربوهیدرات ۱ درصد). سپس محیط های آماده در لوله های درپیچ دار به میزان ۵ میلی لیتر تقسیم شد. برای هر تست دو لوله در نظر گرفته شد و روی یکی از لوله ها پارافین مایع استریل ریخته شد تا شرایط بی هوازی فراهم شود.

پس از تلقیح باکتری های خالص در محیط های کشت آماده، لوله ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید و تغییر رنگ محیط تا ۱۴ روز پایش گردید. تغییر رنگ معرف به زرد نشانگر مصرف کربوهیدرات و تولید اسید می باشد که با علامت مثبت ثبت گردید(تصویر ۴).

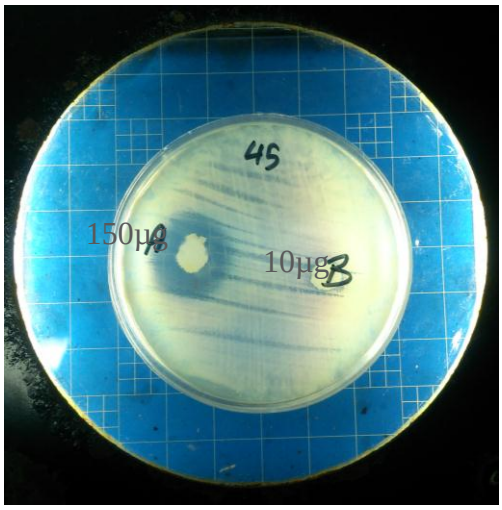


تصویر ۴- تخمیر کربوهیدرات در محیط OF

[68] Oxidative-Fermentative (O-F) test

تست حساسیت به دیسک O/ 129:

این تست برای مشخص کردن حساسیت باکتری های خانواده ویبریوناسه به ماده شیمیایی ۲و۴ دی آمینو ۶و۷ دی سوپروپیل پتریدین استفاده می شود. برای این منظور دیسک های ۱۰ میکروگرمی و ۱۵۰ میکروگرمی O/129 تهیه شد (Ring-bound, 1998) و مطابق روش انتشار از دیسک، تست حساسیت و مقاومت باکتری های جداسازی شده انجام شد.



تصویر ۲- تست حساسیت به دیسکO/129

۳-۲-۳- آزمایشات قارچ شناسی (Lightner, 1996)

میگوهای مولد و بالغ: پس از ضدعفونی قسمت شکمی میگو به وسیله سرنگ انسولین و در شرایط آسپتیک و در کنار شعله نمونه همولنف گرفته شد و در محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و جنتامایسین، مالت اکسترکت آگار و سیب زمینی دکستروز آگار به میزان ۰/۱ میلی لیتر بر روی محیط کشت نامبرده تلقیح شد. از سایر قسمتها شامل هپاتوپانکراس و آبشش نیز به روش عملیات باکتری شناسی و بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار تلقیح شده و در دمای ۲۵درجه سانتیگراد به مدت ۵-۲ روز گرماگذاری گردید و در صورت مشاهده کلونی قارچی، توسط کلیدهای شناسایی موجود و زیر میکروسکوپ مورد شناسایی قرار گرفت.

مراحل لاروی و پست لاروی:

از نمونه های مشکوک، تعداد ۱۰ عدد بچه میگو هموژن شده و یک گرم از نمونه هموژن شده پس از رقت سازی به محیط کشت سابورو دکستروز آگار، مالت اکسترکت آگار و سیب زمینی دکستروز آگار تلقیح شد ،پس از طی مرحله انکوباسیون کلونی ها توسط کلیدهای شناسایی موجود و زیر میکروسکوپ مورد شناسایی قرار گرفتند.

۱-۳-۲-۳- کشت و نگهداری طولانی مدت باکتری ها و قارچ های جداسازی شده:

نگهداری طولانی مدت باکتری ها این امکان را می دهد که نمونه میکروبی، ماه ها و حتی سال ها به صورت زنده باقی بماند. بهترین روش های نگهداری طولانی مدت، لیوفیلیزاسیون و نگهداری در ۵۰°- تا ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع می باشد. لذا پس از جداسازی و شناسایی باکتری ها و قارچ ها اقدام به لئوفلیزاسیون و کرایوپرزرویشن نمونه ها جهت نگهداری طولانی مدت آنها گردید.

برای این منظور پس از ایزولاسیون و شناسایی، تعدادی کلنی برداشته و در یک محیط محافظت کننده از سرما[69] (اسکیم میلک[70] و گلیسرول) سوسپانسیون تهیه شد. سپس حجم کمی از سوسپانسیون باکتریایی را در ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک توزیع نموده و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد . همچنین تعدادی از سویه های باکترایی توسط دستگاه فریز درایر لئوفلیزه شدند.(Hillis et al.,1996 & Stephen et al., 1998).

۴-۲-۳- روش ریبوتایپینگ

۱-۴-۲-۳- استخراج DNA ژنومی

ابتدا باکتری های خالص سازی شده در محیط کشت تریپتیک سوی براث نمکی کشت داده شد سپس ز محیط کشت باکتری با میزان جذب نوری $OD_{A600}=0.5$ مطابق دستورالعمل کیت مخصوص استخراج DNA ژنومیک باکتری های گرم منفی برداشت و در نهایت DNA بسیار خالص با مقدار مطلوب به دست آمد و در فریزر ۲۰- سانتیگراد قرار داده شد.

۲-۴-۲-۳- بررسی کمی و کیفی DNA ژنومی استخراج شده:

به دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز واسپکتروفتومتری انجام شد:

۳-۴-۲-۳- آمپلیفیکاسیون ژن16S rDNA باکتریایی

مطابق **Error! Reference source not found.**، محلول واکنش را آماده کرده و پس از چند ثانیه سانتریفوژ درون دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد که سیکل های آن مطابق جدول ۷ بود.

[69] Cryoprotective
[70] Skim milk

جدول ۶- اجزای محلول واکنش PCR

نام ترکیب	مقدار
10X Taq Buffer	lµ5.0
dNTP Mix,2mM each	lµ1.0
Forward Primer	lµ0.5
Reverse Primer	lµ0.5
25Mm $MgCl_2$	lµ1.5
Template DNA	50-100ng
Taq DAN Polymerase	lµ0.5
Water, nuclease-free	lµup to 50
Total Volume	lµ50

جدول ۷- برنامه دستگاه ترمال سایکلر

مرحله	زمان	دما(°C)	تعداد سیکل ها
واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۴	۱
واسرشت سازی	۱ دقیقه	۹۴	۳۶
اتصال	۴۰ ثانیه	۶۲	
تکثیر	۸۰ ثانیه	۷۲	
تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲	۱

۴-۴-۲-۳- الکتروفورز محصول PCR:

توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید محصول PCR مشاهده شد.

۵-۴-۲-۳- استخراج محصول PCR از ژل آگارز :

برای این منظور از کیت استخراج از ژل آگارز استفاده شد و مراحل استخراج مطابق راهنمای کیت انجام شد و DNA استخراج شده برای مراحل بعدی آزمایش درون فریزر ۲۰- سانتیگراد قرارداده شد.

۶-۴-۲-۳- کمیت سنجی محصول PCR استخراج شده از ژل

با استفاده از دستگاه نانودراپ کمیت و کیفیت DNA محاسبه و یادداشت گردید.

۷-۴-۲-۳- توالی یابی

توالی یابی نمونه ها توسط شرکت "GATC-Biotech" و بوسیله دستگاه "ABI 3730xl"و تکنولوژی SANGER صورت گرفت و توسط نرم افزار BLAST مقایسه توالی های به دست آمده با توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) و ایزوتاکسون صورت گرفت (Chun., J., et al., 2007)

۵-۲-۳- روش شناسایی باکتری بیماری نکروز عفونی پانکراس

به منظور تشخیص این باکتری از کیت IQ 2000 بهره برده شد. این سیستم با اجرای Nested PCR می تواند عفونت های مختلف را در میگو به سه شکل نشان دهد: شدید ، متوسط، خفیف (A. G. Vincent, Breland, V.M., Lotz, J.M., 2004; A. G. Vincent & Lotz, 2005).

۱-۵-۲-۳- آماده سازی نمونه ها و تخلیص DNA

آماده سازی نمونه ها:(جهت انجام روش DTAB-CTAB)

الف) پست لاروها:

۱) حدود ۳۰ عدد از پست لاروها را به درون میکروتیوب ۱/۵ سی سی که محتوی ۰/۶ سی سی محلول DTAB می‌باشد ریخته شد.

۲) نمونه ها در لوله توسط میله یکبار مصرف هموژن گردید.

ب) هپاتوپانکراس:

۱) ۱۰۰میکرو لیتراز محلول ۵۰۰ میلی مولار EDTA به میکروتیوب ۱/۵ سی سی حاوی ۰/۶ سی سی محلول DTAB اضافه و کاملاً مخلوط گردید.

۲)حدود ۲۰ میلی گرم از هپاتوپانکراس به داخل لوله بالا اضافه شد.

۳)هموژن کردن نمونه ها در میکروتیوب توسط میله یکبار مصرف انجام شد.

ج) نمونه مدفوع

۱) میزان ۱ سانتی متر از نمونه مدفوع به داخل میکروتیوب ۱/۵ سی سی حاوی ۰/۶ سی سی محلول DTAB اضافه و کاملاً مخلوط شد.

۲) نمونه ها توسط آسیابگر یکبار مصرف هموژن شدند.

۲-۵-۲-۳- تخلیص DNA

۱) نمونه آماده شده را در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه گرماگذاری سپس در دمای اتاق خنک گردید.

۲) ورتکس با دور آرام بهم زده شد، سپس ۰/۷ سی سی کلروفرم به آن اضافه کرده وآن را به مدت ۲۰ثانیه بوسیله ورتکس مخلوط شد و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۳) میزان ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی محلول را برداشته و به داخل یک میکروتیوب ۱/۵ سی سی جدید وارد گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول CTAB را به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و آن را با دور آرام در ورتکس بهم زده شد ، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد نگهداری می کنیم.

