علل و عوامل ایجاد کننده بیماری آبشش سیاه در میگوهای سفید غربی پرورشی استان بوشهر

محمد خلیل پذیر[1]، علی قوام‌پور[1]، اشکان اژدهاکش‌پور[1]، محمدعلی نظاری[1]، احترام محمدی[1]

dr.pazir@gmail.com

پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.

چکیده:

هدف از انجام این شناسایی علل و عوامل ایجاد کننده بیماری آبشش سیاه در مزارع پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بود. در این مطالعه نمونه‌گیری از میگوهای پرورشی با میانگین وزنی 15-13 گرم در روز 85-80 دوره پرورش انجام شد. بررسی لام مرطوب و مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش میگوهای زنده سالم و مبتلا به آبشش سیاه حاکی از نکروز شدید لاملاهای اولیه و ثانویه به هم ریختگی محور مرکزی لاملاهای آبششی همراه با از هم پاشیدگی و متورم شدن رشته‌های آبششی بود. همچنین در لاملاهای ثانویه علاوه بر چسبندگی رشته‌های آبششی، تجمع سلول‌های خونی در انتهای لاملاها مشاهده شد. نکروز سلول‌های فا اپی‌تلیال با متراکم و تکه تکه شدن هسته سلول‌ها همراه با اتصال انگل تک یاخته اپیستیلیس (Epistylis) از علائم بارز آسیب شناسی آبشش‌ها بود. حضور بالایی انگل تک یاخته اپیستیلیس در بافت آبشش نشان دهنده شرایط مناسب بافت آبششی آسیب دیده برای کلونیزه شده این تک یاخته‌ها بود. همچنین کشت باکتریایی تهیه شده از آبشش میگوهای مبتلا حاکی از جداسازی باکتری جنس ویبریو (*Vibrio* sp.) بود. از سوی دیگر یافته‌های حاصل از کشت قارچی نشاندهنده رشد قارچ جنس آسپرژیلوس (*Aspergillus* sp.) بود. نتایج بررسی‌های انجام شده حاکی از آن بود که به دلیل غیر قابل برگشت پذیر بودن این عوارض بازده تنفسی میگوهای مبتلا به شدت کاهش یافته بود. بنابراین می‌توان اذعان کرد که تک یاخته‌ها می‌توانند به عنوان عامل ثانویه ایجاد کننده بیماری آبشش سیاه، در میگوهای سفید غربی پرورشی مزارع پرورش میگوی استان بوشهر باشند و عامل اولیه ایجاد کننده بیماری، عوامل قارچی و باکتریایی بودند. این در حالی بود که افزایش رسوب فیتوپلانکتون‌های تلف شده و ضایعات ناشی از فولینگ بر روی رشته‌های آبششی به عنوان عامل تشدید کننده بیماری محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: آبشش سیاه، میگوی سفید غربی، انگل تک یاخته اپیستیلیس ، ویبریو، آسپرژیلوس

1-مقدمه:

امروزه بسیاری از پرورش دهندگان میگو به منظور برداشت بیشتر محصول و افزایش تولید در واحد سطح بدون هر گونه تغییر در ساختار استخرهای پرورشی اقدام به پرورش میگو بصورت متراکم (بیش از 30 قطعه در متر مربع) نموده‌اند. این رویکرد با مشکلات عدیده‌ای از جمله کاهش سایز در زمان برداشت، شیوع بیماری‌های واگیردار و کاهش بازماندگی همراه بوده است (مجدی‌نسب، 1377). بیماری آبشش سیاه یکی از مهمترین بیماری‌هایی میگوهای پرورشی می‌باشد. این بیماری در میگوهای خانواده پنائیده بویژه در زمان افزایش تراکم فیتوپلانکتون‌ها در آب، عدم آماده سازی مناسب استخر قبل از ذخیره سازی، وجود مقادیر فراوان خاک سیاه، عدم هوادهی، عدم تعویض منظم آب در طول دوره پرورش، افزایش بار مواد آلی، عدم استفاده از پروبیوتیک مناسب بسیار متداول است. با این وجود عوامل ایجاد کننده این بیماری می‌تواند شامل عوامل قارچی، باکتریایی، انگلی، ملانیزه شدن رشته‌های آبششی و افزایش رسوب فیتوپلانکتون‌های تلف شده و ضایعات ناشی از فولینگ بر روی رشته‌های آبششی باشد (Dewangan *et al.*, 2015). در این بیماری قبل از بروز تلفات در میگوهای آلوده، در اکثر موارد آبشش‌ها در ابتدا بصورت زرد رنگ نمایان خواهند شد در صورت عدم اصلاح شرایط پرورشی رنگ آبشش‌ها بصورت قهوه‌ای رنگ و در نهایت سیاه رنگ در خواهد آمد. در مراحل ابتدایی بیماری با تعویض آب شدید همراه با هوادهی مناسب می‌توان بیماری را درمان نمود (جلالی و برزگر، 1387) (Velmurugan and Ayyaru, 2014). در این تحقیق سعی شد که علل و عوامل ایجاد کننده بیماری آبشش سیاه تشخیص داده شود.

