



## تعیین فراوانی و تنوع باکتری‌های جنس ویبریو در استخرهای پرورش میگو و کانال آب رسان در طول دوره پرورش (در مجتمع گواتر- چابهار)

آرش شکوری<sup>۱\*</sup>، قاسم رحیمی قره میرشاملو<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور- چابهار

### نوع مقاله:

پژوهشی

### چکیده

باکتری‌های ویبریو به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای خطرناک در پرورش میگو می‌باشند. در این تحقیق بررسی تنوع و فراوانی ویبریوهای بیماری‌زا از رسوب و آب، کانال آبرسان و دو استخر پرورشی در مجتمع پرورشی شهید صنعتی گواتر- چابهار، به صورت ۵ بار نمونه‌گیری به فاصله زمانی هر ۲۰ روز انجام شد. نمونه برداری رسوب در نزدیکی خروجی حاوی لجن انجام و نمونه‌های آب در بطری‌های استریل از عمق استخر برداشته شد. جهت شمارش و شناسایی باکتریها از محیط‌کشت TCBS و کشت‌های تفریقی باکتری شناسی شامل: واکنش اکسیداز، تخمیر قندها، تست احیاء نیترات، اسیدهای آمینه، رنگ‌آمیزی و... استفاده شد. نتایج به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS و از طریق آزمون آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که آب ورودی کانال از نظر انواع ویبریوها در طول دوره مشابه بودند. اما در دو استخر پرورش میگو در مقایسه با آب کانال و با هم از نظر تعداد کل ویبریوها و نیز انواع ویبریوها با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند. بیشترین گونه‌های شناخته شده به ترتیب فراوانی عبارتند از: *Vibrio gazogenes*, *Vibrio nereis*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio alginolyticus*. داده‌ها نشان داد باکتری *V. alginolyticus* که برای لارو میگو بیماری‌زاست، گونه غالب بوده و بیشترین فراوانی را دارد.

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۱۱/۲۰

اصلاح: ۹۵/۰۲/۲۹

پذیرش: ۹۵/۱۰/۰۹

کلمات کلیدی:

میگو

باکتری ویبریو

محیط‌کشت TCBS

### مقدمه

در حال حاضر یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده صنعت پرورش میگو در جهان عوامل بیماری‌زا شامل برخی ویروس‌ها و باکتری‌ها می‌باشند. گونه‌های مختلف باکتری جنس ویبریو به عنوان بخشی از میکروفلور طبیعی آب و میگو شناخته شده‌اند که به هر دلیل ممکن از جمله استرس و ضعف میگوها باعث بیماری ویبریوزیس می‌شوند (Fulks and Main, 1992). در بین بیماری‌های باکتریایی میگو، اگرچه بیماری‌های ناشی از باکتری‌های جنس ویبریو مهمترین نقش را در ایجاد تلفات و مرگ و میر در مزارع پرورش میگو دارند ولی در مواردی تاثیر ممانعت‌کنندگی برخی گونه‌های ویبریو بر گونه‌های دیگر این جنس نیز گزارش شده است. به عنوان مثال گونه *Vibrio alginolyticus* به عنوان عاملی بیماری‌زا در میگو شناخته می‌شود (Lavilla-Pitogo et al., 1998). ولی نقش آن به عنوان پروبیوتیک برای میگو نیز گزارش شده است (Vandenbergh et al., 2003). از آنجایی که برای پرورش هر موجودی خصوصاً آبریان رعایت اصول ایمنی و بهداشتی و

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Aarash220@yahoo.com

پیشگیری بهتر و ارزانتر از درمان می‌باشد، بنابراین ترسیم فلور طبیعی می‌تواند در شناخت عفونت‌های ناشی از این ارگانیس‌ها، سهم عمده‌ای داشته باشد. همچنین شناخت فلور باکتریال طبیعی می‌تواند در کاربرد آن‌ها به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک سودمند باشد (Majidinasab, 1994).

یکی از چالش‌های اصلی تولید آبزیان در آبی پروری موضوع بهداشت و بیماری‌های آبزیان بوده به طوری که سالیانه میلیون‌ها دلار بر اثر بیماری آبزیان، به پرورش دهندگان ماهی و میگو خسارات وارد شده و یکی از موضوعات مهم در توسعه آبی پروری محسوب می‌شود. جهت بررسی بیماری‌های میگو، شناخت ارتباط بین میگو، محیط و عوامل بیماری‌زا بسیار مهم است و پایه و اساس مدیریت صحیح در تکثیر و پرورش می‌باشد (Majidinasab, 1998).

باکتری‌های جنس ویبریو فلور غالب محیط‌های دریایی (آب شور) می‌باشد و خصوصیات آن‌ها این است که وابسته به حیوانات دریایی هستند به طوری که هم به صورت همزیست، هم به صورت میکروفلور نرمال و یا به صورت پاتوژن زندگی می‌کنند (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010). ویبریوزیس رایجترین بیماری باکتریایی عامل تلفات در مزارع پرورش میگو بعد از ویروسها به شمار می‌رود (Carson *et al.*, 2009; Tyagi *et al.*, 2007).

عموماً توافق بر این است که این باکتریها، بیماری‌زای فرصت طلب بوده و در شرایط استرس ایجاد بیماری می‌کنند. حضور باکتری‌های بیماری‌زا نه تنها برای میگوها بلکه برای مصرف کننده آنها نیز ایجاد خطر می‌نماید (Tyagi *et al.*, 2007). بعضی از ویبریوها برای انسان بیماری‌زا می‌باشند و سبب بیماری و یا مسمومیت غذایی مخصوصاً در اثر مصرف غذاهای خام می‌شوند، اما تعداد گونه‌های بیماری‌زای ویبریو نسبت به کل انواع ویبریو اندک است (Chen *et al.*, 2000).

بنابراین شناسایی فلور باکتریایی میگو از این نظر اهمیت دارد که می‌توان برخی باکتری‌های فرصت طلب ایجاد کننده بیماری‌های باکتریایی را شناسایی نمود (Keysami *et al.*, 2005).

اندازه این باکتری ویبریو ۲/۶-۱/۴ تا ۵-۱/۸ میلی‌متر می‌باشد. معمولاً در محیط‌های آبی بالاخص در میان سخت پوستان و در سطح پوست و اندامهای داخلی سخت پوستان به ظاهر سالم، همچنین در رسوبات و در ستون آب در محیط‌هایی که آلودگی یا شوری بالا داشته باشد، بالاترین میزان شیوع را پیدا می‌کند (Lightner, 1996).

حضور ویبریوها و بیماری‌زایی آنها به وسیله ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی محیط آبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. گونه‌های، *Vibrio damsela*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*، جنس ویبریو هستند که تحت شرایط مساعد (شرایط استرس‌زا در میگو) می‌توانند میگوهای خانواده پنائیده را تحت تأثیر قرار دهند (Sung *et al.*, 2001).

Yongcan و همکاران (۲۰۰۳) نشان داده‌اند که فلورباکتریایی میگو و سایر آبزیان تحت تأثیر شرایط محیطی آن‌ها است. بنابراین لازم است که اطلاعاتی راجع به تعداد و گونه باکتری‌های موجود در محیط میگو داشته باشیم تا در تفسیر شرایط غیر طبیعی و بیماری به ما کمک کند.