۴) به آرامی آن رادر دمای اتاق خنک کرده و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.
۵) بسیار با احتیاط محلول رویی را خالی کرده و مجددا به پلت باقی مانده ۱۵۰میکرو لیتر محلول حلال اضافه و آن را دردمای به مدت ۵ دقیقه دردمای ۷۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری و سپس دردمای اتاق خنک شد.
۶) سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ انجام شد. سپس محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ سی سی جدید حاوی ۳۰۰ میکرو لیتر از اتانول ۹۵درصد انتقال داده شد.
۷) آن رادر ورتکس به آرامی مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ سانترفیوژ گردید. سپس به پلت حاصله ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و پلت را خشک کرده ودر آب مقطر استریل ویا بافر TE حل شد .

۳-۵-۲-۳- پروتکل انجام آمپلیفیکاسیون

برای انجام آمپلیفیکاسیون از میکروتیوب های ml ۰/۲ یا پلیت های ۹۶ خانه استفاده شد

آماده سازی محلول ها:

۱) مخلوط اولین واکنش PCR:

مخلوط کردن مواد ذیل:

- پیش مخلوط PCRابتدایی ۷/۵ میکرولیتر
- IQzyme DNA polymerase(۲واحد در هر میکرولیتر) ۰/۵ میکرولیتر

۲) مخلوط واکنشی Nested PCR :(۱۵میکرولیتر در هر واکنش)

مخلوط کردن مواد ذیل:

-پیش مخلوط Nested PCR ۱۴ میکرو لیتر
-IQzyme DNA polymerase (۲واحد در هر میکرولیتر) ۱میکرولیتر

۴-۵-۲-۳- شرایط محیطی واکنش ها

الف) برنامه های واکنشی، اولین واکنش PCR

-۹۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲ دقیقه سپس

- ۹۴ برای مدت ۲۰ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ثانیه ،۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه که ۱۵ سیکل تکرار می شود.

- ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد، ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایان سیکل انتهایی انجام می شود .

ب) برنامه های واکنشی Nested PCR :

-۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه،۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه،۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه که ۳۰ سیکل تکرار می شود،

- ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه ، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایان سیکل انتهایی انجام می شود.

سیستم محافظتی و تشخیصی NHPB IQ2000 با بکار کیری برنامه Uni- IQ می تواند صورت پذیرد.

الف) برنامه های واکنشی، اولین واکنش PCR

- ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه ، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه ،

- ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه ، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که ۱۵ سیکل تکرار می شود،

- ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایان سیکل انتهایی انجام می شود.

ب) برنامه های واکنشی Nested PCR :

-۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه که ۳۰ سیکل تکرار می شود،

- ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که در پایان سیکل انتهایی انجام می شود.

روش کار واکنش ها:

۱) آماده سازی محلولهای واکنشی مربوط به اولین واکنش PCR و Nested PCR بر اساس تعداد نمونه ها. برای هر کدام از محلولهای آزمایشی آماده شده کاربرنیاز دارد که سه تا استاندارد مثبت (۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰) و یک کنترل منفی (آب مقطر استریل و tRNA مخمر) قرار دهد.

۲) ۸ میکرولیتر از محلول اولین واکنش PCR به داخل لوله به حجم ۰/۲ سی سی همراه با برچسب ریخته شد.

۳) سپس ۲ میکرولیتر از DNAتخلیص شده نمونه ویا استاندارد را به هر مخلوط واکنشی اضافه گردید.

۴) سپس واکنش PCR اولیه را انجام می دهیم.

۵) ۱۵ میکرولیتر از مخلوط واکنشی Nested PCR را به هر کدام از لوله هایی که PCR مرحله اول برروی آنها صورت گرفته ، اضافه گردید.

۶) سپس مرحله واکنشی Nested PCR انجام شد.

۷) پس از پایان و کامل شدن واکنش لانه ای (Nested)، ۵ میکرولیتراز محلول 6X loading dye را به هرلوله واکنشی اضافه نموده و بخوبی مخلوط گردید.

۵-۵-۲-۳- الکتروفورز

آماده سازی ژل آگارز:

الف) جهت انجام پروسه الکتروفورز از بافر TAB به میزان غلظت عملی 1X استفاده شد. بافری که برای انجام پروسه الکتروفورز و تولید ژل آگارز استفاده می شود بایستی یکسان باشد.

ب) تهیه ژل آگارز ۲ درصد:

میزان ۲گرم آگارز را به داخل فلاسکی که حاوی ۱۰۰ سی سی بافر الکتروفورز است، اضافه گردید. مخلوط را حرارت داده، تا اینکه یک حالت هیالینی بخود بگیرد بدون آنکه ژلی شکل بگیرد. پس از خنک شدن ژل آگارز در دمای (حدود ۵۰ درجه سانتیگراد)، آن را به آرامی به درون ظرف مخصوص ژل ،خالی گردیدو بدقت شانه پلاستیکی و بلاکراز دو طرف جعبه مخصوص ژل برداشته شد.

انجام الکتروفورز

۱) قرار دادن ژل آگارز در ظرف مخصوص ژل، ریختن بافر 1X الکتروفورز به داخل ظرف ژل

۲) ۵ میکرولیتر از محصول رنگی PCR product loading dye به هر کدام از دیواره اضافه شد

۳) مارکر DNA نیز لود گردید

۴) هنگامی که تمامی نمونه ها در جایگاهشان قرار داده شد. قبل از آنکه جریان برق برقرار شود سیم جریان برق را به ظرف مخصوص ژل متصل می کنیم سپس ولتاژ ورودی را بین ۱۰۰تا ۱۵۰ ولت تنظیم گردید.

۶)ماده ویژه لود کننده رنگ که در کیت استفاده می شود شامل دو ماده رنگی است: رنگ برومونول بلو که آبی تیره است.و رنگ زیلین سیانول آبی روشن است.

هنگامی که گستره رنگ آبی به حدود ۱/۲ تا ۲/۳ ژل رسید، دستگاه الکتروفورز را خاموش و ژل از درون ظرف خارج گردید وآن را با روش رنگ آمیزی بروماید اتیدیوم (EtBr) رنگ آمیزی شد.

رنگ آمیزی ژل و جمع آوری اطلاعات:

الف) یک محلول غلیظ رنگی با غلظت ۱۰ mg/ml از بروماید اتیدیوم تهیه شد.

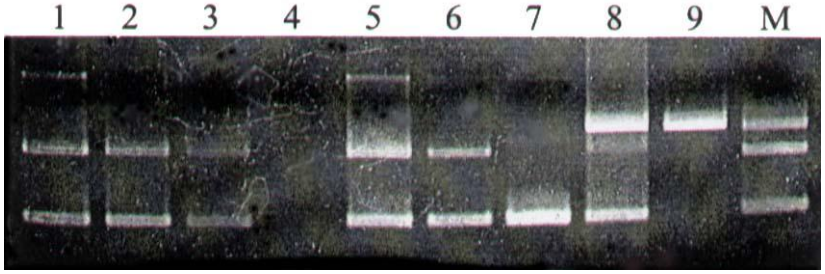
ب) محلول غلیظ رنگی بیست هزار بار رقیق گردید.

ج) پس از تهیه محلول رنگی بالا ، در دمای اتاق به مدت ده دقیقه بر روی ظرف پلاستیکی همراه با ژل قرار داده شد

د) سپس ژل در ظرف پلاستیکی به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از آب مقطر رنگ زدایی گردید و توسط دستگاه UV transluminator نتایج قرائت گردید.

۶-۵-۲-۳- تشخیص

تشخیص طبق راهنمای کیت برروی ژل الکتروفورز انجام گردید (تصویر ۵).



تصویر ۵-نمونه های NHPB مثبت و استاندارد برروی ژل الکتروفورز

ستون۱: استاندارد مثبت 2000copies/reaction

ستون۲: استاندارد مثبت 200copies/reaction

ستون۳: استاندارد مثبت 20copies/reaction

ستون۴: کنترل منفی (tRNA مخمر یا آب مقطر استریل)

ستون ۵: نمونه از عفونت شدید NHPB

ستون ۶: نمونه از عفونت متوسط NHPB

ستون ۷: نمونه از عفونت خفیف NHPB

ستون ۸: نمونه از عفونت خیلی خفیف NHPB

ستون۹: نمونه منفی از نظر وجود NHPB

ستون M: مارکر وزن مولکولی ۸۴۸ bp، ۶۳۰bp، ۳۳۳ bp.

- نمونه منفی تنها یک باند روشن را در۸۴۸ bp نشان می دهد بدلیل آنکه محصول ژن نگهدارنده خانگی رابه عنوان کنترل داخلی دارد.

البته تفسیر باندها وابسته به مرحله میگو نیز می باشد.

۴- نتایج

۴-۱- انواع و تعداد کل نمونه های مورد آزمون

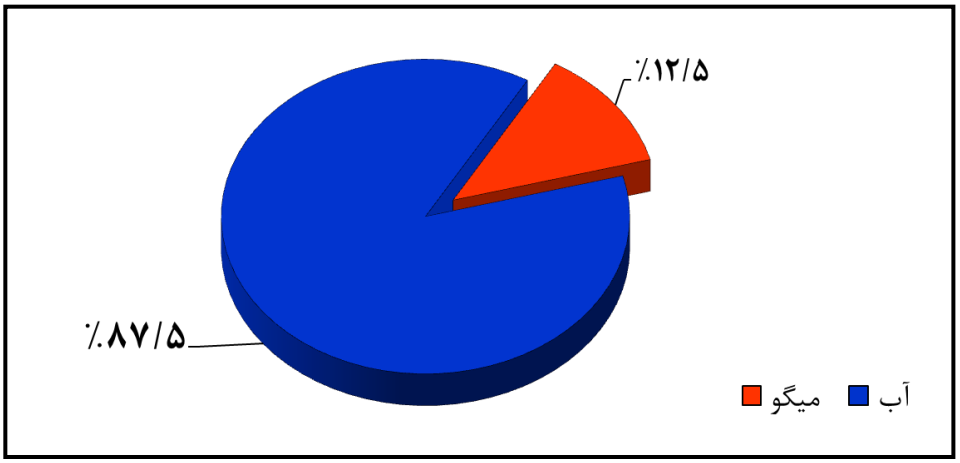
این پروژه از شهریور ۱۳۹۱ لغایت خرداد ۱۳۹۴ به موازات طرح های بیماری شناسی و پایش عوامل بیماریزا و پایش عوامل میکروبی آب (باکتری ، ویروس و قارچ) در تولید میگوی عاری از بیماری خاص صورت گرفت و در طی آن شناسایی مولکولی باکتری ها و قارچ های غالب جداسازی شده از موارد مشکوک به بیماری و آب انجام شد.