2-مواد و روش:

در این مطالعه بر اساس رنگ آبشش نمونه‌گیری از میگوهای سفید غربی آلوده و سالم با میانگین وزنی 15-13 گرم از استخرهای 1/2 هکتاری مزارع پرورش میگو استان بوشهر در روز 85-80 پرورش در طول ماه‌های مرداد تا شهریور 96 که با تراکم 30 قطعه میگو در هر متر مربع ذخیره سازی شده بودند انجام شد. بعد از جداسازی رشته‌های آبششی توسط اسکالپل استریل و شستشوی آنها با محلول نمکی 0/85 درصد، پس از رنگ آمیزی با رنگ لوگول با بزرگنمایی‌های مختلف توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند (Dewangan *et al.*, 2015). تثبیت رشته‌های آبششی در محلول دیویدسون سرد (4 درجه سانتیگراد) با نسبت 1 به 10 صورت گرفت. در ادامه پس از تهیه مقاطع بافتی با ضخامت 5–3 میکرون و رنگ آمیزی با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین، بررسی آنها . توسط میکروسکوپ نوری (CETI; Triton II) با بزرگنمائی مختلف انجام شد (افشارنسب، 1386).بمنظور کشت باکتریایی و قارچی نمونه‌های اخذ شده از مزارع پرورش میگو به ترتیب از محیط کشت TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar) و SDA (sabouraud dextrose agar) استفاده شد. روش کار بدین صورت بود که پس از استریل نمودن سطح بدن میگو و جداسازی لاملاهای آبششی در زیر هود میکروبی بعد از هموژنیزه نمودن آنها میزان 100 میکرولیتر از محلول هموژنیزه شده را بر روی محیط کشت TCBS کشت داده شد. سپس به مدت 48 ساعت در درجه حرارت 30 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. همچنین کشت قارچی نمونه‌های اخذ شده بدین صورت بود که بعد از استریل نمودن لاملاهای آبششی در زیر هود میکروبی قطعاتی از بافت آبشش بصورت نقطه‌ای بر روی محیط کشت قرار داده شدند، شایان ذکر است که نمونه‌های کشت داده شده در درجه حرارت اتاق (25-22 درجه سانتی‌گراد) به مدت یک هفته جهت رشد نگهداری شدند (افشارنسب، 1386)..

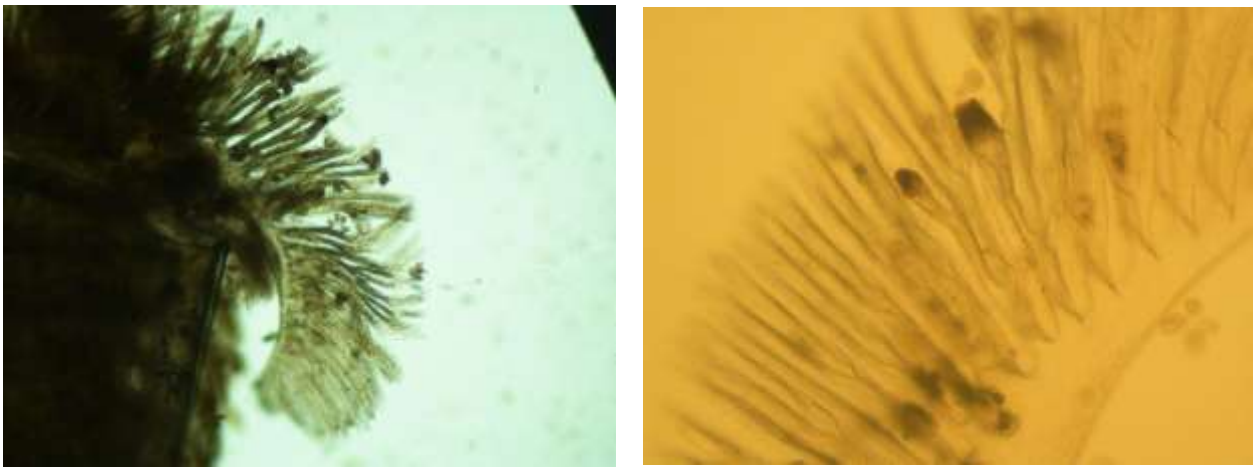
3-نتایج و بحث:

مشاهدات بالینی حاکی از تغییر رنگ آبشش از قهوه‌ای تا سیاه رنگ بود، به گونه‌ای که آبشش برخی از نمونه‌های اخذ شده از استخرها بصورت قهوه‌ای کم رنگ تا پرنگ و برخی دیگر به شدت سیاه رنگ شده بودند. این تغییر رنگ در تمامی نمونه‌ها بصورت دو طرفه مشاهده شد. (شکل 1).

شکل 1: میگوی سفید غربی مبتلا به آبشش قهوه‌ای رنگ و میگوی سفید غربی مبتلا سیاه

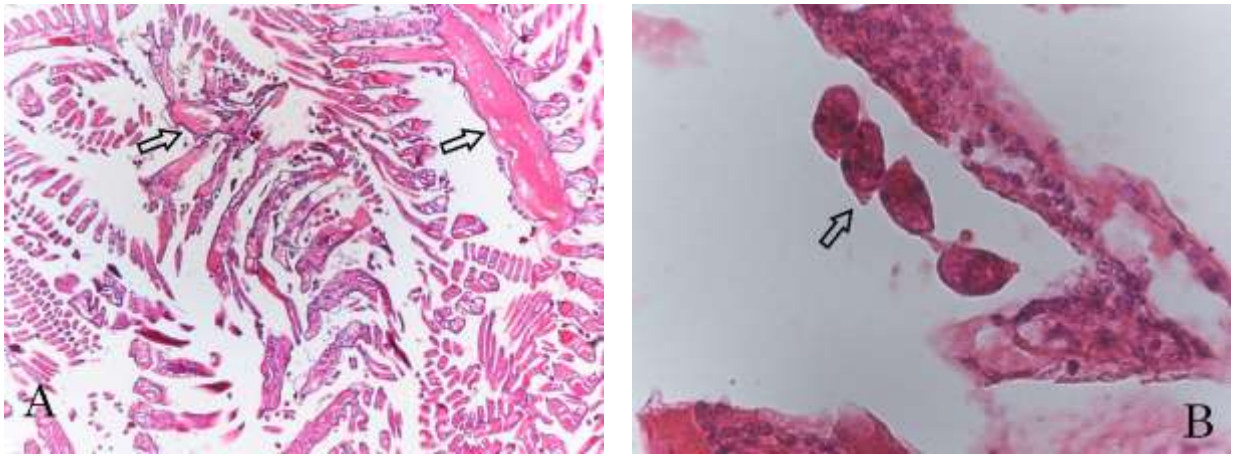
نتایج حاصل از بررسی لام مرطوب آبشش میگوهای مبتلا رنگ آمیزی شده با رنگ لوگول حاکی از نکروز شدید لاملاهای اولیه و ثانویه همراه با بقایای جلبک‌های تک سلولی موجود در استخر و تجمع تک یاخته اپیستیلیس[1] بود (شکل 2).

[1] *Epistylis*



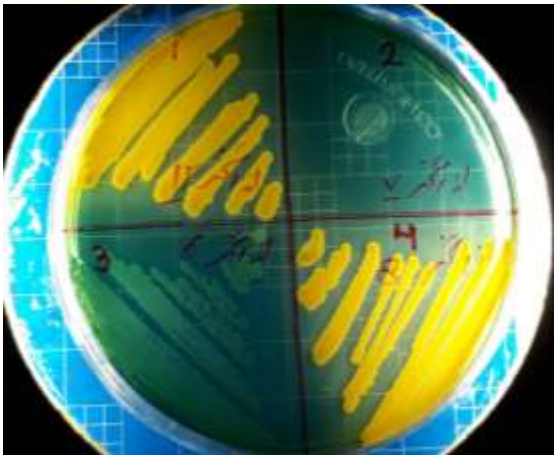
شکل 2: چسبیدن بقایای ریزجلبک‌ها بر روی رشته‌های آبششی (کادر مربع مشکی رنگ) همراه با تجمع تک یاخته‌های اپیستیلیس در نمای لام مرطوب رنگ آمیزی شده با رنگ لوگول (بزرگنمایی × 4). نکروز رشته‌های آبششی (نوک پیکان) در نمای لام مرطوب رنگ آمیزی شده با رنگ لوگول (بزرگنمایی × 10).