در ایران مطالعاتی روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های جنس ویبریو از میگوهای پرورشی و دریایی در کشور انجام شده است و گونه‌های، *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* را به صورت غالب در میگوهای دریایی گزارش کرده‌اند (Majidinasab, 1998).

صنعت تکثیر و پرورش میگو در استان محروم سیستان و بلوچستان با ایجاد شغل‌های موقت و دائم به عنوان یکی از با اهمیت ترین صنایع اشتغال‌زا مطرح است. پرورش میگو در مجتمع گواتر با تولید ۶۸/۶ تن در سال ۱۳۷۸ شروع شد و حداکثر تولید این مجتمع در سال ۱۳۸۵، به ۲۵۰۰ تن رسید ولی بعد از آن به دلیل وقوع طوفان گونو و بروز بیماری لکه سفید میگو فعالیت و تولید در این سایت دچار چالش شد. پایداری تولید در این مجتمع در گرو مطالعه وضعیت اکولوژیکی و پیشگیری از هر گونه عوامل خطر ساز عفونی و غیر عفونی می‌باشد (Azhdhakosh pours *et al.*, 2013).

تفاوت در باکتری‌های شناسایی شده در مناطق مختلف پرورش میگوی کشور می‌تواند به عوامل متعددی از جمله تغییرات شوری، pH، درجه حرارت و میزان اکسیژن آب (شکل ۵، ۶، ۷، ۸) و مدیریت مزارع مرتبط باشد که کنترل این عوامل در پیشگیری از بروز بیماری‌های ناشی از این باکتریها موثر خواهد بود (Afsharnsb *et al.*, 2014).

اما هدف اساسی این تحقیق شناسایی گونه‌های مختلف باکتری جنس ویبریو، سنجش میزان فراوانی انواع آن و تغییرات آن‌ها در مزارع پرورش میگوی گواتر با مدیریت واحد در طول یک دوره پرورشی بود.

## مواد و روش‌ها

این بررسی در سال ۱۳۹۲ در طول یک دوره پرورش میگو انجام گرفت و در این تحقیق از کانال آبرسان و دو استخر از دو مزرعه پرورش میگو واقع در مجتمع پرورش میگوی گواتر- چابهار نمونه برداری به عمل آمد. در طول پرورش، از آب و رسوب کانال آبرسان و استخرهای دو مزرعه پرورش میگو، ۵ مرتبه نمونه‌گیری انجام شد. اولین نمونه برداری، دو روز قبل از ذخیره‌سازی پست لاروها انجام گردید. در طول دوره پرورش، هر ۲۰ روز یک بار یک نمونه آب و یک نمونه رسوب از هر سه ایستگاه انجام شد (۶ نمونه در هر مرتبه، در مجموع ۳۰ نمونه). نمونه برداری برای رسوب (لجن) از کناره‌های دیواره استخر نزدیک خروجی که لجن داشت انجام گرفت و نمونه‌های آب در بطریهای استریل شده و ظروف استریل از عمق استخر (سه نقطه) برداشته شد و نمونه‌ها در یونولیت در درجه حرارت زیر ۵ درجه سانتیگراد (همراه یخ) در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل و از محیط کشت TCBS (محیط اختصاصی ویبریو) جهت رشد ویبریوها استفاده شد.

با استفاده از سمپلر  $1000 \mu - 100 \mu$ ، یک میلی لیتر از آب هریک از بطری‌ها برداشته و به پلیت‌های محیط کشت TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar Merck, Germany) اضافه شد و با سوآپ به صورت خطی کشت انجام شد. سپس پلیت‌ها در ۳۵ درجه سانتیگراد که دمای رشد بهینه باکتریهای ویبریو می‌باشد، به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه گردید. در شرایط استریل، ۲۵ گرم از نمونه رسوب به ۲۲۵ میلی لیتر محیط آب پیتونه قلیایی (APW, Merck Darmestat, Germany) محتوی ۱٪ نمک با  $pH = 8/6$  منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶ تا ۸ ساعت انکوبه شد. سپس یک میلی لیتر از نمونه به محیط کشت انتخابی (TCBS) برای جداسازی کلنی‌های ویبریو برده شد. نمونه‌ها پس از کشت خطی در این محیط به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرم‌خانه گذاری شدند.

رشد کلنی‌های مختلف بر روی پلیت‌هایی که متعلق به گونه‌های مختلف جنس ویبریو می‌باشند را می‌توان با انجام مکرر کشت خطی، انواع مختلف کلنی‌ها که از نظر مورفولوژی شکل، رنگ و اندازه با یکدیگر متفاوت هستند را از یکدیگر تفکیک و خالص نمود به طوری که در هر پلیت TCBS-Agar تنها یک نوع کلنی باشد.

نهایتاً باکتریهای ویبریو جهت شناسایی مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس نسبت به خالص سازی کلنی‌ها اقدام و آزمایشات تشخیصی تفریقی بر روی آن‌ها جهت شناسایی گونه‌های باکتری ویبریو انجام شد. در نهایت بر اساس جداول تشخیصی و کلیدهای شناسایی، جنس و گونه‌های باکتریایی مشخص شدند. جهت تشخیص باکتری‌های ویبریو از تست‌های بیوشیمیایی مرسوم استفاده گردید (شکل ۱). تست‌های بیوشیمیایی قابل استفاده برای تشخیص باکتریها تا حد گونه بر اساس جدول (۱) و رنگ پرگنه بر روی محیط TCBS و شکل آنها بررسی و ثبت گردید.

در طول دوره پرورش، اطلاعات مدیریتی روزانه مزرعه از جمله مدیریت آب، غذایی و برخی فاکتورهای کیفی آب شامل شوری توسط دستگاه شوری سنج مدل WTW-320 در یک نوبت، pH توسط دستگاه pH متر دیجیتال مدل WTW-330i، در دو نوبت (صبح و عصر)، اکسیژن محلول آب و درجه حرارت آب توسط دستگاه اکسیژن متر مدل Oxygouard در دو نوبت (صبح و عصر)، به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت گردید (Pfeffer et al., 2003).