جدول ۸- تعداد نمونه های مورد بررسی از شهریور ۱۳۹۱ لغایت خرداد ۱۳۹۴

ردیف	نام نمونه	تعداد
۱	میگو	۷۵۶
۲	آب	۷۴۴
جمع		۱۵۰۰

۴-۲- نتایج آزمون نمونه های مورد پایش

از ۷۴۴ نمونه آب و ۷۵۶ قطعه میگو، ۴۰ ایزوله باکتریایی جداسازی، خالص سازی و در حد جنس شناسایی شد که از این تعداد ۸ ایزوله باکتریایی در نمونه های دارای علایم بالینی و آب بیشترین فراوانی را داشتند(نمودار ۲) که مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. همچنین در صد موارد مثبت از نظر باکتری NHPB در میگو صفر بود. در طی پایش صورت گرفته ایزوله قارچی غالبی جداسازی نگردید.



نمودار ۲- درصد فراوانی باکتری ها بر اساس محل جداسازی

جدول ۹- نتایج تست افتراقی ایزوله های باکتریایی

شناسه باکتری	محل جداسازی	گرم	اکسیداز	o129		رشد در TCBS	سوکروز	مانیتول	اینوزیتول	گلوکز		رشد در محیط حاوی نمک ۰٪
				10µg	150µg					هوازی	بی هوازی	
M-SPF- 001	میگو	منفی	+	R	S	+	+	+	-	+	+	+
M-SPF- 002	میگو	منفی	+	R	S	+	-	+	+	-	+	+
M-SPF- 003	میگو	منفی	+	R	S	+	-	+	+	+	+	+
M-SPF- 004	میگو	منفی	+	S	S	+	+	+	+	+	+	±
M-SPF- 005	میگو	منفی	+	R	R	+	+	±	±	+	+	+
M-SPF- 006	آب	منفی	+	S	S	+	+	+	-	+	+	+
M-SPF- 007	آب	منفی	+	R	S	+	+	+	+	+	+	+
M-SPF- 008	آب	منفی	+	R	S	-	+	+	+	+	+	+
M-SPF- 009	آب	منفی	-	R	S	-	-	-	-	-	-	+
M-SPF- 010	آب	منفی	-	S	S	-	-	-	+	-	-	+
M-SPF- 011	آب	منفی	-	S	S	-	_	+	+	-	-	+
M-SPF- 012	آب	منفی	-	S	S	-	-	+	+	-	+	+
M-SPF- 013	آب	منفی	+	S	S	+	+	-	-	-	-	+
M-SPF- 014	آب	منفی	+	S	S	+	-	-	-	-	-	-
M-SPF- 015	آب	منفی	+	R	S	+	+	+	-	+	+	+

شناسه باکتری	محل جداسازی	گرم	اکسیداز	o129		رشد در TCBS	سوکروز	مانیتول	اینوزیتول	گلوکز		رشد در محیط حاوی نمک ۰٪
				10µg	150µg					هوازی	بی هوازی	
M-SPF- 016	آب	منفی	+	S	S	+	+	_	-	+	+	+
M-SPF- 017	آب	منفی	-	S	S	-	-	-	-	+	+	+
M-SPF- 018	آب	منفی	-	R	R	-	-	+	-	+	+	+
M-SPF- 019	آب	منفی	-	R	R	-	-	+	-	+	+	+
M-SPF- 020	آب	منفی	-	R	S	+	+	+	±	+	+	±
M-SPF- 021	آب	منفی	-	R	R	-	-	+	-	+	-	+
M-SPF- 022	آب	منفی	-	S	S	+	-	-	-	+	-	-
M-SPF- 023	آب	منفی	-	R	R	-	-	+	-	+	-	+
M-SPF- 024	آب	منفی	+	S	S	+	-	-	-	+	+	+
M-SPF- 025	آب	منفی	-	S	S	+	-	-	+	+	-	-
M-SPF- 026	آب	منفی	-	S	S	+	+	+	-	-	-	-
M-SPF- 027	آب	منفی	+	R	R	+	+	-	±	+	+	-
M-SPF- 028	آب	منفی	-	S	S	-	-	-	-	-	-	-
M-SPF- 029	آب	منفی	+	R	R	+	+	-	-	-	-	+
M-SPF- 030	آب	منفی	+	R	R	+	+	-	-	-	-	+
M-SPF- 031	آب	منفی	+	S	S	+	+	-	-	-	+	+
M-SPF- 032	آب	منفی	-	R	R	-	-	-	-	+	+	+
M-SPF- 033	آب	منفی	+	S	R	+	+	+	-	+	+	+
M-SPF- 034	آب	منفی	+	S	S	+	+	-	-	+	+	-
M-SPF- 035	آب	منفی	+	S	S	+	+	-	-	+	+	+
M-SPF- 036	آب	منفی	+	S	R	+	+	+	-	+	+	+
M-SPF- 037	آب	منفی	+	S	R	+	+	±	-	-	+	-
M-SPF- 038	آب	منفی	+	S	R	+	+	-	-	-	+	+
M-SPF- 039	آب	منفی	+	S	R	+	-	-	-	+	+	+
M-SPF- 040	آب	منفی	+	S	R	+	+	+	-	+	+	+

جدول ۱۰ -نتایج ریبوتایپینگ باکتری های غالب جداسازی شده

شناسه باکتری	طول توالی[۷۲] (bp)	درصد مشابهت[۷۳] (٪)	بیشترین مشابهت[۷۴]	شماره دسترسی[۷۵]	کد ثبت در بانک جهانی ژن (NCBI)
M-SPF- 004	1516	99.87%	ATCC 27043(T) *Vibrio nigripulchritudo*	AFWJ01000197	*Vibrio nigripulchritudo* strain IS013(KP843725)
M-SPF- 005	1510	99.21 %	LMG 20546(T) *Vibrio brasiliensis*	AEVS01000097	*Vibrio brasiliensis* strainIS014 (KR186076)
M-SPF- 014	912	100%	Strain: LMG 21460 *Vibrio rotiferianus*	AJ316187	*Vibrio rotiferianus* strain IS015 (KR186077)
M-SPF- 015	1516	98.92%	LC2-005(T) *Vibrio azureus*	AB428897	*Vibrio azureus* strain IS012 (KJ018724.1)
M-SPF- 020	1348	99%	*DY05 Vibrio owensii* strain	FN687911	*Vibrio owensii* strain IS016 (KR186078)
M-SPF- 027	1323	98.87%	strain: WH0801(T), *Agarivorans gilvus*	GQ200591	*Agarivorans gilvus* strain IS017 (KR186079)
M-SPF- 034	1349	99.25%	*Vibrio brasiliensis* strain LMG	X74725	*Vibrio brasiliensis* IS018 (KR186080)
M-SPF- 037	1028	99%	*Vibrio alginolyticus strain ATCC 17749*	NR_118258.1	*Vibrio alginolyticus* strain IS019 (KT223764)

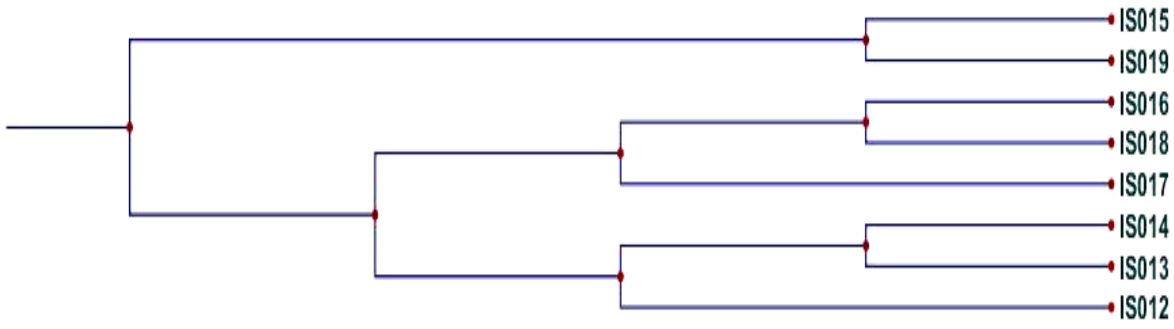
[72] Sequence length
[73] Max identity%
[74] Max identity with
[75] Accession no.

