جداسازی و شناسایی فنوتیپی ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) به صورت همزیست از اسفنج‌های خلیج فارس بوسیله کیت API 20NE

یاشگین حسن زاده[1*]
نیما بهادر[2]
مجید باصری صالحی[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲. استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۳. استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

***مسئول مکاتبات:**
y.hassanzadeh66@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۱۸
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۳۰۱۸۸

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) یکی از باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا و نمک دوست است که به خانواده ویبریوناسه تعلق دارد. به طور طبیعی این باکتری در محیط‌های دریایی معتدل و دهانه رودخانه یافت می‌شود که عفونت‌های انسانی مختلف از جمله عفونت زخم و گوش را ایجاد می‌کند. بنابراین، مطالعه پیش روبه منظور جداسازی و شناسایی ویبریو آلجینولیتیکوس همزیست از اسفنج‌های خلیج فارس با استفاده از کیت‌های تشخیصی API 20NE انجام شد. برای این منظور تعداد ۴ گونه متفاوت اسفنج (جنس آلجیلاس و اسپونجیا) توسط غواص از عمق ۱ تا ۵ متری آب‌های اطراف اسکله شهید حقانی بندرعباس جمع‌آوری شد (شهریور ۱۳۹۲). اسفنج‌ها همراه با آب دریا به آزمایشگاه انتقال داده شدند و بعد از شستشو بوسیله آب مقطر، عصاره‌گیری با استفاده از آب دریا صورت گرفت. سپس بر روی عصاره ها رقت‌سازی انجام شد و متعاقبا بر روی محیط‌های مارین آگار۲۲۱۶ و تی‌سی‌بی‌اس کشت سطحی انجام گرفت. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و جدایه ها در ابتدا با استفاده از تست های رن آمیزی گرم، اکسیداز و کاتالاز تعیین خصوصیت شدند. در نهایت جدایه‌ها از طریق کیت های API 20NEبه صورت بیوشیمیایی شناسایی شدند. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد در کل ۲۲ جدایه گرم منفی بودند. از این میان، ۴ جدایه به عنوان ویبریو آلجینولیتیکوس شناسایی شدند. چون این باکتری برای انسان بیماری‌زا است بنابراین، نتایج پیشنهاد می‌کند مردمی که در این منطقه جغرافیایی زندگی می کنند باید از خطرات این باکتری آگاه باشند و در صورت داشتن هر گونه زخم یا خراش از شنا کردن در این منطقه خودداری کنند.

واژگان کلیدی: اسفنج، خلیج فارس، کیت API، *Vibrio alginolyticus*.

مقدمه

ویبریوها باکتری‌های گرم منفی، منحنی شکل و میله‌ای هستند که جز ساکنین بومی محیط‌های دریایی به شمار می‌آیند (Pruzzo *et al*., 2005). گونه‌های متعدد این جنس علاوه بر انسان برای جانوران دریایی از جمله نرم تنان، مرجان‌ها و ماهی بیماری‌زا هستند که تأثیرات زیست محیطی و اقتصادی زیادی را برای جوامع بشری به بار می‌آورند (Paillard *et al*., 2004; Vezzulli *et al*., 2010; Austin, 2005). این باکتری های نمک‌دوست علاوه بر آب دریا از غذاهای دریایی نیز جداسازی شده اند (Chakraborty *et al*., 1997; Maugeri *et al*., 2000). فراوانی سویه های بیماریزای *ویبریو* در آب های ساحلی کشور های اروپایی نظیر ایتالیا، اسپانیا و فرانسه تا کنون به ثبت رسیده (Barbieri *et al*., 1999; Martinez-Urtazaet *et al*., 2008; Hervio-Heath *et al*., 2005)

همچنین اعضای این جنس مسئول تعداد زیادی از بیماری‌های حاصله از غذای دریایی در کشورهای آسیایی و آمریکا شناخته شده‌اند (Daniels *et al*., 2000; Su and Liu, 2007).