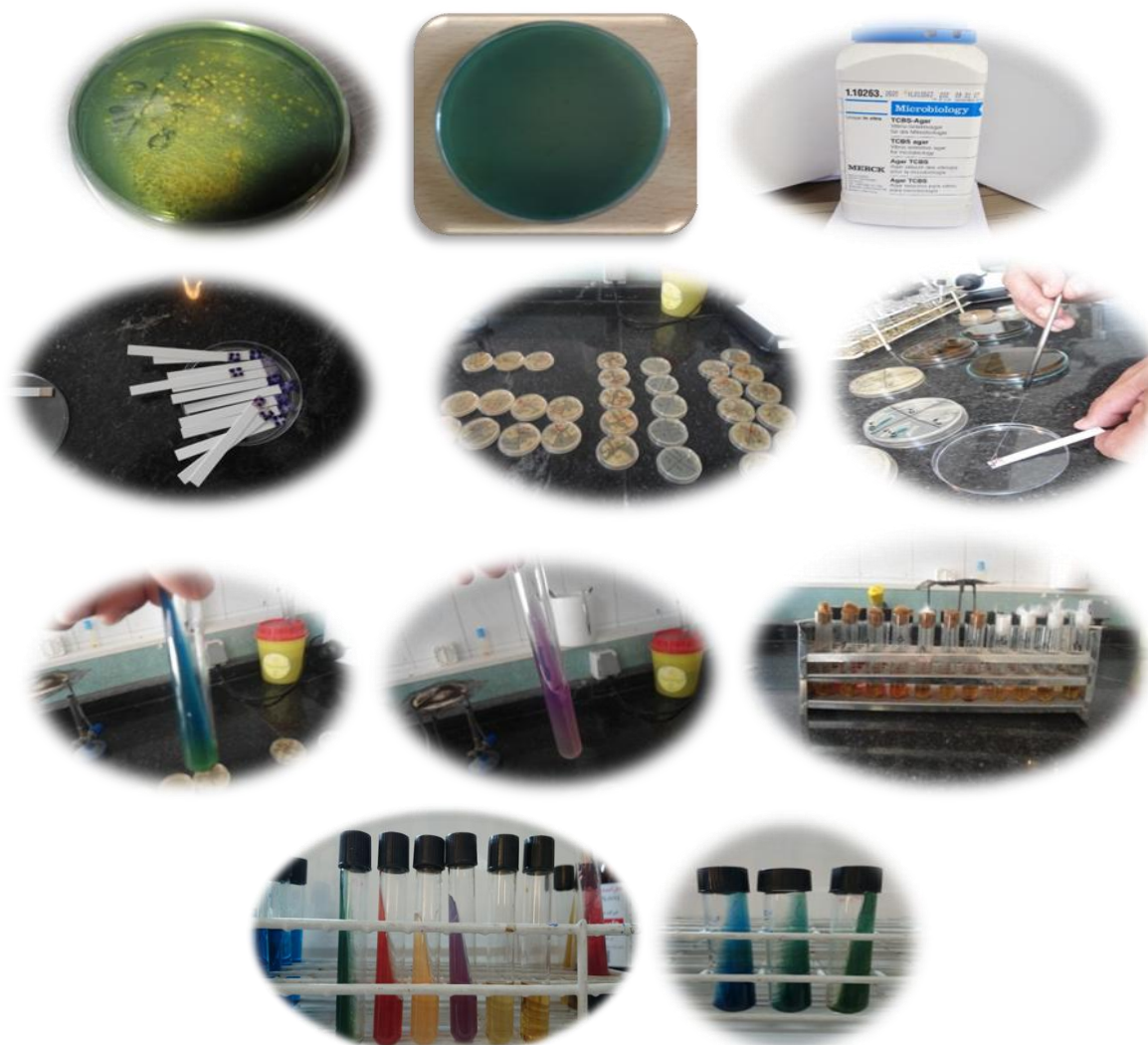
در طول چهار ماه پرورش، کلیه اطلاعات جمع آوری شده جهت تجزیه و تحلیل و رسم جداول و نمودارها وارد برنامه رایانه‌ای Excel گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS تحت ویندوز استفاده شد. پس از تعیین گونه ویبریوهای جداسازی شده با استفاده از برنامه نرم افزاری Excel، ابتدا میانگین و درصد فراوانی گونه‌های مختلف ویبریوهای موجود در آب و رسوب، آب ورودی (کانال) و دو استخر ( $C_2-15-P_4$  و  $C_2-11-P_2$ ) پرورشی تعیین شد. سپس به کمک برنامه نرم افزاری SPSS و آزمون ANOVA میانگین فراوانی و تفاوت میانگین تعداد کل ویبریوها در کانال آب رسان و استخرها مورد مقایسه قرار گرفتند.

جدول ۱. تست های تفریقی جهت تشخیص گونه های ویبریو

<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. nereis</i>	<i>V. gazogenes</i>	<i>V. natrigenes</i>	<i>V. spelandidus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. casuculolae</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. harveyei</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	باکتری آزمایش آزمایش
+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	تحمل نمک ۰٪
+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	تحمل نمک ۳٪
+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	تحمل نمک ۸٪
+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	تحمل نمک ۱۰٪
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	اورنیتین
+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	آرژنین
+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	لیزین
-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	رشد در دمای ۴°C
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	رشد در دمای ۳۰°C
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	رشد در دمای ۳۵°C
+	d	+	+	-	+	-	-	-	+	رشد در دمای ۴۰°C
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	اکسیداز
-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	گلوکز
-	-	+	+	-	+	-	+	d	d	آرابینوز
d	-	+	+	+	+	-	-	d	+	گلاکتوز
+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	سوکروز
+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	تروهالوز
-	-	+	+	d	d	-	+/-	+	-	سلوبیوز
-	-	-	-	-	--	-	-	-	-	لاکتوز
-	-	+	-	-	+	-	-	d	-	سالی سین
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	سیترات
+	-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	مانیتول
-	-	+	-	-	-	-	+/-	-	-	سوربیتول
d	+	-	+	-	+	-	-	-	+	اتانول
-	-	-	d	-	-	-	d	-	-	اینوزول
+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	نیترات
+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	MR-VP
Y	Y	G	Y	Y	Y	G	G	G	G	TCBS رنگ کلنی در
-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	نور افشانی
G-	G-	G-	G-	G	G-	G-	G-	G-	G-	گرم

## نتایج

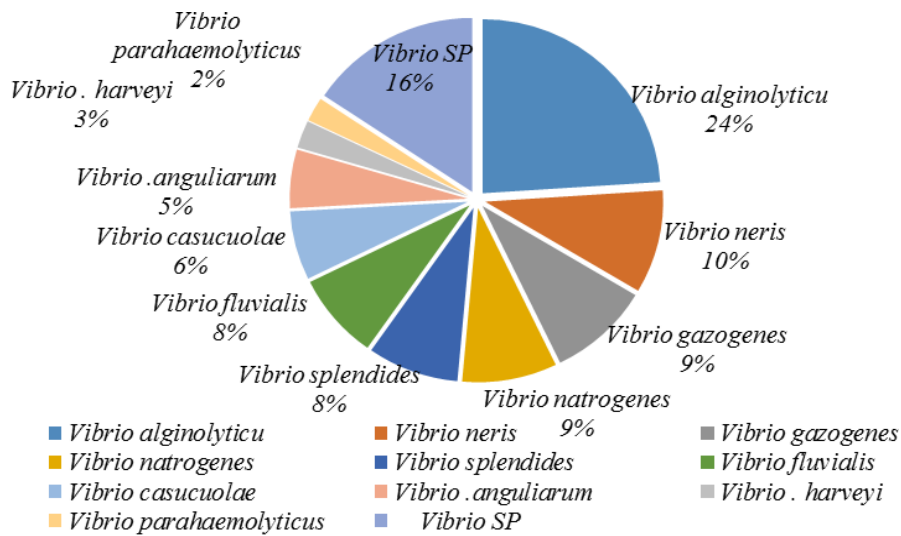
از مجموع ۳۰ نمونه برداشت شده از استخرها و کانال آبرسان نزدیک به ۸۴٪ ویبریوهای جداسازی شده شناسایی شدند. از ۳۱۳ مورد ویبریو جداسازی شده، حدود ۷۵ مورد (۲۴٪) *Vibrio alginolyticus* بودند که با بیشترین فراوانی، گونه غالب بوده و در تمام نمونه‌ها جداسازی گردید. سایر گونه‌ها به ترتیب *Vibrio natrogenes*، *Vibrio nereis*، *Vibrio gazogenes*، *Vibrio splendidus* و *Vibrio fluvialis* بعد از *Vibrio alginolyticus* بیشترین فراوانی را در طول دوره پرورش داشتند. در اوایل دوره، در استخرها ۷ گونه ویبریو جدا شد که با افزایش دوره پرورش به ۱۱ گونه افزایش یافت (شکل ۲). بررسی داده‌ها نشان داد که متوسط میانگین تعداد کل ویبریوها در پنج میلی لیتر از آب ورودی (کانال) و آب استخرهای ۲ و ۴ به ترتیب  $47 \pm 0/54$ ،  $58 \pm 2/07$  و  $65 \pm 3/08$  پرگنه در هر ۵ میلی لیتر بوده است (جدول ۲). با جمع بندی نتایج این سه می‌توان گفت بیش از ۸۴ درصد از گونه‌های ویبریو از طریق کشت‌های تفریقی و تست‌های بیوشیمیایی جداسازی شده، شناسایی شدند (شکل ۱). درصد فراوانی گونه‌های مختلف ویبریو به تعداد کل ویبریوهای موجود، در طول دوره پرورش در شکل (۲) آورده شده است. گونه *Vibrio alginolyticus* بیشترین فراوانی را در طول بررسی داشته است (شکل ۳). همچنین تغییرات تعداد کل کلنی‌های باکتری ویبریو در رسوب و آب کانال و استخرها مشاهده شده در طول دوره پرورش به شرح شکل (۴) می‌باشد.