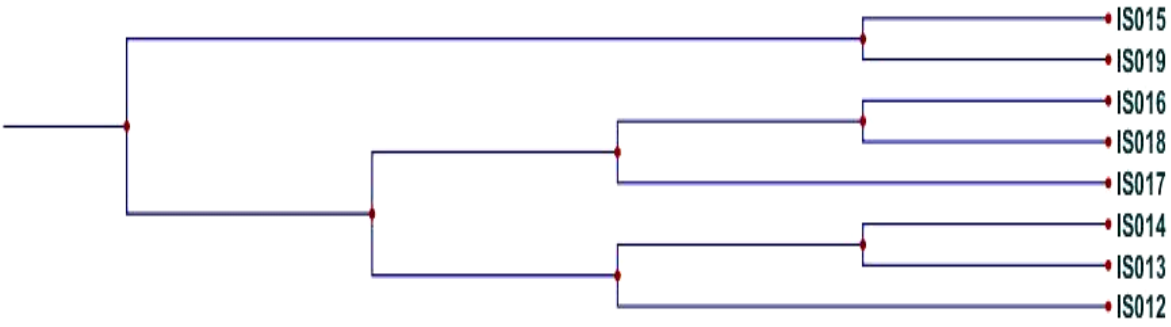
۳-۴- آنالیز مولکولی باکتری های غالب جداسازی شده

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز 16S rDNA و با استفاده از نرم افزار Blast و EZ taxon باکتری های M-SPF- 004 و M-SPF- 005جداسازی شده از میگو، هر دو باکتری متعلق به شاخه گاما پروتئوباکتریاسه، خانواده ویبریوناسه و جنس ویبریو بودند که باکتری M-SPF- 004 دارای ۹۹/۸۷درصد مشابهت با باکتری*Vibrio ATCC 27043(T) nigripulchritudo* بود و با نام *Vibrio nigripulchritudo* strain IS013 در بانک جهانی ژن با کد GenBank KP843725 ثبت شد. همچنین باکتری M-SPF- 005 دارای ۹۹/۲۱ درصد مشابهت با باکتری *Vibrio brasiliensis* LMG 20546(T) بود که با نام *Vibrio brasiliensis* strain IS014 در بانک جهانی ژن با کد GenBank KR186076 ثبت شد. سایر باکتری هایی که مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند نیز متعلق به شاخه گاما پروتئوباکتریاسه، خانواده ویبریوناسه و جنس ویبریو بودند که ثبت آنها در بانک جهانی ژن انجام شده است (جدول ۱۰).

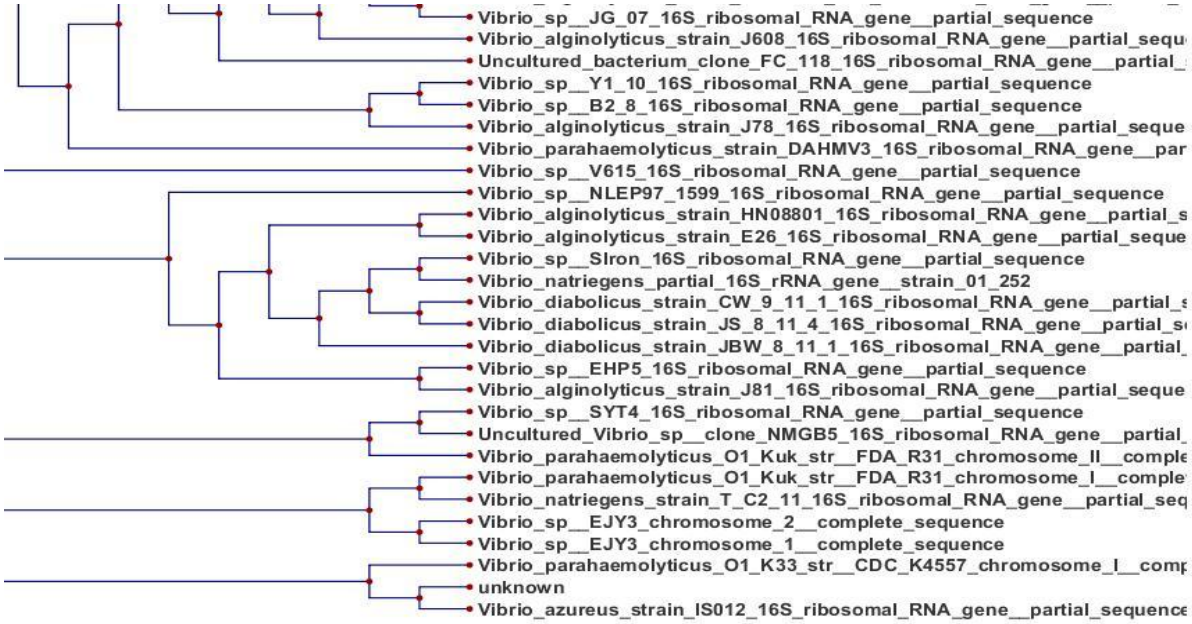
۴-۴- درخت فیلوژنی باکتری های شناسایی شده

با استفاده از نرم افزار Distance tree of results، CLC Sequence Viewer 6 و روش Neighbor Joining درخت فیلوژنی باکتری های شناسایی شده به فرم Rectangle رسم شد (تصویر ۳ الی ۱۱).



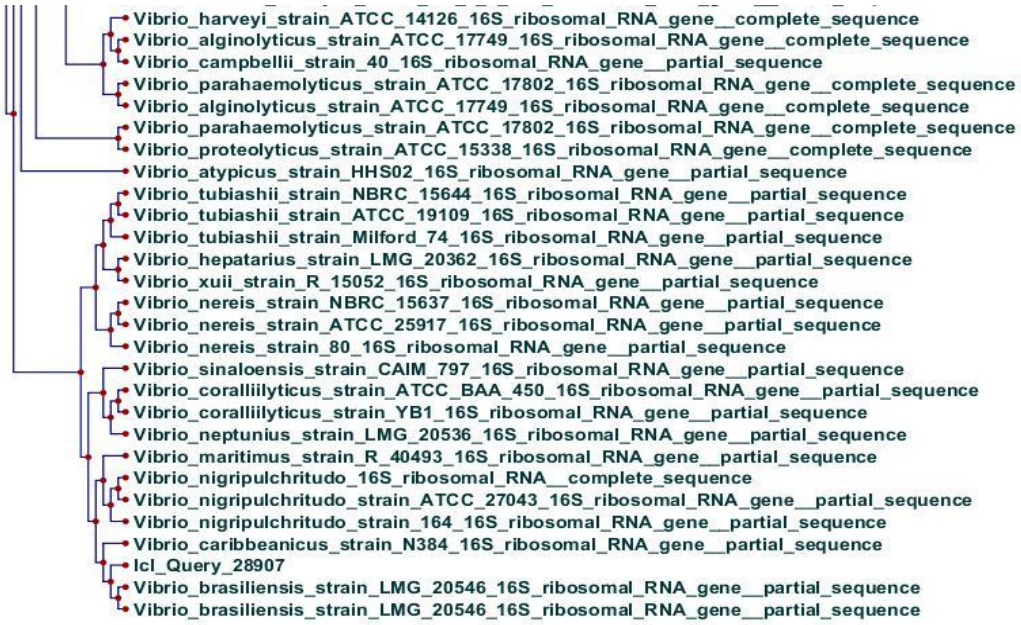


تصوير ۱۱

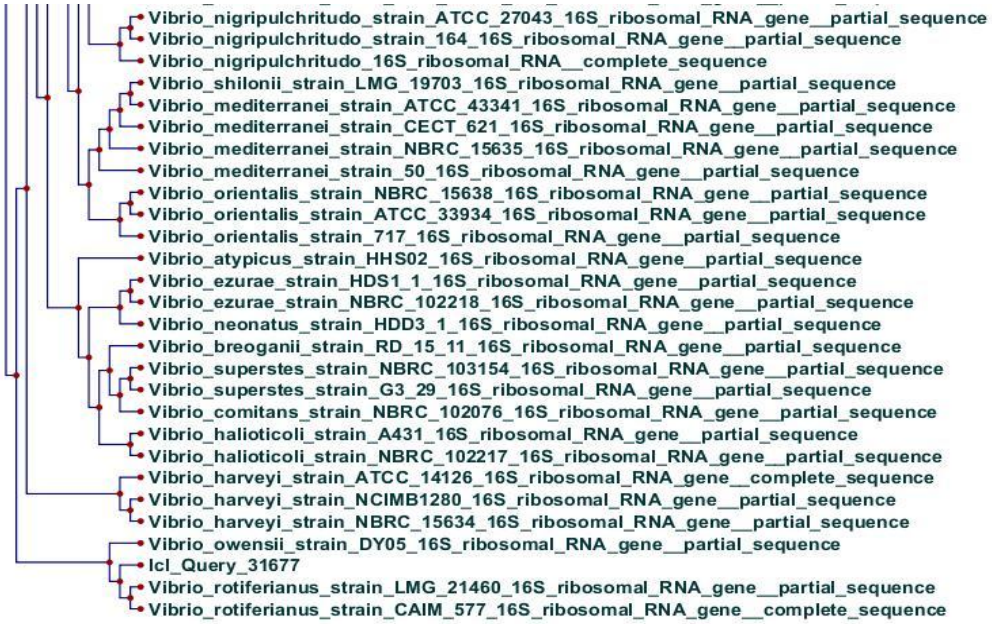


تصوير ۳ -درخت فيلوژني باكتري *Vibrio azureus IS012* به فرم Rectangle

تصویر ۴– درخت فیلوژنی باکتری *Vibrio nigripulchritudo* strain IS013 به فرم Rectangle