یافته‌های مشاهده شد در بررسی مقاطع آسیب شناسی حاکی از به هم ریختگی محور مرکزی لاملاهای آبششی همراه با از هم پاشیدگی و متورم شدن رشته‌های آبششی بود. همچنین در لاملاهای ثانویه علاوه بر چسبندگی رشته‌های آبششی، تجمع سلول‌های خونی در انتهای لاملاها مشاهده شد. از سوی دیگر نکروز سلول‌های اپی‌تلیال با متراکم و تکه تکه شدن هسته سلول‌ها همراه با اتصال انگل‌های تک یاخته همانند اپیستیلیس از علائم بارز آسیب شناسی آبشش‌ها بود (اشکال 3 و **Error! Reference source not found.**).



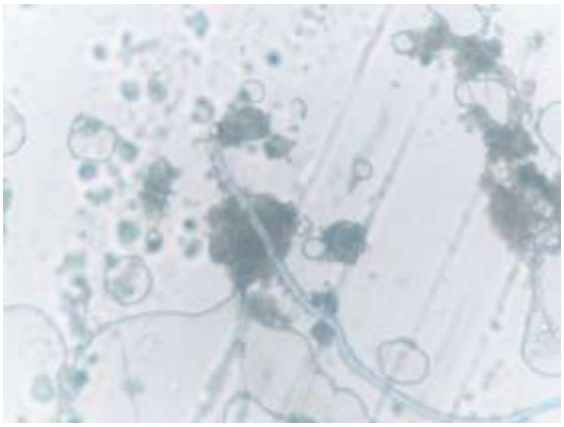
شکل 3: A: به هم ریختگی محور مرکزی رشته‌های اولیه آبششی و جدا شدن رشته‌های ثانویه (نوک پیکان تو مشکی خالی) در نمای لام آسیب شناسی رنگ آمیزی شده با رنگ H&E (بزرگنمایی × 10). B: انگل‌های تک یاخته اپیستیلیس متصل شده به رشته‌های آبششی (پیکان مشکی تو خالی) در نمای لام آسیب شناسی رنگ آمیزی شده با رنگ H&E (بزرگنمایی × 40).

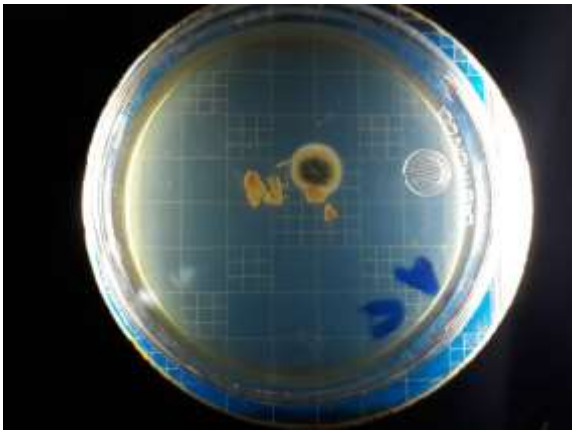
نتایج حاصل از بررسی محیط‌های کشت باکتریایی حاکی از رشد باکتری جنس ویبریو روی محیط کشت TCBS بود (شکل 4).



شکل 4: رشد باکتری ویبریو با کلنی‌های سبز و زرد جدا سازی شده از میگوهای مبتلا به آبشش سیاه بر روی محیط کشت TCBS

رشد کلنی‌های قارچ بر روی محیط کشت SDA حاکی از رشد میسیلیوم‌های حاوی کونیدی‌های قارچ آسپرژیلوس (*Aspergillus* sp) جداسازی شده از میگوهای مبتلا به آبشش سیاه بود (شکل **5**).