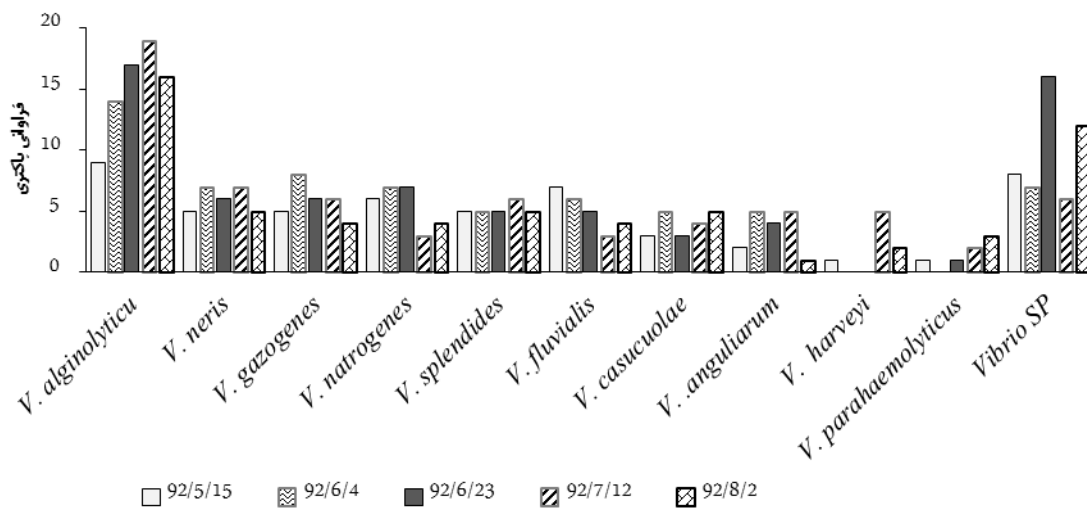
شکل ۱. نمونه‌های از کشت‌های تفریقی جهت شناسایی گونه‌های ویبریو

جدول ۲. میانگین (پرگنه) باکتری‌های جنس ویبریو در پنج میلی لیتر آب و رسوب

شماره	تعداد نمونه	۵ میلی لیتر آب (CFU/ml)	۲۵g رسوب (CFU/g)	تعداد کل (CFU/ml)
ورودی کانال	۱۰	$4/7 \times 10^3$	$4/4 \times 10^3$	$9/1 \times 10^3$
استخر ۲	۱۰	$5/8 \times 10^3$	$4/9 \times 10^3$	$1/07 \times 10^4$
استخر ۴	۱۰	$6/5 \times 10^3$	$5/0 \times 10^3$	$1/15 \times 10^4$
جمع میانگین	۱۰	$5/66 \times 10^4$	$4/76 \times 10^4$	$3/13 \times 10^4$



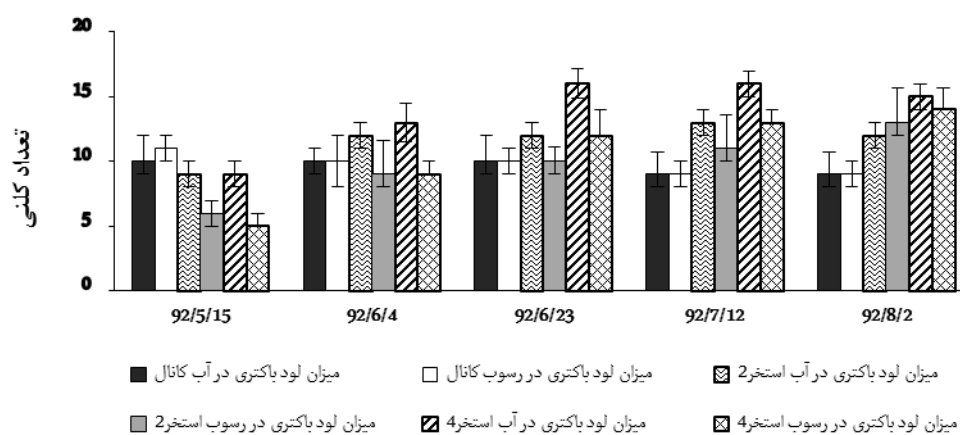
شکل ۲. درصد فراوانی گونه‌های مختلف ویبریو به تعداد کل ویبریوها



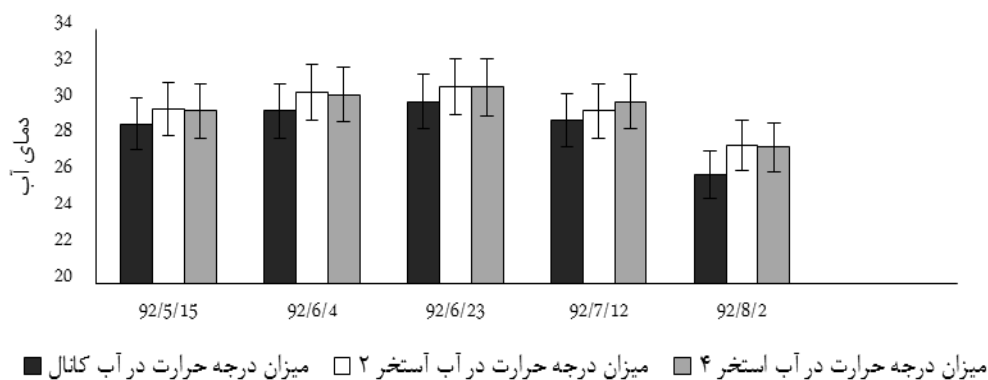
شکل ۳. میانگین تعداد باکتری ویبریو (تنوع گونه ای) در طول دوره پرورش

