magiran.com

جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی و قارچی میگوی پا سفید (*Litopenaeus vannamei*) در منطقه چوئبده آبادان

مینا آهنگرزاده[۱]*؛ سیدرضا سیدمرتضایی[۲]؛ حسین هوشمند[۳]؛ محمد افشارنسب[٤]؛ نیاز محمد کر[٥] و لفته محسنی نژاد[٦]

mahangarzadeh@yahoo.com

۱، ۲، ۳ و ٦- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، اهواز صندوق پستی: ٨٦٦-٦١٦٤٥

٤- مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥

٥ - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ٩٦١

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۵　　تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۷

لغات کلیدی: میگوی پاسفید ، باکتری ، قارچ ، آبادان

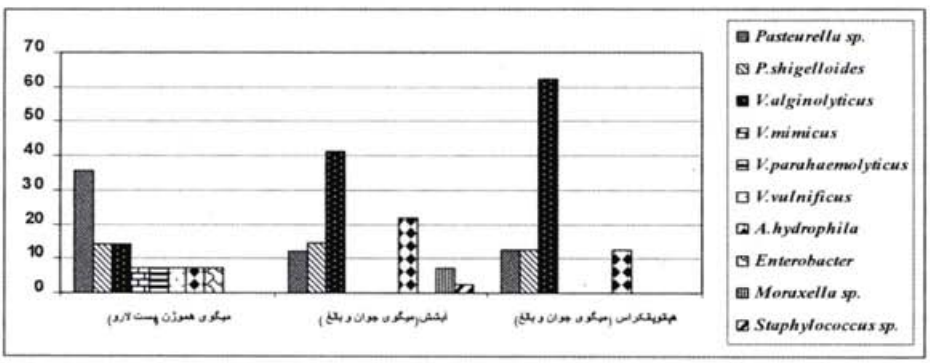
Litopenaeus vannamei از خانواده Penaiaed و جنس *Litopenaeus* است که مخازن اصلی آن کشورهای اکوادور، مکزیک و برزیل می‌باشند (Wyban & Sweeney, 1991). این گونه در سال ۱۹۷۹-۱۹۷۸ بصورت آزمایشی وارد آسیا شد اما از سال ۱۹۹۶ بصورت تجاری به کشورهای چین و تایوان معرفی گردید و بدنبال آن در سالهای ۲۰۰۱-۲۰۰۰ کشورهای ساحلی آسیا نیز شروع به پرورش این گونه نمودند. هم اکنون کشور چین بزرگترین تولید کننده وانامی شده است: در سال ۲۰۰۴، ۵۲ درصد از کل تولیدات تمام کشورهای تولید کننده میگو در آسیا، گونه وانامی بوده است (Briggs *et al.*, 2005). در خصوص معرفی میگوی وانامی به صنعت تکثیر و پرورش کشور، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران در سال ۱۳۸۳ اقدام به ورود این گونه و پرورش آن نمود و نتایج موفقیت‌آمیزی به دنبال داشت و در سال ۱۳۸۵ به منظور احیاء مجدد پرورش میگو در استان خوزستان اقدام به پرورش این گونه در مرکز آموزش و ترویج میگوی شهید کیانی (چوئبده – آبادان) گردید.