یکی از ۱۰ گونه بیماری‌زای این جنس باکتری نمک دوست ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) است که این گونه به عنوان بیماری‌زای انسان مسئول در ایجاد عفونت زخم‌های سطحی، عفونت گوش و سپتی سمی و عفونت های منجر به مرگ در بیمارانی که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده مانند بیماران دارای سوختگی شناخته شده است (Morris and Black, 1985; Schmidt *et al*., 1979; English and Lindberg, 1977). همچنین این باکتری از عوامل ایجاد کننده فاسیت های نکروز کننده است که وقوع عفونت با این باکتری به صورت چشمگیری در طول ماه های تابستان به دنبال افزایش جمعیت اعضای *ویبریو* در آب‌های گرم و شور افزایش می‌یابد (Morris and Black, 1985; Gomez *et al*., 2003). بیش‌ترین گزارش‌ها در مورد عفونت زخم توسط ویبریو آلجینولیتیکوس در اثر تماس زخم یا خراش موجود در روی بدن با آب آلوده به این باکتری بوده است (Reilly *et al*., 2011).

از طرف دیگر اسفنج‌ها موجودات آبزی هستند که به دلیل توانایی در فیلتر کردن آب دریا، میکروارگانیسم های وسیعی از جمله باکتری‌ها را به صورت همزیست در خود حمل می‌کنند (Osinga *et al*, 2003; Gonzales and Moran, 1997). به همین جهت بررسی این ارگانیسم ها می تواند اطلاعات جامعی در مورد جمعیت باکتری‌های موجود در آب دریای اطراف آن‌ها، به خصوص باکتری‌های غالب *ویبریو*را در اختیار ما قرار دهد (Taylor *et al*., 2007). همچنین به دلیل اهمیت بالای خلیج فارس از نظر ذخایر زیستی و تأثیرات آن بر روی سلامت، اقتصاد و تغذیه مردم ساکن در خط ساحلی این خلیج و ارتباط ماهیگیران با کلیه موجودات حاضر در این آب‌ها، تحقیقپیش رو سعی بر جداسازی باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس از اسفنج‌های موجود در خلیج فارس را دارد تا بر اساس جداسازی ارگانیسم مذکور به مردم و ماهیگیران هشدارهای لازم را ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

خلیج فارس در جنوب ایران و همجوار با استان‌های هرمزگان، بوشهر و خوزستان قرار دارد (N24°-30°30′, E48°-56°25′) که دارای آب و هوای خشک و نیمه استوایی است. در این مطالعه بنیادی–تجربی، به منظور جداسازی باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس از اسفنج‌های منطقه، ۴ گونه متفاوت اسفنج (۱ گونه از جنس آلجیلاس (*Algelas* sp.)، ۳ گونه از جنس اسپونجیا (*Spongia* sp.)) توسط غواص از عمق ۱ تا ۵ متری آب‌های اطراف اسکله شهید حقانی بندرعباس (شهریور ۱۳۹۲) جداسازی شد. این اسکله از جمله مکان‌های پر رفت و آمد و مهم در زمینه حمل و نقل مسافر بین بندرعباس، جزیره قشم و هرمز است. همچنین افراد زیادی روزانه در این آب‌ها به شنا و ماهیگیری می‌پردازند که اهمیت مکان نمونه‌گیری را نشان می دهد. نمونه‌ها پس از جداسازی در ظرف‌های استریل حاوی آب دریا قرار داده شد و این ظرف‌ها بلافاصله در محفظه حاوی یخ با دمای تقریبی ۴ درجه سلسیوس گذاشته و در کم‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه میکروبیولوژی ارسال گردید.

جهت جداسازی و خالص سازی باکتری‌های موجود در اسفنج ها، ابتدا باید عصاره ی هر اسفنج را بدست آورده، بطوری‌که ابتدا اسفنج ها را با آب مقطر برای جداسازی باکتری‌هایی که به سستی به سطح خارجی آن‌ها چسبیده‌اند و همچنین رسوبات متصل به آن‌ها شسته و هر اسفنج به چندین قطعه کوچک تقسیم گردید، سپس ۲ تا ۳ قطعه از هر کدام را به صورت جداگانه همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب دریای استریل شده در هاون استریل کوبیده تا یک ماده‌ی خمیری شکل یکدستی حاصل شود. سوسپانسیون بدست آمده را از کاغذ صافی (Whatman, 90mm) عبور داده و بدین ترتیب عصاره‌ی اسفنج‌ها تهیه گردید.