حداقل و حداکثر دمای ثبت شده در طول دوره پرورش در استخرها، ۲۳ شهریور (۳۱/۵°C) و کمترین آن آبان ماه ۲۷/۳°C و در کانال آب رسان بالاترین دما ۲۳ شهریور (۳۰°C) و کمترین آن آبان ماه ۲۶°C بوده است (شکل ۵). در طول دوره پرورش

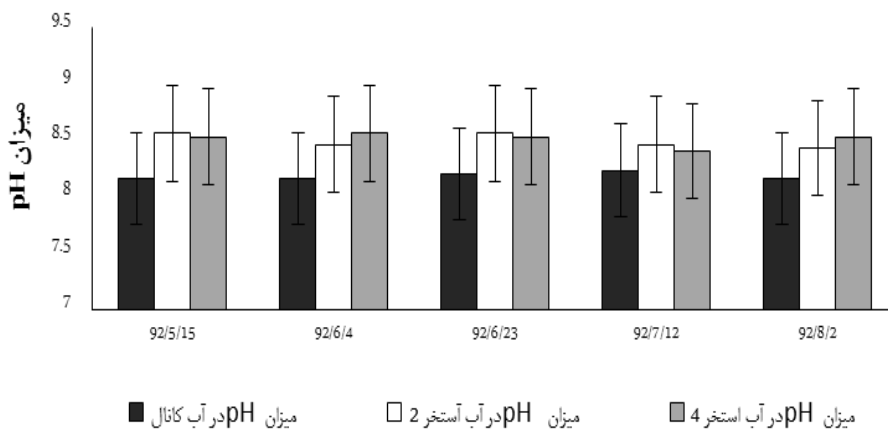
pH آب کانال تغییر چندانی نداشت حداکثر آن (۸/۲۳) و حداقل آن (۸/۱۶) بود. اما pH آب استخرها بین (۸/۳) تا (۸/۷) تغییر کرد (شکل ۶). میزان اکسیژن محلول کانال آبرسان در طول دوره پرورش تغییر چندانی نداشت، حداکثر ۱۰ و حداقل آن ۹/۶ میلی‌گرم برلیتر، اما در استخرهای پرورشی از اول دوره به آخر دوره روند کاهشی داشته است (شکل ۷). در طول پرورش میزان شوری در استخرها تا نزدیک اواخر دوره پرورش افزایش داشت (۴۶-۴۲ ppt) اما در کانال آبرسان از اول دوره به آخر دوره پرورش از کاهش جزئی (۳۸/۵-۳۹/۵ ppt) برخوردار بود. میانگین شوری در کانال (۳۸/۶±۰/۶۱۴ ppt)، استخر ۲ (۴۴/۴±۱/۰۷۴ ppt) و در استخر ۴ (۴۳/۸±۱/۰۸۵ ppt) بود (شکل ۸).



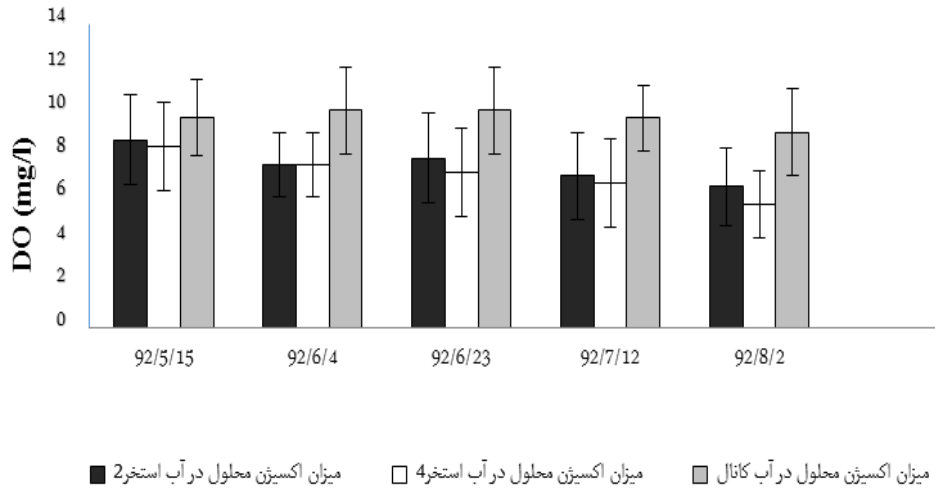
شکل ۴. تغییرات تعداد کل کلنی های باکتری و بیرو مشاهده شده در طول دوره پرورش



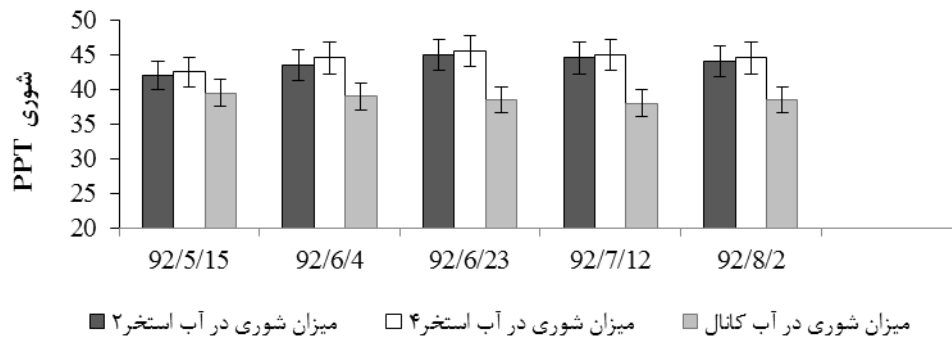
شکل ۵. تغییرات درجه حرارت در آب



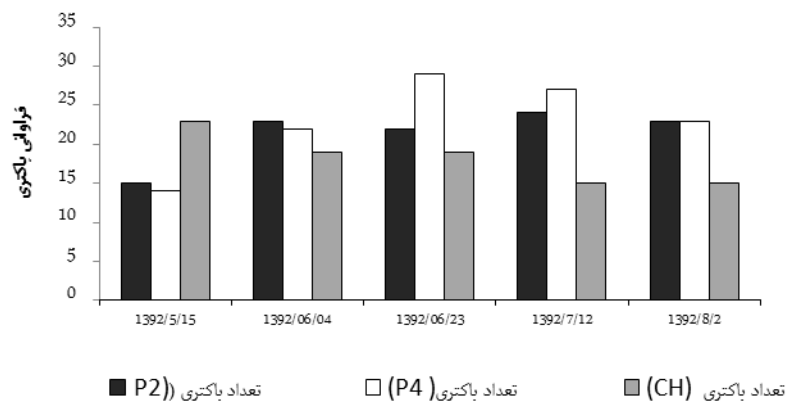
شکل ۶. تغییرات pH در طول دوره بررسی



شکل ۷. تغییرات اکسیژن در زمان های مختلف در نمونه های مورد بررسی



شکل ۸. تغییرات شوری در زمان های مختلف در نمونه های مورد بررسی



شکل ۹. میانگین فراوانی رشد باکتری ها در طول دوره پرورش

## بحث

نتایج بیانگر آن است که بیشترین میزان بار باکتریایی جنس ویبریو در استخر پرورش میگوی *L. vennamie* در گواتر به گونه *V. alginolyticus* تعلق داشته و میزان سایر گونه‌های مختلف این جنس، به ترتیب به گونه *V. natriegenis*، *Vibrio*، *Vibrio natriegenis* و *Vibrio gazogenes nereis* و *Vibrio Fluvialis* تعلق دارد که بر اساس مرور منابع این گونه‌ها فلور طبیعی آب نیز می‌باشند (Rasekhi, 1999).