هدف از انجام این تحقیق شناسایی فلور باکتریایی و قارچی از مرحله پست لاروی تا زمان صید است که می‌تواند اطلاعاتی را در مورد گونه‌های میکروبی میگوهای سالم در اختیار ما بگذارد و این می‌تواند گامی مؤثر در بهبود صنعت پرورش میگو در ایران باشد. بدین منظور از اوایل تیر ماه سال ۱۳۸۵ لغایت اواخر شهریور ماه ۱۳۸۵ (کل دوره پرورش) بصورت هفتگی و بطور تصادفی از چهار استخر واقع در ایستگاه پرورش میگوی شهید کیانی (چوئبده – آبادان) نمونه‌برداری انجام گردید. از پست لاروهای انتقالی به منطقه قبل و بعد از ذخیره‌سازی، تعداد ۴۸ عدد و در مرحله غذادهی تعداد ۹۶ عدد با حداقل استرس، نمونه‌گیری گردید. سپس نمونه‌ها با حفظ دمای مناسب آب، به صورت زنده، سریعاً به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور منتقل گردیدند. جهت انجام آزمایشات باکتری‌شناسی و قارچ شناسی از میگوی هموژن در مرحله پست لارو (PL17) و بافتهای آبشش و هپاتوپانکراس در میگوهای با وزن بیش از ۲ گرم، از روش تلقیح بر روی محیط کشت باکتری (TSA) حاوی ۱/۵ تا ۲/۵ درصد نمک و محیط قارچ حاوی کلرامفنیکل (SDA+C) همراه نمک استفاده گردید. همچنین جهت تشخیص تفریقی از محیطهای انتخابی مانند TCBS (جهت تشخیص ویبریوها) و جهت تشخیص جنس و گونه باکتریها از تستهای بیوشیمیایی مرسوم استفاده گردید (Buller, 2004). پلت‌های حاوی کشت قارچ روزانه بررسی شده و نحوهٔ رشد و رنگ پرگنه قارچی ثبت گردید. سپس به منظور مشاهده میکروسکوپی نمونه با لاکتو فنل رنگ آمیزی گردید (Murray *et al.*, 1998).

از مجموع ۵۰ نمونه کشت داده شده، ۱۰ گونه باکتری شناسایی گردید که در بین باکتری‌ها، جنس ویبریو و گونه ویبریو آلجینولیتیکوس بالاترین فراوانی را دارا بود (نمودار ۱). همچنین ۳ گونه قارچ نیز جداسازی گردیدند که گونه آسپرژیلوس نایجر بالاترین فراوانی را داشت (شکل ۱).

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com



نمودار ۱ : مقایسه فراوانی (درصد) گونه‌های باکتریایی در اندامهای مختلف میگوی پاسفید

شکل ۱: قارچهای شناسایی شده از اندامهای مختلف میگوی پاسفید (رنگ آمیزی شده با لاکتوفنل بلو)
۱) آسپرژیلوس نایجر (ماکروسکوپی) ۲) فوزاریوم (ریزبینی - بزرگنمایی ۱۰۰x)

مایعات بدن میگو اغلب بوسیله گروهی از باکتریها به نام ویبریو که مهمترین جنس باکتری‌های آب دریا و آبهای لب شور پرورش میگو می‌باشد، آلوده می‌شوند (Lightner, 1993). ویبریوها بعنوان بیشترین فلور مراحل لاروی هستند (Hameed, 1993). زیرا اکثر اینها از میگوهای سالم خانواده پنائیده جدا شده‌اند و فرضیه فرصت طلب بودن آنها بطور گسترده‌ای مطرح است (Vandenberghe *et al.*, 1998 ;Lightner, 1993; Ruangpan & Kitao, 1991).

در مطالعه حاضر از میگوهای سالم ۱۰ گونه باکتریایی جدا گردید که بیشترین آنها از جنس ویبریو و در بین این جنس، گونه آلجینولیتیکوس بالاترین شیوع را داشت که این با تحقیقات انجام شده بر روی ۴ گونه میگو و در ۵ کشور چین، اندونزی، اکوادور، مکزیک و بلژیک مطابقت دارد (Li *et al.*, 2000). همچنین با مطالعه انجام شده بر روی جداسازی باکتری‌ها از وانامی‌های بیمار و تحقیقی که جهت جداسازی ویبریوها از لارو و هچری گونه مونودون (*P. monodon*) در اندونزی انجام گردید مطابقت دارد (Hisbi *et al.*, 2000 ;Yongcan *et al.*, 2003). گونه‌های آلجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس، ولنیفیکوس، هاروئی و دمسلا بعنوان پاتوژن‌های اصلی جنس ویبریو هستند که تحت شرایط مساعد (شرایط استرس‌زا در میگو) می‌توانند میگوهای خانواده پنائیده را تحت تاثیر قرار دهند (Lightner, 1996). در این تحقیق نیز گونه پاراهمولیتیکوس و ولنیفیکوس از میگوی هموژن سالم جدا شدند که این ۲ گونه را از هپاتوپانکراس و عضله میگوی وانامی مبتلا به بیماری بدن قرمز و از مراحل لاروی و پست لاروی وانامی‌های سالم نیز جدا کرده‌اند (Vandenberghe *et al.*, 1999; Yongcan *et al.*, 2003).