بر روی هر عصاره‌ی اسفنج رقت‌سازی صورت گرفت (10^{-6} تا 10^{-8}). از هر رقت به اندازه‌ی ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه به محیط‌های مارین آگار۲۲۱۶ (Marin agar2216, Difco& BBL Co. USA) و تی‌سی‌بی‌اس (TCBS, Merck. Germany) تلقیح و بوسیله گلاس اسپریدر کشت سطحی صورت گرفت. پلیت های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری

شد. بعد از رشد باکتری ها، کلنی های مختلف از نظر تنوع شکل، قوام و رنگ مورد ارزیابی قرار گرفت و بر روی محیط‌های جدید خالص سازی شدند. جهت جداسازی باکتری‌های گرم منفی رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت، سپس جدایه های گرم منفی از نظر تست های اکسیداز، کاتالاز و سیترات مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت بدلیل اینکه ویبریوآلجینولیتیکوس باکتری اکسیداز و کاتالاز مثبت و سیترات منفی می‌باشد. بنابراین جدایه‌هایی که از نظر دو تست اول مثبت و از نظر تست سیترات منفی هستند برای شناسایی فنوتیپی توسط کیت-های تشخیصی API 20NE (Biomerieux, France) مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور بدست آوردن کشت جوان، جدایه‌هایی گرم منفی به مدت ۲۴ ساعت دوباره بر روی محیط مارین آگار۲۲۱۶ کشت داده شدند و در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از طی این مدت برای هر جدایه محلول نرمال سالین ۰/۸۵درصد (Normal Salin) به مقدار ۲ میلی لیتر درست کرده (*ویبریو ها* نمک‌دوست هستند)، سپس ۱ الی ۴ کلنی از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه را برداشته و با نرمال سالین سوسپانسیون تهیه گردید (غلظت نرمال سالین مساوی با ۰/۵ مک فارلند). این سوسپانسیون درون کیت‌های API 20NE (بیومریکس، فرانسه) تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. در نهایت جواب هر کیت با توجه به تغییر رنگ ایجاد شده و پس از افزودن معرف‌ها به تیوپ‌های خاص (Nit1, Nit2, Kovac's reagent, ZN) و همچنین مطالعه رشد باکتری‌ها در محیط های قندی به صورت مثبت و منفی سنجیده شد و شناسایی نهایی با استفاده از APIweb صورت گرفت.

نتایج

به طور کلی از ۴ نمونه اسفنج آب‌های اطراف اسکله شهید حقانی (بندرعباس)، ۲۸ باکتری جداسازی شد که بیش‌ترین آن مربوط به اسفنج جنس آلجیلاس بودند. بعد از رنگ‌آمیزی گرم ۲۲ جدایه به عنوان گرم منفی و ۶ جدایه به عنوان گرم مثبت شناسایی شدند (جدول ۱). جدایه‌های گرم منفی در زیر میکروسکوپ دارای اشکال میله‌ای و کوچک بودند. کلنی آن‌ها بر روی محیط کشت مارین آگار۲۲۱۶ گرد، کوچک با حاشیه صاف و اغلب دارای پیگمان بودند. پیگمان‌ها از نظر رنگ تفاوت داشته به طوری‌که بعضی قهوه‌ای، زرد و حتی صورتی بودند. ۶ نمونه از این جدایه‌ها سفید یا بی‌رنگ بودند که در این میان کلنی های سفید موکوئیدی که شاخصه ویبریو آلجینولیتیکوس است مشاهده گردید.

جدول۱: تعداد و خصوصیت گرم باکتری‌های ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) جداسازی شده از نمونه‌های اسفنج خلیج فارس در محدوده بندرعباس (شهریور ۹۲).

نمونه اسفنج	تعداد باکتری‌های جداسازی شده CFU/ml	تعداد باکتری‌های گرم مثبت CFU/ml	تعداد باکتری‌های گرم منفی CFU/ml
شماره۱ (جنس *آلجیلاس*)	۱۰×۱۰^{۵}	۲×۱۰^{۵}	۸×۱۰^{۵}
شماره۲ (جنس *اسپونجیا*)	۷×۱۰^{۵}	۱×۱۰^{۵}	۶×۱۰^{۵}
شماره۳ (جنس *اسپونجیا*)	۶×۱۰^{۵}	۳×۱۰^{۵}	۳×۱۰^{۵}
شکاره۴ (جنس *اسپونجیا*)	۵×۱۰^{۵}	۰	۵×۱۰^{۵}