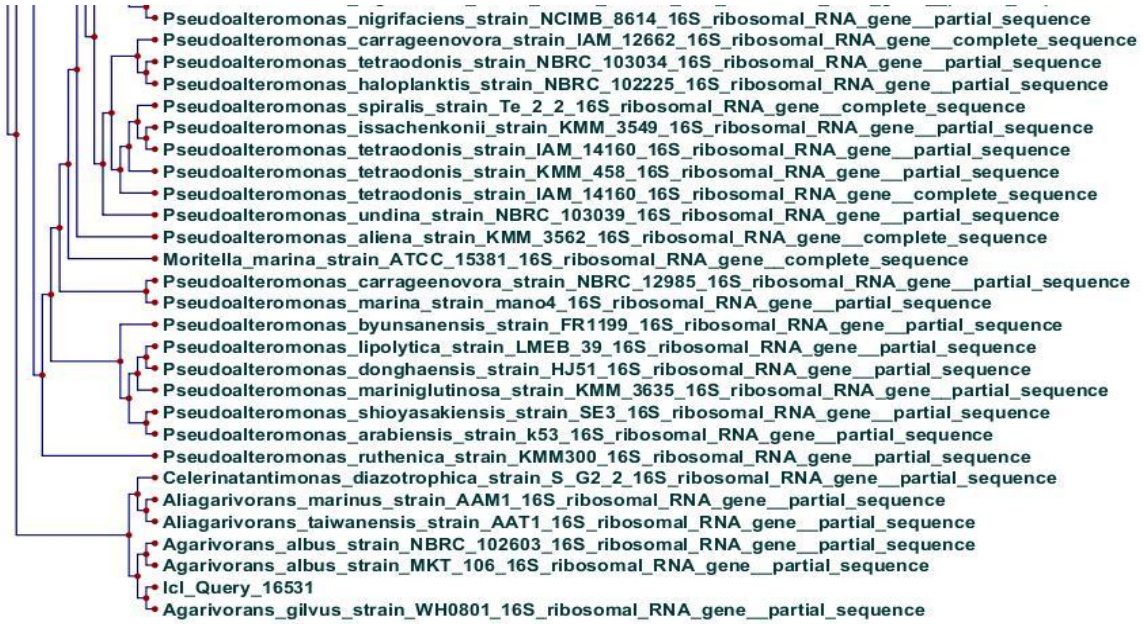


تصویر ۵– درخت فیلوژنی باکتری *Vibrio brasiliensis* strain IS014



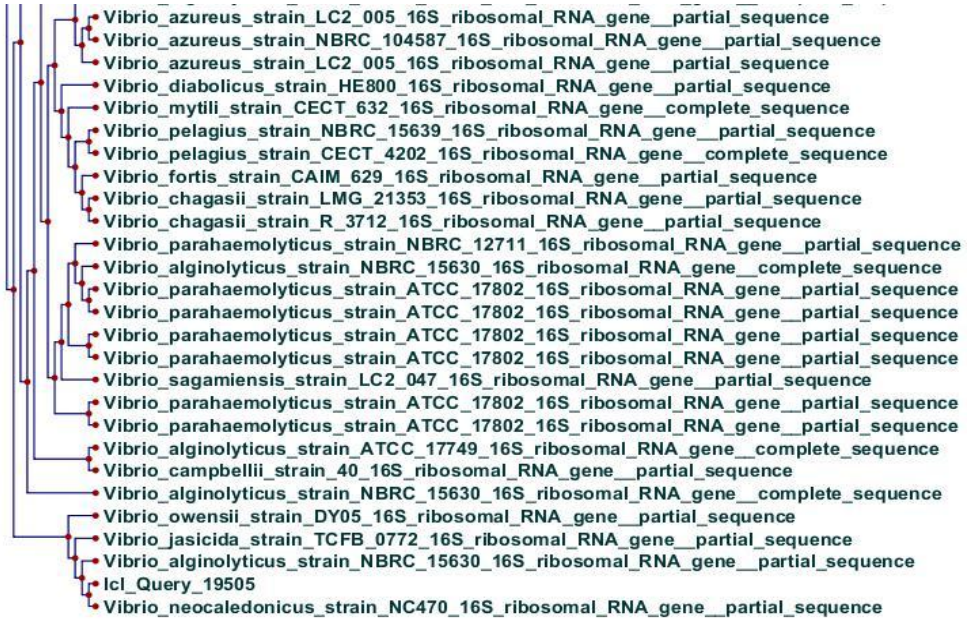
تصوير ۶ - درخت فيلوژني باكتري *Vibrio rotiferianus* strain IS015

تصوير ۷- درخت فيلوژني باكتري*Vibrio owensii* strain IS016

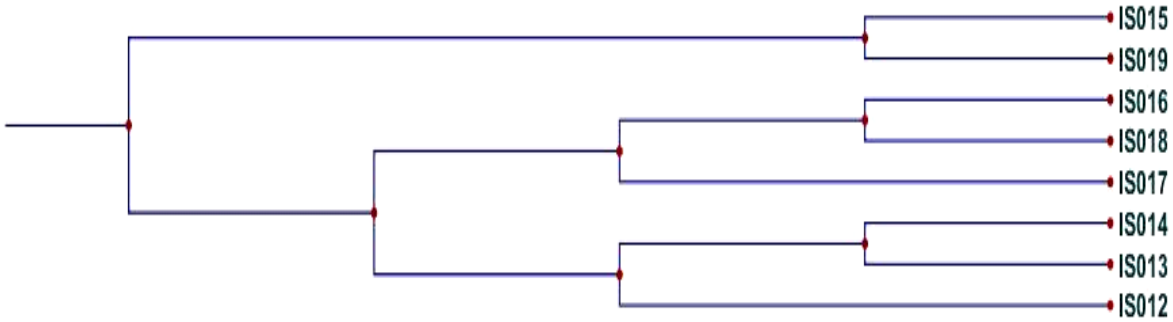


تصویر ۸- درخت فیلوژنی باکتری *Agarivorans gilvus* strain IS017

تصویر ۹- درخت فیلوژنی باکتری *Vibrio brasiliensis* strainIS018



تصوير ۱۰- درخت فيلوژنی باکتری *Vibrio alginolyticus* strain IS019



تصوير ۱۱- قرابت ژنتيکی ايزوله های باکتريايی شناسايی شده

۵- بحث و نتیجه گیری

در دهه های اخیر بیشترین توجه آبزی پروری به سمت اقدامات پیشگیرانه و تشخیصی در خصوص بیماری های ویروسی بود، اما در سال های اخیر، با ظهور بیماریهای نوپدید و بازپدید به ویژه شیوع بیماری باکتریایی سندروم مرگ زودرس میگو[۷۱] و خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری، بیماریهای باکتریایی نیز مورد توجه قرار گرفتند و به روز رسانی روشهای تشخیص بیماری های باکتریایی آبزیان از جمله میگو همگام با اقدامات پیشگیرانه و کنترلی در اولویت قرار گرفت یکی از اقدامات پیشگیرانه به منظور کاهشی خطر ابتلا به بیماری ها استفاده مولدین عاری از بیماری خاص می باشد که در طرح کلان ملی در نظر گرفته شد و به موازات آن شناسایی مولکولی عوامل میکروبی و آگاهی دقیق از عوامل میکروبی موجود در محل تکثیر و پرورش میگو می تواند در کنترل بیماریها و تعیین اندوژن و یا اگزوژن بودن یک عامل بیماری نوپدید یا بازپدید موثر باشد.

به منظور دستیابی به بانک اطلاعات ژنتیکی باکتری ها وقارچ های پاتوژن میگو، شناسایی مولکولی آن ها به موازات اجرای مراحل مختلف تولید میگوی عاری از پاتوژن صورت گرفت که در طی آن میزان موارد مثبت NHPB صفر بود و ۸ سویه باکتریایی جدید از میگو و آب محل زیست آن، به روش ریبوتایپینگ و از طریق توالی یابی ژن 16S rDNA شناسایی و در بانک جهانی ژن ثبت شد. باکتریهای جداسازی شده به منظور پژوهش های آتی به روش کرایوپرزرویشن ذخیره سازی و در پژوهشکده میگوی کشور نگهداری می‌شوند. اما ایزوله قارچی خاصی با فراوانی بالا از میگو و آب زیستگاه آن جداسازی نشد که علت عدم جداسازی عوامل قارچی می تواند مربوط به محل و شرایط نمونه ها باشد که از مرکز تکثیر و پرورش میگوی عاری از بیماری خاص و تحت شرایط مدیریت کیفیت میکروبی بود و لذا ایزوله قارچی با فراوانی بالا در این پژوهش جداسازی نشد. پژوهش هایی که در سال های قبل بر روی شناسایی عوامل باکتریایی و قارچی میگو صورت گرفته است بر اساس روش های سنتی و ویژگی های فنوتیپیک و بیوشیمیایی میکروارگانیسم های موجود در زیستگاه و اندام های میگو بوده است (افشار نسب۱۳۹۳، میربخش، م.۱۳۸۹، دشتیان، ع. ۱۳۸۹، کیسمی، م.۱۳۷۸) و این امر سبب کاهش دقت و ویژگی شناسایی عوامل میکروبی به خصوص باکتری های جداسازی شده از زیستگاه آبزی می شد. زیرا اکثر روش های شناسایی روتین در علم پزشکی و دامپزشکی بر اساس نمونه گیری از یک محیط غنی از موادغذایی (مانند بافت، خون، سرم و...) و تلقیح نمونه برداشت شده به محیط کشت مغذی می باشد ولی در علم تشخیص بیماری های آبزیان از آن جهت که آبزی در اکوسیستمی متفاوت با موجودات خشکی زی زندگی می کند کیفیت و ویژگی های آب محل زندگی آبزی به طور مستقیم بر شاخص های سلامت آبزی تاثیرگذار است به عنوان مثال یکی از عوامل تکثیر و پرورش موفق میگو در کنار سایر عوامل مدیریت کیفیت آب می باشد. پرواضح است که میکروارگانیسم ها یکی از عوامل مهم و تاثیرگذار بر کیفیت آب می باشند زیرا

[71] Early Mortality Syndrom

در واقع آنها حلقه اول زنجیره غـذایی زیسـتگاه آبـزی را تشـکیل داده و همچنـین بـا مشـارکت در چرخـه هـای نیتروژن (نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون)، کربن، فسفر و گوگرد نقـش مهمـی در کمیـت فاکتورهـای شـیمیایی آب و در نهایت کیفیت آن دارند و در بسیاری از منابع علمـی، نقـش ارزنـده ی کنتـرل کیفـی آب و اسـتفاده از پروبیوتیک ها و موادضدعفونی کننده در پیشگیری و کنترل بیماری های میگو گزارش شده اسـت. لـذا یکـی از منابع نمونه برداری در هنگام تشخیص بیماریهای آبزیان، آب و یا رسوب محل زندگی آبزی مـی باشـد (López-Torres, 2001). در چنین شرایطی مطابق با روش های روتین میکروب شناسـی، گـام اول تلقـیح نمونـه بـه محـیط کشت مغذی می باشد که به دلیل این که میکروارگانیسم ها از یک محـیط الیگـوتروف و متغیـر ماننـد آب وارد یک محیط مغذی می شوند، در ویژگی های بیوشیمیایی آنها تغییراتی رخ داده و این امـر در پاسـاژهای بعـدی و تکرار آزمایشات مشهود می شود، لذا شناسایی دقیق باکتری با روش های بیوشیمیایی روتـین بـا دقـت و ویژگـی پایینی انجام می شود و امروزه با پیشرفت های صورت گرفته در علوم سلولی مولکولی، ژنتیک، بیوتکنولوژی و به تبع آن به روی کار آمدن روشهای نوین تشخیصـی، بکـارگیری روشـهای مولکـولی در شناسـایی و تشـخیص عوامل میکروبی و بیماریزا و پژوهش های تاکسونومی توصیه می شود و حتی با روشهای مستقل از کشـت ماننـد متاژنومیکس، می توان به شناسایی جمعیتی از میکروارگانیسم های غیرقابل کشت در یک نمونه از جاندار، آب، رسوب، خاک و ... اقدام نمود (Kuczynski ., et al., 2011).