در مطالعه Afsharnsb و همکاران (۲۰۱۴)، مهمترین گونه باکتریایی جداسازی شده از اندام‌های مختلف میگو (هپاتوپانکراس، آبشش و همولنف) در مزارع مجتمع پرورش میگوی گواتر را *V. alginolyticus* گزارش کرده است که بر اساس مطالعه حاضر، فراوانی این باکتری در رسوب و آب استخر پرورش میگو می‌تواند یکی از دلایل آن باشد.

تحلیل آماری تعداد کل ویبریوها در آب ورودی (کانال)، آب استخرها ( $C_2-11-P_4$  و  $C_2-15-P_2$ ) به وسیله برنامه نرم افزاری SPSS و براساس روش ANOVA نشان داد که آب ورودی از نظر تعداد کل ویبریو در طول دوره پرورش تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P > 0.05$ ) اما آب موجود در درون دو استخر مقایسه شد که نتایج نشان دهنده آن بود که استخرها نسبت به هم و کانال ورودی از نظر تعداد کل ویبریوها و تنوع با هم تفاوت داشته‌اند ( $P < 0.05$ ). همچنین میانگین تعداد انواع گونه‌های ویبریو موجود در استخر شماره ۲ و ۴ با هم تفاوت معنی‌داری داشتند ( $P < 0.05$ ).

بررسی‌ها نشان داد بیش از ۸۴ درصد از کل ویبریوهای جداسازی شده از نمونه‌ها شناسایی شده، در آب کانال و استخرها متعلق به گونه‌های *V. natriegenis*، *V. harveyi*، *V. nereis*، *V. splendidus*، *V. gazogenes*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus*، *V. Fluvialis*، *paraheamoliticus*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus*، *V. natriegenis*، *V. splendidus*، *V. nereis* به ترتیب بیشتر از بقیه گونه‌ها بودند. به نظر می‌رسد در طول دوره پرورش به دلیل افزایش شوری در استخرهای پرورش میگو، وفور مواد غذایی به خاطر غذادهی و وجود مواد آلی فراوان ناشی از مواد زاید میگوها، رشد باکتریها در استخرها افزایش می‌یابد؛ مثلاً گونه *Vibrio alginolyticus* یک گونه غالب منطقه است و تحمل بالایی در مقابل شوری و دما دارد.

Gnjour در سال (۲۰۰۱) رایج‌ترین ویبریوهای را که از آبشش میگو جداسازی نموده بود به ترتیب فراوانی: *Vibrio paraheamoliticus*، *Vibrio alginolyticus*، *Vibrio vulnificus* و *Vibrio Fluvialis* گزارش کرد (Gnjour, 2001). همچنین، Nash و همکاران (۱۹۹۲) طی تحقیقی اعلام نمودند که به ترتیب باکتری‌های *V. paraheamoliticus*، *V. damselae*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus*، *V. anguillarum*، *V. Listonella*، از میگو جداسازی می‌شوند (Nash et al., 1992).

Majidinasab در سال (۱۹۹۴)، طبق تحقیقات انجام شده در تایلند بیان نمود، در ماه‌های فوریه و آوریل به ترتیب باکتریهای *Vibrio anguillarum*، *V. Listonella*، *V. vulnificus*، *V. paraheamoliticus*، *V. alginolyticus*، از جمله رایج‌ترین ویبریوهای هستند که از میگوی ببری سیاه جداسازی می‌شوند اما در ماه ژانویه به ترتیب باکتریهای، *V. paraheamoliticus*، *V. damselae*، *V. Listonella*، *V. anguillarum*، *V. vulnificus* و *V. alginolyticus* از جمله رایج‌ترین باکتریهای هستند که از میگوی ببری سیاه جداسازی شدند (Majidinasab, 1994). طبق این تحقیق هم فراوانی و تنوع گونه‌های مختلف ویبریو در ماه‌های مختلف سال متفاوت است.

Sung و همکاران (۲۰۰۱)، تغییرات گونه‌ای بسیار کم باکتری جنس ویبریو را در ابتدای دوره پرورش میگوی ببری سیاه *P. monodon* مشاهده کردند، ولی در طول دوره پرورش تعداد و تنوع ویبریوها به خصوص فراوانی ویبریوآلجینولیتیکوس افزایش یافته بود که مشابه نتایج این تحقیق می‌باشد. در ابتدای دوره پرورش، تنوع کم اما با افزایش طول دوره پرورش فراوانی و تنوع ویبریوها نیز افزایش یافته است (شکل ۴).

نتایج آنالیز آماری از طریق تجزیه آنالیز واریانس (ANOVA) نشان می‌دهد که بین میزان بار باکتریایی و فراوانی گونه‌های مشاهده شده در زمان‌های مختلف در آب اختلاف معنی‌داری بوده اما در بار باکتریایی رسوب تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین در بررسی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی نیز بین ایستگاه‌های نمونه برداری و در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در بررسی مقایسه میانگین فراوانی گونه‌های شناسایی شده از طریق تست تعقیبی دانکن، به منظور تعیین تفاوت بین زمان‌های نمونه برداری و تعیین زمان تفاوت، بین لود باکتری در تاریخ ۵ مرداد با ۲ آبان اختلافی مشاهده نگردید اما با سایر تاریخ‌های نمونه برداری تفاوت معنی‌دار بود. همچنین بین تاریخ ۲۴ شهریور با ۴ شهریور تفاوت معنی‌داری نبود. نتایج بیانگر این موضوع است که لود باکتری در زمان‌های مختلف متفاوت بوده و از یک روند ثابت برخوردار نیست (شکل ۴). در طی ماه شهریور دوبار نمونه برداری صورت گرفته که در آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری در میزان بار باکتریایی و فراوانی آن مشاهده نگردید. این مسئله بیانگر عدم اختلاف در طول یک ماه بررسی می‌باشد. اما بین زمان‌های مختلف بیشترین میزان اختلاف بین مرداد و مهر می‌باشد.

در بررسی مقایسه میانگین‌های میزان بار باکتریایی و فراوانی بین نمونه‌های رسوب در زمان‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که می‌توان نتیجه گرفت آماده سازی استخرهای پرورشی به درستی انجام نشده است. افزایش بار باکتریایی در طول دوره پرورش به دلیل باقی مانده‌های مواد غذایی، مدفوع میگو و مرگ و میر پلانکتونی قابل انتظار است اما در اول دوره پرورش با توجه به استفاده از آهک پاشی و آماده سازی باید بار باکتریایی کم باشد (Sheryl Oliveira Fernandes *et al.*, 2013) ولی بر اساس نتایج، چنین شرایطی در استخرهای نمونه برداری مشاهده نگردید.