پس از انجام تست‌های اکسیداز، کاتالاز و سیترات از ۲۲ جدایه گرم منفی، ۱۵ جدایه اکسیداز مثبت و ۷ جدایه اکسیداز منفی بودند که از این ۱۵ باکتری اکسیداز مثبت، ۱۲ جدایه کاتالاز مثبت و بقیه کاتالاز منفی بودند. از میان این ۱۲ جدایه اکسیداز و کاتالاز مثبت، فقط ۵ باکتری سیترات منفی بودند که (۲ جدایه از اسفنج شماره ۱، ۱ جدایه از اسفنج شماره ۲، ۱ جدایه از اسفنج شماره ۳ و ۱ جدایه از اسفنج شماره ۴) جهت شناسایی با کیت API20NE مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل از شناسایی فنوتیپی این ۵ جدایه توسط کیت API

20NE وجود ۴ جدایه ویبریو آلجینولیتیکوس از هر ۴ اسفنج را به اثبات رساند که به ترتیب از اسفنج شماره۱ با ۸۶ درصد شباهت، اسفنج شماره۲ با ۹۸ درصد شباهت، اسفنج شماره۳ با ۹۳/۴ درصد شباهت و اسفنج شماره ۴ با ۹۰ درصد شباهت جداسازی شدند. خصوصیات بیوشیمیایی جدایه ها در جدول۲ ثبت شده است.

جدول۲: خصوصیات بیوشیمیایی جدایه های باکتری‌های ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) جداسازی شده از اسفنج‌های خلیج فارس در محدوده اسکله شهید حقانی بندرعباس (شهریور ۱۳۹۲).

خصوصیات بیوشیمیایی	باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های اسفنج			
	ویبریو آلجینولیتیکوس **اسفنج شماره۱** **(جنس *آلجیلا س*)**	***ویبریو آلجینولیتیکوس*** **اسفنج شماره۲** **(جنس *سپونجیا*)**	***ویبریو آلجینولیتیکوس*** **اسفنج شماره۳** **(جنس *سپونجیا*)**	***ویبریو آلجینولیتیکوس*** **اسفنج شماره۴** **(جنس *سپونجیا*)**
اکسیداز	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+
سیترات	−	−	−	−
احیاء نیترات	+	+	+	+
تولید ایندول	+	+	+	+
تخمیر گلوکز	+	+	+	+
آرژنین دهیدرولاز	−	−	−	−
اوره آز	−	−	−	−
β−گلوکوزیداز	−	−	−	−
ژلاتیناز	+	+	+	+
β−گالاکتوزیداز	−	−	−	−
استفاده از: گلوکوز	−	−	+	+
آرابینوز	−	−	−	−
مانوز	−	+	+	−
مانیتول	+	+	+	+
ان−استیل−گلوکزآمین	−	+	−	−
مالتوز	+	+	+	+
پتاسیم گلوکنات	−	+	+	+
کاپریک اسید	−	−	−	−
آدیپیک اسید	−	−	−	−
مالات	+	+	+	+
تری سدیم سیترات	−	−	−	−
فنیل استیک اسید	−	−	−	−

(+) واکنش مثبت، (−) واکنش منفی.