گونه های ویبریو بطور طبیعی در محیط زیست حضور دارند و یکـی از رایجتـرین بـاکتری هـا در طـی پـرورش میگو می باشند (Vandenberghe, et al, 2003). در سال های اخیر تعدا گونه های ویبریویی کـه گـزارش مـی‌شـوند افزایش یافته است. در سال ۲۰۰۴ ، ۶۳ گونه ویبریو از محیط زیست گزارش شده است (Thompson, et al 2004) که ده گونه آن ها در ارتباط با عفونت های پوستی و ناراحتی دستگاه گوارش انسـان بودنـد (Andrews, 2004, – Pérez Rosas and Hazen 1998, Venkateswaran et al 1998). در پژوهش صورت گرفتـه ۸ بـاکتری مـورد شناسـایی قرار گرفتند که دارای ویژگی های ذیل بوده و دارای قرابت ژنتیکی نزدیکی با هم می باشند.

باکتری ویبریو نیگریپولکریتودو [۷۲] به عنوان یک پاتوژن نوپدید و عامل سـندروم تابسـتان در میگـوی لیتوپنئـوس استیلیروستریس معرفی شده است (Goarant, C ., et al., 2006) و پژوهش هایی بر روی پایش و دینامیـک حضـور انواع سویه های آن در استخرهای پرورشی و حضور پلاسمید عامل بیماری انجام شده اسـت (Roux, F.L., et al., 2011& Walling, E., et al., 2010). طی پژوهش انجام شده در این پروژه، این باکتری از میگـوی سـفید غربـی نیـز جداسازی شد، لذا با توجه به وجود سویه های بیماریزای ایـن بـاکتری توجـه بـه حضـور آن در مراکـز پـرورش میگوی سفید غربی ضروری می نماید.

[72] *Vibrio nigripulchritudo*

در طی این پژوهش دو سویه از باکتری ویبریو برازیلنسیس[۷۳] از میگو و آب جداسازی شدند که نشانگر فراوانی بالای آن ها در آب می باشد. سویه LMG20549 این باکتری اولین بار از لارو نرم تنان دوکفه ای پرورشی در برزیل جداسازی شد و در طی آزمایشات تجربی برخی از سویه های آن، سبب مرگ و میر در ماهی های قزل آلا و آرتمیا شدند (Buller, N.B. 2014). همچنین از همولنف میگوی سفید غربی نیز جداسازی شده است (Albuquerque-Costa, R., et al., 2013). بر اساس آنالیز فیلوژنی توالی ژن 16S rRNA این باکتری قرابت ژنتیکی نزدیکی با ویبریو توبیاشی (۹۸/۸–۹۸ درصد)، ویبریو نرئیس (۹۸/۸–۹۷/۶ درصد) دارد(Buller, N.B. 2014).

یکی دیگر از باکتری های جداسازی شده از میگوی سفید غربی ویبریو رتیفریانوس[۷۴] می باشد که اولین بار در سال ۲۰۰۳، از روتیفر جداسازی شده و بر اساس آنالیز فیلوژنی توالی ژن 16S rRNA با باکتری های ویبریو هاروی، ویبریو کمپلی، ویبریو آللژینولیتیکوس و ویبریو پاراموليتيكوس قرابت ژنتیکی دارد(Gomez-Gil., B., et al., 2003). این باکتری از ماهیان نیز جداسازی شده است و از نظر ژنتیکی جزو گروه[۷۵] هاروی می باشد (Buller, N.B. 2014).

ویبریو آزرئوس[۷۶] اولین بار در سال ۲۰۰۹ از دریای ژاپن جداسازی شد. این باکتری جزو گروه هاروی می باشد (Yoshizawa., S.,et al., 2009) و گزارشی مبنی بر بیماریزایی و یا جداسازی آن از آبزیان یافت نشد. در این پژوهش نیز برای اولین بار از آب جداسازی شد و در آنالیز فیلوژنیک و جستجو در بانک اطلاعاتی ایزدتاکسون نیز قرابت نزدیکی با ویبریو ساگامینسیس[۷۷] دارد. همچنین تولید اسید از مانیتول و سوکروز توسط باکتری ویبریو آزرئوس جداسازی شده در این پروژه مثبت بود و کلونی آن در TCBS زرد رنگ بود، در حالیکه ویبریو آزرئوس گزارش شده توسط یوشیزاوا و همکاران از مانیتول و سوکروز اسید تولید نمی کرد و کلونی آن در TCBS سبز رنگ گزارش شده است (Yoshizawa., S., et al., 2009) که تاحدی نشانگر تفاوت این سویه با سویه گزارش شده قبلی می باشد. البته جستجوی توالی 16S rRNA این باکتری در بانک اطلاعاتی NCBI قرابت ژنتیکی این باکتری با ویبریو آلژینولیتیکوس سویه NBRC 15630 را نشان داد.

یکی از بیماریزاترین ویبریوهایی که در دوز پایین (۱۰۰ باکتری در هر میلی لیتر) قادر به کشتن لارو سخت پوستان می باشد، ویبریو اونسی[۷۸] است که اولین بار در سال ۲۰۱۰، دو سویه باکتری ویبریو اونسی از پانولیروس ارناتوس[۷۹] و پنئوس مونودون بیمار در استرالیا جداسازی شد و بر اساس آنالیز هیبریداسیون DNA-DNA هر دو

---

[73] *Vibrio brasiliensis*

[74] *Vibrio rotiferianus*

[75] Clade

[76] *Vibrio azureus*

[77] *Vibrio sagamiensis*

[78] *Vibrio owensii*

[79] *Panulirus ornatus*

سویه قرابت ژنتیکی زیادی با باکتری های ویبریو هاروی، ویبریو کمپلی و ویبریو روتیفریانوس داشت (Cano-Go´mez, A., et al., 2010). همچنین در طی پژوهشی از آب محل پرورش میگوها نیز جداسازی شد. طبق یافته های پژوهشی باکتریوفاژ موجود در این باکتری، پس از انتقال به باکتری های گروه هاروی مانند ویبریو هاروی و ویبریو کمپلی سبب بیماریزا شدن آنها می شود و با افزایش میزان تولید همولیزین و کیتیناز توسط این باکتری ها سبب مرگ و میر ناپلی پنئوس مونودون می شود (Busico-Salcedo, N., et al., 2013) ، لذا حضور این باکتری با فراوانی بالا در آب زیستگاه میگو قابل تامل می باشد.

یکی از باکتری های جداسازی شده از آب محل پرورش میگوی سفید غربی، ویبریو آلجینولیتیکوس[80] بود که در پژوهش های پیشین از آب محل پرورش و میگوهای سفید هندی طبق روش های روتین میکروب شناسی جداسازی و شناسایی شده بود (افشار نسب۱۳۹۳، میربخش، م.۱۳۸۹، دشتیان، ع. ۱۳۸۹) و در برخی از پژوهش های انجام شده به عنوان پروبیوتیک معرفی شده است(Direkbusaram, S, 1998).

آگاریورنس گیلویوس[81] یکی از انواع باکتری های جداسازی شده از آب محل پرورش میگوی سفید غربی می باشد که دارای خاصیت آگارازی است. جنس آگاریورنس اولین بار در سال ۲۰۰۴ به عنوان باکتری گرم منفی، هوازی اجباری و هیدرولیز کننده آگارز معرفی شد که آبزیان ناحیه کانتو ژاپن جداسازی شده بود (Kurahashi, M., 2004) و تا سال ۲۰۱۰ فقط شامل گونه آگاریورنس آلبوس[82] بود تا این که در سال ۲۰۱۱ گونه آگاریورنس گیلویوس از علف های دریایی چین جداسازی و شناسایی شد (Du., Z.J., et al., 2011). و در این پژوهش نیز قرابت زنتیکی با سایر گونه های ویبریو نداشت.

بر اساس یافته های این پژوهش و اولین گزارش گونه های باکتریایی که در سطح دنیا نیز اخیراً گزارشاتی از آن ها ارائه شده است و همچنین بیماریزا بودن برخی از گونه ها برای میگو و سایر سخت پوستان و با توجه به این که باکتری های قابل کشت تنها یک درصد کل باکتری های طبیعت را تشکیل می دهد (Amann, R., 2000)، استفاده از تکنیک های مولکولی سریع در تشخیص بیماریهای باکتریایی و تغییر روند آزمایشات میکروبی از تکنیک های سنتی و وابسته به کشت به روش های مبتنی بر ژنتیک مولکولی و متاژنومیکس ضروری می نماید، همچنین با ثبت اطلاعات ژنتیکی میکروارگانیسم ها در بانک جهانی ژن (NCBI) نه تنها حفاظت از مالکیت معنوی آنها صورت می گیرد بلکه در صورت بروز بیماری با مطالعه توالی ژنتیکی و مقایسه آن ها با بانک اطلاعات ژنتیکی سویه های بومی می توان در رابطه با منشا سویه ها از نظر اگزوژن و یا اندوژن بودن و نوپدیدی و یا بازپدیدی آن ها اظهارنظر نمود البته با توجه این که بانک های اطلاعاتی مانند NCBI و EZ-taxon مدام در

---

[80] *Vibrio alginolyticus*

[81] *Agarivorans gilvus*

[82] *Agarivorans albus*

حال بروز رسانی هستند امکان پیگیری وضعیت و قرابت ژنتیکی سویه های ثبت شده در سالهای آینده نیز وجود دارد و همچنین نگهداری طولانی مدت میکروارگانیسمهای قابل کشت جداسازی شده به روشهای لئوفلیزاسیون و یا کرایوپرزرویشن امکان پژوهش های آینده را میسر می‌سازد.