درجه حرارت در طی زمان‌های مختلف نمونه برداری فقط در شهریور و مهر ماه اختلاف معنی‌داری ندارند اما در سایر ماه‌های نمونه برداری اختلاف معنی‌دار است. به نظر می‌رسد اختلاف درجه حرارت نیز بر بار باکتریایی تاثیر داشته است (شکل ۵). سایر فاکتورهای آب از جمله شوری، اکسیژن محلول و pH در زمان‌های مختلف نمونه برداری اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (شکل ۶، ۷، ۸).

در اکوسیستم استخر پرورش میگو متغیرهای شیمیایی مانند اکسیژن و pH همچنین تکنیک غذادهی و کیفیت آن، مهمترین نقش را در میزان بار باکتریایی آن محیط آبی بازی می‌کنند. به همین دلیل تاثیر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب بر بار باکتریایی آب و رسوب از طریق همبستگی پیرسون بررسی گردید. نتایج نشان داد که همبستگی بسیار معنی‌داری بین درجه حرارت، شوری، اکسیژن محلول و pH آب با بار باکتریایی آب وجود دارد در صورتیکه بار باکتریایی رسوب فقط با شوری آب همبستگی معنی‌داری دارند.

داده‌ها نشان می‌دهد که تراکم باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس و دیگر ویبریوها در آب استخرها بیش از آب ورودی است. لذا به نظر می‌رسد شرایط محیطی استخرها برای افزایش تراکم این باکتری‌ها مساعدتر از آب ورودی باشد که به دلیل شرایط محیطی استخرهای پرورش میگو به سبب وفور مواد غذایی در نتیجه تراکم بالای میگو، غذادهی و وجود مواد آلی فراوان، برای رشد باکتریها مناسبتر از آب ورودی استخرها بوده است. از سوی دیگر باید توجه داشت که داده‌های موجود در شکل شماره ۹ نشان می‌دهد تعداد ویبریوها در آب استخرها نسبت به آب ورودی، از اول دوره پرورش تا پایان پرورش افزایش می‌یابد که با مطالعه آقای Braunwald و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد (Braunwald *et al.*, 2001).

با توجه به اینکه نتایج نشان دادند در هر لیتر آب استخر به طور متوسط  $10^3 \times 1/1$  عدد باکتری وجود دارد؛ بنابراین در یک استخر ۱ هکتاری با عمق متوسط ۱ متر تعداد  $10^{11} \times 32/2$  عدد باکتری وجود دارد و از سوی دیگر در همین استخر جمعیت متراکمی از میگو نیز زیست می‌نماید. لذا احتمال بروز بیماری ویبریویی ناشی از این باکتری‌ها را نمی‌توان نادیده گرفت و خطر بروز آن را منتفی دانست. هرچند که این تعداد باکتری در شرایط کنترل شده (مدیریت مطلوب آب و استخر) به حدی نیست که بیماری‌زا باشد اما نمی‌توان خطر تکثیر ناگهانی آن و شیوع بیماری را مخصوصاً در شرایطی که میگو تحت استرسهایی مثل وجود سایر بیماریها، تغذیه نامناسب و شرایط بد فیزیکوشیمیایی آب باشد را نادیده شمرد. در صورتی که شرایط استخر برای رشد و تکثیر این باکتری مهیا شود می‌توان منتظر شیوع بیماری بود. مخصوصاً اگر میگو در شرایط نامطلوب و استرس واقع شده باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که پست‌لارو میگو بیش از میگوی بالغ به باکتری ویبریو هاروی حساس است (Gnjour, 2001).

درجه حرارت مناسب برای رشد ویبریوها از ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد ولی می‌توانند در محدوده ۱۰ تا ۴۴ درجه سانتیگراد نیز رشد کنند و در pH کمتر از ۵ و بالاتر از ۱۱ متوقف شوند (Majidinasab, 1994). در مجتمع پرورشی گواتر رنج دما بین ۳۵-۲۵ درجه و pH بین ۹-۸ در نوسان بود، بنابراین در صورت وجود باکتری، شرایط برای رشد آن مهیا می‌باشد. Krieg در سال (۱۹۸۴)، خصوصیات باکتریهای جنس ویبریو را در کتاب Bergey's manual of systematic bacteriology مشخص نمود، بر این اساس دو باکتری *Vibrio marinus* و *Vibrio logei* تنها در دمای ۴ درجه سانتیگراد رشد می‌نمایند (Majidinasab, 1998). بنابراین بسیار بدیهی است که در طول دوره پرورش میگو در استان سیستان و بلوچستان که دما بالاتر از ۴ درجه سانتیگراد است (بالاتر از ۱۵ درجه) این دو باکتری از آب دریا یا استخر جداسازی شوند. یکی از عوامل تأثیرگذار بر فراوانی گونه‌های مختلف ویبریو در آب دریا و حتی استخرهای پرورش، دمای محیط می‌باشد. بنابراین بسیار بدیهی است در فصول مختلف سال و براساس میزان متوسط دمای روزانه، فراوانی برخی از گونه‌های ویبریو در نوسان نباشد، البته تاثیر سایر عوامل محیطی را نباید نادیده گرفت.

Heidelberg و همکاران (۲۰۰۲) تعداد برخی از گونه‌های ویبریو را در نمونه‌های آب که از رودخانه چوپانک (خلیج چیزاپیک) طی ۱۵ آوریل تا ۱۶ دسامبر جمع‌آوری شده بود، شمارش نمودند. آنها گونه‌های *Vibrio cholerae*، *Vibrio mimicus* و *Vibrio cincinnatiensis* را در یک لیتر نمونه آب بررسی و اظهار نمودند که پایش باکتریها در فصل تابستان نشان دهنده تعداد فراوان‌تر باکتریها در این فصل نسبت به پاییز بوده است (Heidelberg et al., 2002).

همان‌گونه که عنوان شد، شاید یکی از علل تفاوت نتایج تحقیقات با تحقیق حاضر در نتیجه تفاوت زمان نمونه برداری باشد در حقیقت ممکن است دمای آب در فراوانی انواع خاصی از ویبریوها موثر باشد. از طرف دیگر، در برخی از تحقیقات فوق الذکر، باکتریها از بدن میگو و گاهی از میگوهای بیمار جداسازی شده‌اند. در حالی که هدف تحقیق ما تعیین فراوانی باکتریهای ویبریو در آب و رسوب استخرهای پرورش میگو بوده است.

در گزارشی که Hossein Khezri در سال (۲۰۰۱)، از وضعیت مدیریت کیفیت آب استخرهای پرورش میگوی ببری سبز سایت حله بوشهر ارائه نموده است بیانگر این مطلب است که میزان<sup>۱</sup> BOD در کانال ورودی آب با استخرهای پرورشی مورد بررسی دارای تفاوت معنی داری می‌باشد ( $p < 0/05$ ). با توجه به اینکه در تحقیق حاضر تعداد کل باکتریهای آب استخر بیش از آب ورودی بوده، می‌توان تطابق نتایج این دو تحقیق را ادعا نمود.

همچنین در سال ۲۰۱۰ بر اساس تحقیقی انجام گرفته، عنوان شده است که *Vibrio natriegens* از جمله رایج‌ترین گونه‌های ویبریو است که در خورها و محیط‌های باتلاقی یافت می‌شود. اما در تحقیق حاضر، رایج‌ترین باکتری جداسازی شده از آب ورودی و استخرهای پرورشی، باکتری *V. alginolyticus* و *V. natriegens* بود. این یافته بیانگر آن است که فلور طبیعی خورهای مختلف، متفاوت است (Thompson et al., 2010).