بحث و نتیجه‌گیری

جداسازی ویبریو آلجینولیتیکوس از اسفنج‌های خلیج فارس در این تحقیق وجود این باکتری در آب‌های اطراف آن‌ها را نیز نشان می‌دهد. بر طبق تحقیقات دانشمندان ویبریو آلجینولیتیکوس یکی از نمک‌دوست‌ترین اعضای جنس *ویبریو* است که می‌تواند در غلظت های بالای نمک رشد کند به طوریکه ۷۰ درصد از سویه های این گونه می‌توانند در غلظت ۱۰ درصد نمک رشد کنند (Farmer and Hickman-Brenner, 1992). با توجه به اینکه خلیج فارس از جمله آب‌های شور به حساب می‌آید می‌تواند یکی از غنی‌ترین محیط ها از جهت حضور جمعیت‌های حجیم این باکتری باشد به طوریکه صحت این فرضیه با توجه به جداسازی ۴ جدایه ویبریو آلجینولیتیکوس از اسفنج خلیج فارس به اثبات می‌رسد. همچنین حضور سویه‌های بیماری‌زای ویبریو و توانایی ایجاد بیماری ارتباط زیادی با آب‌های گرم دارد. مشاهدات نشان می‌دهد تغییر آب و هوا و گرم شدن جهانی آن باعث گرم شدن آب‌های سطحی شده که این امر موجب افزایش جمعیت *ویبریوهای* بیماری‌زا (ویبریو آلجینولیتیکوس) در آب های ساحلی شده است و احتمال عفونت با این باکتری را افزایش می‌دهد (Baker-Austin *et al*., 2010; Vezzuli *et al*., 2012). با توجه به این مسئله که خلیج فارس دارای آب و هوای نیمه استوایی است و هنگام نمونه‌گیری در این مطالعه دمای سطح آب به صورت تقریبی ۲۷–۲۹ درجه سانتی‌گراد بود، همسو بودن این نتایج با حضور گونه ی بیماری‌زای ویبریو آلجینولیتیکوس این تحقیق در آب‌های گرم خلیج فارس بیش از پیش ما را به فکر افزایش بیماری‌های حاصله از این جدایه در منطقه معطوف می‌کند اگر توجهات لازم در این زمینه به عمل نیاید.

مطالعه‌های دیگر به این مسئله اشاره می‌کنند که ویبریوها زمانی که به سطوح جانوران دریایی مختلف متصل هستند مانند ماهی، مرجان و میگو، بهتر می‌توانند جمعیت خود را افزایش داده و به بقای خود کمک کنند (Huys *et al*., 2001; Rosenberg and Ben-Haim, 2002; Vandenberghe *et al*., 1998). یکی از این سطوح اسفنج‌های موجود در آب‌های ساحلی است. استابیلو و همکارانش این فرضیه را با جداسازی *ویبریو های* مختلف از اسفنج جنس اسپونجیا قوت بخشیدند (Stabili *et al*., 2008). بنابراین مشابه با مطالعه استابیلو جداسازی ۳ باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس از اسفنج جنس اسپونجیا در مطالعه پیش رو می‌تواند دلیلی بر صحت این یافته‌ها باشد.

همان طور که پیش تر ذکر شد، حضور ویبریو آلجینولیتیکوس در اسفنج نشان دهنده حضور آن در آب‌های گرم و شور خلیج فارس است. گزارش‌های متعددی از حضور این باکتری در آب های مناطق مختلف جهان و ایجاد بیماری در اثر خراش ایجاد شده توسط اسفنج‌ها، مرجان‌ها و یا حمل ماهی ذکر شده است. عفونت زخم با این باکتری اگرچه در اروپا نادر است اما چندین مورد در نقاط مختلف آن مانند انگلیس، هلند و دانمارک به صورت پراکنده گزارش شده است (Reilly *et al*., 2011; Schets *et al*., 2010; Holt *et al*., 2006). در آب‌های کلمبیا نیز این باکتری باعث ایجاد فاسیت‌های نکروز کننده در بدن شخصی شد که در حین شنا کردن دچار جراحت توسط مرجان‌های موجود در ساحل شده بود (Gomez *et al*., 2003). همچنین این باکتری در آب های اقیانوس آرام، نزدیک به هنگ کنگ، باعث ایجاد فاسیت‌های نکروز کننده در فردی شد که توسط یک نوع ماهی زخمی شده بود (Ho *et al*., 1998).باتوجه به اینکه هنوز مطالعات جامعی در زمینه بیماری‌های ایجاد شده با این‌گونه در منطقه خلیج فارس صورت نگرفته، با این وجود تمامی این مطالب می‌تواند هشداری برای مردم ساکن در خط ساحلی خلیج فارس و ماهیگیران منطقه باشد به طوریکه این مطالعه نشان می‌دهد با توجه به جداسازی گونه بیماری‌زای بالقوه این جنس (*Vibrio alginolyticus*) احتمال وقوع عفونت‌های ناشی از زخم‌های ایجاد شده در اثر ماهیگیری یا شنا در این آب‌ها بسیار بالاست.