پیشنهادها

- راه اندازی و استفاده از تکنیک های مولکولی سریع در تشخیص بیماری های میکروبی
- بررسی پاتوژنزیسیته باکتری های شناسایی شده در این پروژه
- تهیه و تدوین بانک اطلاعات میکروبی، میکروارگانیسم های آبزیان

تشکر و قدردانی

از کلیه همکارانم در بخش های پژوهشی و پشتیبانی که در اجرای این پروژه همراهی نمودند، صمیمانه سپاسگزارم.

منابع

- استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷، سال ۱۳۸۶، آیین کار آزمون های میکروبیولوژی آب، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- استاندارد ملی ایران ۷۲۲۳، سال ۱۳۸۲، آب - جستجو و شناسایی ویبریوکلرا –روش آزمون میکروبیولوژی، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹ : سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-راهنمای الزامات کلی برای آزمون ، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- 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.
- استاندارد ملی ایران ۳-۸۹۲۳ : سال ۱۳۸۵، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی-قسمت سوم :مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی وفرآورده های آن، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- افشارنسب، م.، کاکولکی، ش.، مهرابی، م.ر.، سید مرتضایی، س.ر.، دشتیان نسب، ع.، قره وی، ب.، عابدیان، آ.، ۱۳۹۳، پاتوژن های باکتریایی غالب در مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور، پاتولوژی مقایسه ای، سال۱۱، شماره ۲، صفحه ۱۲۳۸-۱۲۲۷.
- آوخ کیسمی،م. ۱۳۷۷ .بررسی آلودگی ویبریوزیس در مزارع پرورش میگوی منطقه حله بوشهر. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور.
- باصری، س. ۱۳۹۳، مطالعه اثر عصاره های گیاهان بومی منطقه بوشهر بر روی ویبریوهای جداسازی شده از حوضچه های پرورش میگو، تعیین پروفایل آنزیمی جدایه ها، پایان نامه ی کارشناسی ارشد، رشته میکروبیولوژی.
- 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.
- رحیمی ابراهیم، تاجبخش الهه، فدایی فرد فیروزه، ایزدی بهنام، علیمرادی محمد، گودرزی محمدعلی، ۱۳۹۰، شیوع گونه های ویبریو در میگوهای دریایی (*Paeneus monodon*) صید شده از سواحل جنوبی ایران ، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره۸، شماره۲.
- محمدی باغملایی، میربخش مریم، قائدنیا بابک، ۱۳۹۳، کروم سنسینگ روشی نوین در کنترل بیماریهای آبزیان، آبزیان زینتی، سال اول، شماره ۲.

- 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.

- Abd, H., Valeru, S.P., Sami, S.M., Saeed, A., Sandström, G., Raychaudhuri, G.,(2010). Interaction between *Vibrio mimicus* and Acanthamoeba castellanii.Environmental Microbiology Reports; 2(1): 166–171
- Alavandi, S.V., Manoranjita, V., Vijayan, K.K., Kalaimani, N., Santiago T.C., (2006).Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae; Applied Microbiology : 0266-8254.
- Albuquerque-Costa ,R., Lima-Araújo, R., Fernandes-Vieira, R.H.S., (2013). Phenotyping of vibrios isolated from marine shrimp hemolymph., Ciencias Marinas, 39(3): 317–321.
- Alipour, M., Issazadeh, Kh., Soleimani, J.(2012). Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. Comp Clin Pathol ;23:129.
- Amann, R. (2000). Who is out there? Microbial aspects of diversity. Syst. Appl. Microbiol. 23: 1-8.
- Andrews, L.S. (2004). Strategies to control Vibrios in Molluscan Shellfish. Food Protection Trends 24:70-76.
- Atami H, Muraosa Y, Hatai K (2009) Halioticida infection found in wild mantis shrimp
- Austin, B., Zhang, X-H.(2006). Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine Vertebrates and invertebrates .Applied Microbiology; 43:119–124.
- Bi, K., Shi, L., Miyosh, Sh., Tomochika, K., Shinoda, S.(2000). Analysis of Vibrio mimicus Clinical Strains by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. Microbiol Immunol; 44(2): 149-153
- Buller, N.B, (2014). Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals, 2nd Edition: A Practical Identification Manual., Publisher, CABI, ISBN: 1845938054, 9781845938055, Length, 919 pages.
- Busico-Salcedo, N., Owens, L., (2013). Virulence Changes to Harveyi Clade Bacteria Infected with Bacteriophage from *Vibrio owensii*., Indian J Virol. Vol. 24(2): 180–187.
- Cano-Go´mez, A., Goulden, E.F., Owens, L., Høj, L., (2010). *Vibrio owensii* sp.nov., isolated fromcultured crustaceans in Australia., FEMS Microbiol Lett, Vol. 302, pp:175–181.
- Chikwendu, C.I., Ibe, S.N., Okpokwasili, S.N.,Okpokwasili, G.C.(2014). Multiple Antimicrobial Resistance in *Vibrio* spp Isolated from River and Aquaculture Water Sources in Imo State, Nigeria. British. Microbiology Research Journal; 4(5): 560-569.
- Chowdhur, M.A., Aziz, K.M., Kay, B.A., Rahim, Z.(1987). Toxin production by Vibrio mimicus strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. J Clin Microbio; 25:2200–2203
- Chun J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., Lim, Y.W., (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 57: 2259-2261.
- Colwell, R.R., Huq, A. (1994). Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. Disease in Evolution: Global Changes and Emergence of Infectious Diseases, eds Wilson, M.E., Levins, R., Spielman, A., (Ann. New York Acad. Sci, New York); Vol 740: pp 44–54.
- Direkbusaram, S, Yoshimizu, M, Ezura, Y, Ruangpan, L, Danayadol, Y., (1998). *Vibrio* spp., the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. Short Communication Journal of Marine Biotechnology 6:266-267.
- Du, Z.J., Lv, G.Q., Rooney, A.P., Miao T.T., Xu, Q.Qi., and Chen, G.J., (2011). *Agarivorans gilvus* sp. nov. isolated from seaweed, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 493–496
- Duc, P.M., Hatai, K., Kurata, O., Tensha, K., Yoshitaka, U., Yaguchi, T., Udagawa, S.I., (2009) Fungal infection of mantis shrimp (Oratosquilla oratoria) caused by two anamorphic fungi found in Japan. Mycopathologia 167:229–247
- Farmer, J.J, Hickman-Brenner, F.W.(1992). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Balows, A., Truper, H.G., Schleifer, K.H. (Eds.), The Prokaryotes; vol. 2: pp. 2952–3011.
- Felix, F., Nugroho, T., Silalahi, S., Octavia, Y.,(2011). Molecular characteristics of *Vibrio* sp causing Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) disease in Sumatra and Java shrimp ponds by 16S rDNA sequencing. Journal of Agricultural Technology. 7(3):679-94.
- Frans, I., Dierckens, K., Crauwels, S., Assche, A.V., Leisner, J.(2013). Does Virulence Assessment of Vibrio anguillarum Using Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Larvae Correspond with Genotypic and Phenotypic Characterization.PLOS ONE; Volume 8 ;Issue 8 , e70477.

- Frédérique, L., Roux, Y. L., Brigid, M., Davis, N.I., Sophie, M., Cyrille, G., Didier, M., Matthew, K., (2011). Virulence of an emerging pathogenic lineage of Vibrio nigripulchritudo is dependent on two plasmids., Environmental Microbiology, Volume 13, Issue 2, pages 296–306.
- Ganesh, E.A., Das, S., Chandrasekar, K., Arun, G., Balamurugan, S.,(2010). Monitoring of Total Heterotrophic Bacteria and Vibrio Spp.in an Aquaculture Pond. Current Research Journal of Biological Sciences; 2(1): 48-52.
- George, M.R., John, K.R., Iyappan, T., Jeyaseelan, M.J.P.,(2005).Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting. Letters in Applied Microbiology ; 40: 369–372.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S. (2006). Summer Syndrome" in Litopenaeus stylirostris in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*., Aquaculture, 253, 105-113 .
- Goarant, C., Reynaud, Y. , Ansquer, D., Decker, S. , Saulnier, D., Roux, F., (2006). Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (Litopenaeus stylirostris) in New Caledonia, Systematic and Applied Microbiology, Volume 29, Issue 7, 1 November, Pages 570–580.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Swings, J., (2003). Vibrio rotiferianus sp. nov., isolated from cultures of the rotifer Brachionus plicatilis, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 239–243.
- Gopal, S.H., Otta, S., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., Karunasagar, I.D.(2004). The occurrence of Vibrio species in tropical shrimp culture harvested at venicelagoon (Italy) and Guanabara bay (Brazil). Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo; 50(4):199-202.
- Guzman, A., Gabriel, A., Ascencio Valle, F., (2000), Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential, Resent Res. Devl. Microbiology, 4: 333-348
- Hillis, M., Hillis, M., (1996). Molecular Systematics 2nd edition. Sinauer. Pages: 169-176; 205-212; 249-266; (321-381); 410-415. UWC Library Cat No: 574.88028MOL Level 14
- Horowitz, A., Horowitz, S. (2001). Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective (C. L. a. J. Browdy, D.E. Ed.). Baton Rouge, Louisiana, USA,: The World Aquaculture Society.
- Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). J. World Aquac. Soc, 37, 523-532 .
- Johnson, S. K. (1990). Handbook of shrimp diseases. Galveston. Texas: Texas A&M University Sea Grant College Program.
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chen, I.T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C.F., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., (2014). Variation in Vibrio parahaemolyticus isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), Aquaculture, Volumes 428–429, Pages 297–302
- Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, William Anton Walters, Antonio González, J. Gregory Caporaso, and Rob Knight., (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities, Curr Protoc Bioinformatics. CHAPTER: Unit10.7 .
- Karthikeyan, V., Selvakumar, P., Gopalakrishnan, A., (2015). A novel report of fungal pathogen *Aspergillus awamori* causing black gill infection on Litopenaeus vannamei (pacific white shrimp), Aquaculture , Vol.444, pp: 36–40
- Kashyap, S.K., Maherchandani, S., Kumar, N.,(2014). Ribotyping: A Tool for Molecular Taxonomy, Animal Biotechnology. Copyright © 2014 Elsevier Inc., chapter 18
- Khoa, L., Hatai, K., Aoki, T. (2004) Fusarium incarnatum isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. J Fish Dis 27:507–515
- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhrouf, A. (2013). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (Dicentrarchus labrax) during disease outbreaks, International Aquatic Research, Vol. 5, No.13
- Kim, M.S., Jeong, H.D. (2001). Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments. Aquaculture 193: 199–211
- Kimes, N., Grim, Ch., Hasan, N., Tall, B., Kothary, M., (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen Vibrio coralliilyticus.ISME Journal ; 6: 835–846.
- Kimes, N., Grim, Ch., Hasan, N., Tall, B., Kothary, M., (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen Vibrio coralliilyticus.ISME Journal ; 6: 835–846.