در تحقیق حاضر نیز به ترتیب باکتری‌های *Vibrio alginolyticus*، *Vibrio natriegens*، *Vibrio vulnificus*، فراوانترین باکتری‌های جداسازی شده از استخرها بودند. همچنین، مشخص شد که جمعیت باکتریها در آب استخرها به طور میانگین ۱/۳ برابر بیش از آب ورودی است.

Sivasankar و همکاران (۱۹۹۶) یکی از عوامل اصلی انتشار *Vibrio harveyi* را شوری بالا می‌داند و عامل شوری را نسبت به دیگر عوامل همچون اکسیژن، درجه حرارت و pH موثرتر می‌داند (Sivasankar and Oaks, 1996).

در مجموع، بررسی نتایج نشان می‌دهد که تعداد باکتریها از اول دوره پرورش تا پایان دوره پرورش در آب استخرها بیش از آب ورودی کانال است. حضور گونه‌های بیماریزای باکتری جنس ویبریو در طی ماهی‌های مطالعه شده (مرداد تا آبان) در استخرهای پرورشی به مدیریت آن مجموعه بستگی دارد. بنابراین پرورش دهندگان میگو با آگاهی از این موضوع باید در بهبود مدیریت آب و تغذیه استخر پرورش تلاش جدی نمایند زیرا در غیر این صورت، با انباشت مواد آلی به سرعت جمعیت باکتری زیاد شده و باعث افزایش BOD و کاهش اکسیژن شده که منجر به کاهش رشد و در نتیجه ضعف ایمنی میگو و بیماری

<sup>1</sup> Biological oxygen demand

خواهد شد که منجر به تلفات می گردد. پیشنهاد می شود شناسایی گونه‌های ویبریو در مزارع پرورش میگو به صورت مستمر انجام شود، تا برای مدیریت بهتر استخر و بعضی مواقع برای استفاده از آنتی بیوتیک بر علیه آنها اقدام گردد. همچنین پیشنهاد می شود، مطالعه شناسایی و فراوانی باکتری جنس ویبریو با روش‌های ملکولی از جمله PCR در طول یک سال نیز انجام شود.

### تشکر و قدردانی

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات جناب آقای دکتر اشکان ازدهاکش پور و خانم مهندس فاطمه ناصری که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

- Afsharnsb, M., Kakoolaky, Sh., Mehrabi, M.R. 2014. Most bacterial pathogens of shrimp hatchery and farm of Iran Shrimp Industry. Scientific, Comparative Pathobiology. 12(2): 1227-1238. (in Persian).
- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J.G., Perez-Castaneda, R., Palacios-Monzon, A., Trujillo-Rodriguez, Ned Ivan De La Cruz-Hernandez. 2010. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 41(3): 464-470.
- Azhdehakosh pours, A., Razvani, S., Abdyan Amiri, A. 2013. Survey and monitoring management of shrimp ponds in two crop system province of Sistan & Baluchistan, Gwater. (UNDP Project) Final Report. Iranian Fisheries Research Institute. 56 p. (in Persian).
- Braunwald, E. Fauci, A.S., Kasper, D.L. 2001. Harrison's principles of internal medicine. 15<sup>th</sup> edision.1: 980-986.
- Carson, J., Higgins, M.J, Wilson, T.K . Gudkovs, N., Bryant, T.N. 2009. Identificaon of *Vibrionaceae* from Australian aquac animals using phenotypic and PCR procedures. *Vibrionaceae*. 1: 1-35.
- Chen, F.R., Liu, P.C., Lee, K.K. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicus*. Zool Naturforsch. 94: 55-99.
- Fulks, W., Main, K.L. 1992. Diseases of cultured *penaeid shrimp* in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Honolulu, HI. pp. 233-253.
- Gnjour, M.S. 2001. Assessment and determination of *vibrio* density of cultured Indian white shrimp. Region of Delaware , Bushehr. Shrimp Research Center, the Institute of salicylate. pp.16. (in Persian).
- Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B., Colwell, R.R. 2002. Seasonality of Chesapeake Bay Bacterio plankton species. Applied and Environmental Microbiology. 68(11): 5488-5497.
- Hossein Khezri, C. 2001. Check the status of water quality, green tiger shrimp step-Bushehr site. Shrimp Research Center, the Iranian Fisheries Research Institute. 63 p. (in Persian).
- Keysami, M.A., Saad, C.R., Daud, H.M., Sijam, K., Alimon, A.R. 2005. Effect of probiotic on larval growth and development rate of *Macrobrachium rosenbergii* (deMan). Kustem 4<sup>th</sup> Annual Seminar held at Primula Beach Resort, Kuala Terengganu, Malaysia. Abstract book. p.80.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., Sneath, P.H.A. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. first edition. Vol. 1. Williams and Wilkins.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Leano, E.M., Paner, M.G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. Aquaculture. 164(1-4): 337-349.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured *penaeid shrimp*. World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 305.
- Majidinasab, A. 1998. Diseases of farmed shrimp. Noor bakhsh publications section. Tehran. p. 208. (in Persian).
- Majidinasab, A. 1994. Identification of cultured shrimp bacteria flora (vice-proliferation and aquaculture), final report. Iranian Fisheries Company. 53 p. (in Persian).
- Nash, G., Nithimathachobe, C., Tungmandi, C., Arkaejamorn, A., Prathanpipat, P., Ruamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pondrared *Penaeus monodon* in Thailand. In: Disease in Asia Aquaculture. Sheriff, I.M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (eds.). pp.143-155.
- Pfeffer, C.S., Hite, F.M., Oliver, J.D. 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of Eastern North Carolina. Applied and Environmental Microbiology. 69: 3526-3531.
- Rasekhi, S. 1999. Prevention and health regulation of disease in shrimp farm. Publisher. Aquaculture Deputy publication. Department of Education Promotion . p. 176. (in Persian).

<sup>2</sup> Polymeras change Reaction

- Sheryl Oliveira, F., Sreepada Shantanu, R.A., Kulkarni, Karekar, S., Shirodkar, R.R., Vogelsang, C., Loka Bharathi, P.A. 2013. Low-input modified extensive shrimp culture system for *Penaeus monodon* restrain *Vibriosis*. International Journal of Marine Science. 3(40): 319- 332.
- Sivasankar, S., Oaks, A. 1996. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. Plant Physiology and Biochemistry. 34(5): 609-620.
- Sung, H.H., Hsu, S.F., Chen, C.K., Thng, Y.Y., Chao, W. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *vibrio communities* in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquaculture. 192: 101-110.
- Thompson, J., Gregory, S., Plummer, S., Shields, R.J., Rowley, A.F. 2010. An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of Applied Microbiology. (4): 1177-1184.
- Tyagi, A., Khushiramani, R., Karunasagar, I. 2007. Antivibrio activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture. 272: 246-253.
- Vandenbergh, J., Thompson, F.L., Gomez- Gill, B., Swings, J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio isolates* from marine aquaculture systems. Aquaculture. 219: 9-20.
- Yongcan, Z., Ben, Z., Xuefen, C., Jiaying, Q. 2003. Priliminary studies of the red body disease in *P. vannamei*. Marine Sciences / Haiyang Kexue. 27(5): 61-65.