از طرف دیگر این جدایه نه تنها برای انسان بلکه برای سایر جانوران دریایی از جمله ماهی، میگو، حلزون صدف دار و مرجان بیماری‌زا است (Xieet al., 2005; Lee *et al*., 1996; Zorrilla *et al*., 2003) به طوری‌که آلودگی مرجان‌ها به ویبریو آلجینولیتیکوس در سواحل چین و دریای کارائیب به ثبت رسیده است (Cerrino *et al*., 2008; Zhenyu *et al*., 2013). بنابراین از دست رفتن منابع گوشت سفید از طریق بیماری‌زایی با این باکتری می‌تواند خسارات جبران ناپذیر اقتصادی و بهداشتی (گاستروانتریتیس) را برای مردم به دنبال داشته باشد. همچنین از بین رفتن ذخایر مرجانی در اثر این باکتری مخاطرات محیط زیستی بسیاری را به دنبال دارد چرا که این

ارگانیسم ها به عنوان ریه های دریا به شمار می آید که موجب پاک‌سازی آب‌ها از آلودگی‌های زیست محیطی می شوند. به خصوص که این عامل بیماری‌زا می تواند از طریق آب از یک موجود بیمار به سایر موجودات دریایی انتقال پیدا کند (Zhenyu *et al*., 2013).

در پایان، با توجه به نتیجه این مطالعه و بیماری‌زا بودن بالقوه جدایه ویبریو ولنیفیکوس باید بیش از پیش آگاهی لازم به مردم و مسئولان از نظر وجود این جدایه و خطرات احتمالی ایجاد بیماری با آن در آب‌های خلیج فارس داده شود. ماهیگیران نیز باید جهت صیادی از وسایل مناسب و پوشش‌هایی مانند دستکش و چکمه استفاده کنند که ایجاد زخم در حین ماهیگیری و یا ارتباط با ارگانیسم‌_های دریایی را به حداقل برسانند. افرادی که به شنا در این منطقه مشغول هستند نیز در صورت بروز صدمه ناشی از ارتباط با مرجان یا اسفنج، زخم را ضد عفونی کرده و سریعاً خود را به یک درمانگاه برسانند تا اقدامات اولیه انجام شود.

منابع

Austin, B., 2005. Bacterial pathogens of marine fish In: Ocean and Health Pathogens in the Marine Environment ed. Belkin, S. and Colwell, R. R., Springer-Verlag, New York, pp. 391-413.

Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. and Martinez-Urtaza, J., 2010. Environmental occurrence and Clinical impact of *Vibrio vulnificus* and Vibrio*parahaemolyticus*: a European perspective. Environmental Microbiology Reports, 2 (1): 7-18.

Barbier, E., Falzano, L., Fiorentini, C, Pianetti, A, Baffone, W, Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M., Kuhn, I., Mollby, R., Bruscolini, F. and Donelli, G., 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic*Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholera* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. Apply and Environmental Microbiology, 65: 2748-2753.

Cervino, J. M., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Lorence, E. A., Goreau, T. J., Hayes, R. L., Winiarski-Cervino, K. B., Smith, G. W., Hughen, K. and Bartels, E., 2008. The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. Journal of Applied Microbiology, 105: 1658-1671.

Chakraborty, S., Nair, G. B. and Shinoda, S., 1997. Pathogenic *Vibrios* in the natural aquatic environment. Reviews on Environmental Health, 12: 63-80.

Daniels, N. A., Mackinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond, R. M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N., Griffin, P. M. and Slutsker, L., 2000.*Vibrio parahaemolyticus* infections in the United State, 1973-1998. Journal of Infectious Disease, 181: 1661-1666.

English, V. L. and Lindberg, R. B., 1977. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from wounds and blood of a burn patient. American Journal of Medical Technology, 43: 989-993.

Farmer, J. J. and Hickman-Brenner, F., 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium* In: The Prokaryotes: A Handbook of the Biology of Bacteria ed. Balows, A., Truper, H. G., Schleifer, K. H., *et al*, Springer-Verlag, New York, pp. 2952-3011.

Hervio-Heath, D., Zidane, M., Le Saux, J. C., Lozach, S., Vaillant, V., Le Guyader, S. and Pommepuy, M., 2005. Toxi-infections alimentairescollectivesliees a la consummation de moulescontaminees par Vibrio parahaemolyticus: enqueteenvironnementale. BullEpidemiol AFSSA, 17: 1-2.

Ho, P. L., Tang, W. M., Lo. K. S. and Yuen, K. Y., 1998. Necrotizing Fasciitis due to *Vibrioalginolyticus* following an injury inflicted a Stingray. Scandinavian Jounal of Infectious Diseases, 30: 192-193.