- Kong, R.Y.C., Pelling, A., So, C.L., Wu, R.S.S., (1999). Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA intergenic spacers for genus- and species-specific detection of Aeromonas. Mar Pollut Bull 38:802–808
- Kurahashi, M., Yokota, A. (2004). Agarivorans albus gen. nov., sp. nov., a c-proteobacterium isolated from marine animals. Int J Syst Evol Microbiol 54, 693–697.
- Lafisca, A., Pereira, CH., Iaccone, V., Rodrigues, D.(2008). Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at venice Lagoon (Italy) and Guanabara bay (Brazil). Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo; 50(4):199-202.
- Lightner, D. V. (1993). Diseases of penaeid shrimp. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lightner, D. V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society: Louisiana, USA.
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1986). A probable Mycobacterium sp. infection of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). J. Fish Diseases, 9, 357-369 .
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Poulos, B. T., Mari, J. L., Bonami, J. R., & Shariff, M. (1994). Distinction of HPV-type virus in *Penaeus chinensis* and Macrobrachium rosenbergii using a DNA probe. Asian Fish. Sci., 7, 267-272 .
- Lightner, D.V., Redman, R.M., (2012). Development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks and their application to sustainable shrimp farming, Woodhead Publishing Limited, 2012.
- Liu, C.H., Cheng W., Hsu J.P., Chen J.C., (2004). *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp Litopenaeus vannamei confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing, DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS, Vol. 61: 169–174
- López-Torres, M.A. (2001). La importancia de conteos bacterianos en Acuicultura. Panorama Acuícola 6:34-35.
- Loy, J.K., Frelier, P.F., Varner, P. J., Templeton, W., (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing Hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms, 25, 117-122 .
- Mahbub, Kh.R., Ahmed, M.M., Paul, K.P.(2011). Prevalence of *Vibrio* Spp and Antibiogram of Isolates from Shrimp Rearing Ponds in Bangladesh. Journal of Advanced Scientific Research; 2(4): 74-80.
- Messelhäusser, U., Colditz, J., Thärigen, D., Kleih, W., Höller, C., Busch, U.(2010). Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. International Journal of Food Microbiology; 142: 360–364.
- Mirbakhsh, M., Razavi, M.R., sepahy, A., Khanafari, A., Afsharnasab, M. (2014). Molecular Identification of *Vibrio harveyi* From Larval Stage of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea:Decapoda)By Polymerase Chain Reaction and 16SrDNA Sequencing. Iranian Journal of Fisheries Sciences; 13(2): 384-393
- Nunan, L.M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., Gasparich, G.E. (2005). Spiroplasma penaei sp nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 55, 2317-2322 .
- Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I.(1999). Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. J Aqua Trop; 14(4): 309-318.
- Pérez-Rosas, N., Hazen, T.C. (1998). In Situ Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in Tropical Coral Reefs. Applied and Environmental Microbiology 54:1-9.
- Pfeffer, C.S., Hite, M.F., Oliver, J.D.,(2003). Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina; Appl. Environ. Microbiol:69:3526–3531.
- Reynaud, Y., Pitchford, S., Decker, S., Wikfors, G., Brown, Ch.(2013). Molecular Typing of Environmental and Clinical Strains of *Vibrio vulnificus* Isolated in the Northeastern USA, .Plos One; Volume 8:, Issue 12, e83357
- Ring-bound., (1998). Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, Aoac Intl; 8 Lslf edition, published by United States. Food and Drug Administration ISBN-13: 978-0935584592
- Rossello-Mora, R., Amann, R., (2001). The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol Rev; 25: 39-67.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology., 44, 846–849
- Stephen, F.P., (1998), Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Molecular Biotechnology. Volum9, No1
- Su, Y., Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol; 24:549–558

- Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., Musti, M., (2004). Updated perspectives on emerging Vibrios associated with human infections. Lett. Appl. Microbiol; 39: 117-126
- Thompson, F.L., Tetsuya, I., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68:403–431.
- Tille, P., (2012). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Edition: 12th, Elsevier, Mosby, ISBN: 9780323030656, Page Count: 1056, Imprint: Mosby
- Toms C.J., Roswin J., Anbu Rajan, L., Surendran, P.K., Lalitha, K.V., (2015). Occurrence of viral pathogens in Penaeus monodon post-larvae from aquaculture hatcheries, Data in Brief, Volume 4, Pages 170–176
- Vandenberghe, J., Thompson, F.L., Gomez-Gill, B., Swings, J. ,(2003). Phenotypic diversity amongst Vibrio isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture 219:9-20.
- Vaseeharan, B., Raffiq, H. M. and Chen, J.C. (2008). RpoN gene, RAPD profile, antimicrobial resistance and plasmids of *Vibrio anguillarum* isolates from vibriosis vertebrates and invertebrates Litopenaeus vannamei: mortality and viral replication.Applied Microbiology; 43 : 119–124.
- Venkateswaran, K., Dohmoto, N., Harayama, S. (1998). Cloning and Nucleotide Sequence of the gyrB Gene of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Application in Detection of This Pathogen in Shrimp. Applied and Environmental Microbiology 64:681-687.
- Vincent, A.G., Breland, V.M., Lotz, J.M., (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. Dis. Aquat. Org, 61, 227 - 233 .
- Vincent, A.G., Lotz, J.M., (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected Litopenaeus vannamei and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. Dis. Aquat. Org, 67, 163-169 .
- Walling, Vourey, E., Ansquer, E.D., Beliaeff, B., Goarant, C., (2010). Vibrio nigripulchritudo monitoring and straindynamics in shrimp pond sediments, , Journal of Applied Microbiology, Volume 108 Issue 6, Pages 2003 - 2011.

Abstract:

At present, the aquaculture industry to provide proper instructions in the field of health management, including production of Specific Pathogen Free shrimp (SPF), require sensitive and reliable methods for the detection and identification of pathogenic microorganisms. Molecular methods which used in the detection of microorganisms have a high discriminatory power in the taxonomy and in relation to libraries in the world. On the other hand, the accurate identification of microorganisms, providing the genetic data bank of shrimp pathogens and maintenance of these strains is the step to promote further research on the mechanisms of pathogenesis of pathogens, diagnosis, treatment, prevention of disease, identify indigenous production kits, diagnosis re emerging and emerging diseases and their origin. Therefore, in this project, by using ribotyping technique, native isolated pathogenic bacteria and fungi were identified and recorded in the gene bank database center. During sampling of shrimp and water of Specific Pathogen Free shrimp center, 40 bacterial strains were isolated, which 8 of them had the most frequency and identification based on 16S rDNA sequencing was performed. Bacteria identified are:
Vibrio nigripulchritudo strain IS013(GenBank:KP843725), *Vibrio brasiliensis* strain IS014 (GenBank:KR186076), *Vibrio rotiferianus* strain IS015 (GenBank:KR186077), *Vibrio azureus* strain IS012 (GenBank:KJ018724.1), *Vibrio owensii* strain IS016 (GenBank:KR186078), *Agarivorans gilvus* strain IS017 (GenBank:KR186079), *Vibrio brasiliensis* IS018 (GenBank:KR186080) and *Vibrio alginolyticus* strain IS019 (GenBank:1817854), which were recorded in The World Bank genes. In this study fungal isolates were not detected.

Keywords : Bacteria, fungi, Ribotyping, 16S rDNA, shrimp, Specific Pathogen Free

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

---

Project Title : Molecular identification of bacterial and fungal pathogens in certain disease-free shrimp
Approved Number: 14-80-12-9106-91001-9101k
Author: Maryam Mirbakhsh
Project Researcher : Maryam Mirbakhsh
Collaborator(s)*:* S.J. Zorriehzahra, V. Yeganeh, B. Ghaednia, A. Dashtiannasab, E. Mohammadibaghmollai, M.R. Mehrabi, M.A. Nazari, N. Samani, L. Parsa yeganeh, M. Afsharnasab, I. Keshtkar
Advisor(s): R. Azarbayjani
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 : 2017

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 :

Molecular identification of bacterial and fungal pathogens in certain disease-free shrimp

Project Researcher :

Maryam Mirbakhsh

Register NO.

50711