شکل 5: رشد کلنی‌های قارچ بر روی محیط کشت SDA همراه با میسیلیوم‌های حاوی کونیدی قارچ آسپرژیلوس رنگ آمیزی شده با رنگ لاکتوفنل بلو

در این مطالعه انگل تک یاخته اپیستیلیس به عنوان عامل ثانویه ایجاد کننده بیماری آبشش سیاه در میگوهای سفید غربی پرورش داده شده در مزارع پرورش میگوی دلوار استان بوشهر شناسایی شد. این در حالی بود که افزایش رسوب فیتوپلانکتون‌های تلف شده و ضایعات ناشی از فولینگ بر روی رشته‌های آبششی به عنوان عامل تشدید کننده بیماری بودند. همچنین مشاهده شد که با افزایش طول دوره پرورش بویژه از روز 80-70 پرورش به بعد به دنبال کاهش کیفیت آب ناشی از افزایش بار مواد آلی کف استخر، تجمع بقایای ریزجلبک‌های تلف شده در ستون آب و رسوب این ذرات بر روی رشته‌های آبششی، رنگ آبشش میگوها در ابتدا قهوه‌ای و با ادامه روند پرورش سیاه رنگ شدند. شایان ذکر است که افزایش رسوبات فوق بر روی رشته‌های آبششی معمولاً با افزایش ترشح موکوس که به عنوان یک پاسخ التهابی شناخته می‌گردد همراه بود که به دنبال آن سهولت در چسبندگی تک یاخته‌های انگی نظیر ورتیسلا و اپیستیلیس انجام شده است. گفتنی است که بدتر شدن شرایط استخر همراه افزایش بار مواد آلی موجود در کف استخر باعث خواهد شد که علاوه بر رشد عامل باکتریایی ویبریو و قارچی آسپرژیلوس بر روی رشته‌های آبششی، اختلال در عملکرد این ارگان و کاهش ظرفیت تنفسی میگوهای مبتلا، به دنبال کاهش اکسیژن محلول در آب استخرهای پرورشی مرگ و میر میگوها به شدت افزایش یابد (Gunalan *et al*., 2014). از این رو تشخیص عامل ایجاد کننده به منظور مدیریت بهداشت و درمان میگوهای پرورشی مهم است.

4-منابع:

1- افشارنسب، م. 1386. روش‌های تشخیص بیماری‌های میگو. وزرات جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. 175 صفحه.

2- جلالی، ب.، برزگر، م. 1387. مدیریت بهداشتی مزارع پرورش میگو. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران: 256 صفحه

3- Dewangan, N.K., Gopalakrishnan, A., Kannan, D., Shettu, N.and Singh, R.R., 2015. Black gill disease of Pacific white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by Aspergillus flavus. Journal of Coastal Life Medicine 3, 761-765.

4- Gunalan, B., Soundarapandian, P., Anand, T., Kotiya, A.S.and Simon, N.T., 2014. Disease occurrence in *Litopenaeus vannamei* shrimp culture systems in different geographical regions of India. International journal of aquaculture 4.

5- Velmurugan, K.and Ayyaru, G., 2014. Original Article Culturable fungal diversity of brown-gill disease in three Penaeus species. Int. J. Res. Mar. Sci 3, 1-4.

Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bushehr, Iran.

Abstract:

The aim of this study was to identify the causes of black gill disease in Litopenaeus vannamei shrimp farms. In this study, sampling was carried out at 85-80 day culture from shrimp with an average weight of 13-15 g. Primary and secondary gill lamella was necrosis, central axis were not arranged and gill lamella swelling, epithelial cell necrosis along with karyorrhexis and pyknosis of gill lamella was observed in wet mouth examination and tissue sections. Also, *Epistylis* protozoan parasite were observed in gill tissue that indicated the condition of damaged gill tissue for colonization of these protozoa. Also, bacterial culture of the gills of the affected shrimp showed the isolation of *Vibrio* sp. On the other hand, the findings from fungal culture indicated the growth of *Aspergillus* sp. Based on the results, it can be admitted that *Epistylis* protozoan parasite can be a secondary cause of black gill disease in *L. vannamei* shrimp farms and the primary cause of the disease was fungal and bacterial agents. Increased sedimentation of phytoplankton and damages of fouling on the gill filaments is as exacerbations.

Key words: Black gill, *Litopenaeus vannamei*, *Epistylis*, *Vibrio*, *Aspergillus*