Holt, H., Christensen, J. J., Bruun, B. and Glismann, S., 2006. Infectious with seawater bacteria. EPI-NEWS, p.26-32.

Huys, L., Dhert, P., Robles, R., Ollevier, F., Sorgeloos, P. and Swings, J., 2001. Search for beneficial strains for turbot (*Scophthalmusmaximus* L.) larviculture. Aquaculture, 193: 25-37.

Gomez, J. M., Fajardo, R., Patino, J. F. and Arias, C. A., 2003. Necrotizing Fasciitis Due to *Vibrioalginolyticus* in an Immunocompetent Patient. Journal of Clinical Microbiology, 41 (7): 3427-3429.

Gonzales, J. M. and Moran, M. A., 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α-subclass of the class proteobacteria in coastal seawater. Apply and Environmental Microbiology, 63: 4237-4242.

Lee, K. K., Yu, S. R., Chen, F. R., Yang, T. I. and Liu, P. C., 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeusmonodon*. Current Microbiology, 32: 229-231.

Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y. and Garcia-Martin, O., 2008. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. Apply and Environmental Microbiology, 74: 265-274.

Maugeri, T. L., Caccamo, D. and Gugliandolo, C., 2000. Potentially pathogenic *Vibrios* in brakish waters and mussels. Journal of Applied Microbiology, 89: 261-266.

Osinga, R., Belarbi, H., Grima, E. M., Tramper, J. and Wijffels, R. H., 2003. Progress towards a controlled culture of the marine sponge *Pseudosuberitesandrewsi* in a bioreactor. Journal of Biotechnology, 100 (2): 141-146.

Paillard, C., Le Roux, F. and Borreg, J. J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. Aquatic Living Resources, 17: 477-498.

Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R. R. and Donelli, G., 2005. Phathogenic*Vibrio* species in the marine and estuarine environment In: Oceans and Health Pathogens in the Marine Environment ed. Belkin, S. and Colwell, R. R., Springer-Verlag, New York, pp. 217-252.

Reilly, G. D., Reilly, C. A., Smith, E. G. and Baker-Austin, C., 2011.*Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. Euro Surveillance, 16 (42): 19994.

Rosenberg, E. and Ben-Haim, Y., 2002. Microbial disease of corals and global warming. Environmental Microbiology, 4: 318-326.

Schets, F. M., de RodaHusman, A. M. and Havelaar, A. H., 2010. Disease outbreaks associated with untreated recreational water use. Epidemiology & Infection, 10: 1-12.

Schmidt, U., Chmel, H. and Cobbs, C., 1979.*Vibrio alginolyticus* infections in humans. Journal of Clinical Microbiology, 10: 666-668.

Stabili, L., Licciano, M., Longo, C., Corrievo, G. and Mercurio, M., 2008. Evaluation of microbiological accumulation capability of the commercial sponge *Spongiaofficinalis* var. adriatica (Schmidt) (Prifera, Demospongiae). Water Research, 42: 2499-2506.

Su, Y. C. and Liu, C., 2007.*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. Food Microbiology, 24: 549-558.

Taylor, M. W., Radax, R., steger, D. and Wagner, M., 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71: 295-347.

Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S. and Swings, J., 1998.*Vibrio* associated with *Penaeuschinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. Aquaculture, 169: 121-132.

Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P. C., Colwell, R. R., Hofle, M. G. and Pruzzo, C., 2012. Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the *Vibrios*. ISME Journal, 6: 21-30.

Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D. G. and Cerrano, C., 2010. *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. Environmental Microbiology, 12: 2007-2019.

Xie, Z. Y., Hu, C. Q., Chen, C., Zhang, L. P. and Ren, C. H., 2005. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. Letters in Applied Microbiology, 41: 202-207.

Zhenyu, X., Shaowen, K., Chaoqun, H., Zhixiong, Z., Shifeng, W. and Yongcan, Z., 2013. First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for Poritesandrewsi white syndrome in the South China Sea. PLoS ONE, 8 (9): e75425.

Zorrilla, I., Morinigo, M. A., Castro, D., Balebona, M. C. and Borrego J. J., 2003. Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain. Journal of Applied Microbiology, 95: 1106-1116.