magiran.com

در ایـن تحقیـق از هپاتوپـانکراس میگـوی سـالم ویبریـو آلجینولیتیکوس و پلزیوموناس و آئروموناس هیدروفیلا جدا گردید. این باکتری‌ها را از همولنف وانامی‌های بیمار که دارای علائم خـارجی بودند در کلمبیا نیز جدا کرده‌انـد (Cuellar-Anjel *et al.*, 1998). همچنین ویبریو آلجینولیتیکـوس از هپاتوپـانکراس وانـامی‌هـای بـه ظاهر سالم نیز، جدا شده است (Gomez-Gil *et al.*, 1997).

ویبریو آلجینولیتیکوس یک گونه غالب در میگوی هموژن و آبشش و هپاتوپانکراس وانامی‌های سالم بود که با اطلاعات و یافته‌های دیگر محققین مطابقت دارد (Vandenberghe *et al.*, ;Hameed, 1993 1999).

باکتری‌ها بطور معمول نباید در هپاتوپانکراس وجـود داشـته باشـند. بـه ایـن علـت کـه بوسـیله الـک گوارشـی موجـود در هپاتوپـانکراس غربـال مـی‌شـوند (Hapkin & Nott, 1980) و حدس زده می‌شود که این صافی به همراه آنزیمهای گوارشـی از استقرار باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. بنابراین وجود باکتری‌هـا در هپاتوپانکراس ممکـن اسـت بـه علـت اخـتلال در عملکـرد ایـن مکانیزم باشد (Alday–Sanz, 1994). به هر حال ممکـن اسـت که باکتری از طرق دیگر نیز وارد گردد. بطور مثال در وانامی‌های پرورشی ممکن اسـت تغذیـه بـا پلیـت باعـث تخریـب و آسـیب رساندن به الک مذکور شود که در نهایت باعث ورود بـاکتری بـه این اندام گردد. بنابراین نیاز است که رابطه بـین رژیـم غـذایی و تعداد باکتری موجود در این اندام بررسـی گـردد. براسـاس ایـن یافته‌ها حـضور بـاکتری‌هـا لزومـاً نـشاندهندهٔ بیمـاری نیـست و تشخیص باید براساس یافتن تراکم و حجم بـالاًیی از بـاکتری‌هـا باشد (Gomez-Gil *et al.*, 1997). در این تحقیق باکتری‌هـای جنس ویبریو و آئروموناس از آبشش و هپاتوپانکراس جدا شد این باکتری‌ها را بعنوان فلور طبیعـی آب دریـا و سیـستم هچـری در مراحل مختلف میگـوی سـالم معرفـی نمودنـد کـه احتمـالاً در هپاتوپانکراس از طریق خـوراکی توسـط پلـت‌هـای دسـتی وارد می‌شوند و در آبشش نیز بعلت تماس با آب وارد این انـدام شـده است (Singh, 1985).

باکتری مورکسلا که از آبشش میگوی وانـامی سـالم در ایـن مطالعه جدا گردید، را از آب دریـا در سیـستم هچـری و مراحـل مختلف میگو از تخم و ناپلی، جدا کرده‌اند و نشان دادند که ایـن باکتری از تخم به پست لارو افزایش تعداد یافته اسـت (Singh, 1985). پس احتمالاً ایـن بـاکتری نیـز از طریـق تمـاس آب بـا آبشش وارد این اندام شـده اسـت. بـا توجـه بـه نتـایج مـشخص می‌شود که باکتری‌های جدا شده از قـسمتهای مختلـف میگـو در ایـن مطالعه بیشتر بصورت فلور طبیعی بوده و تا زمانی که حالت غیرطبیعـی در میگوها و محیط اطراف بوجود نیامده بیماریزایی ندارند.

از بین این قارچها باید به جنس فوزاریوم توجه خاصی نشان داد. جـنس فوزاریـوم خـصوصاً گونـه فوزاریـوم سـولانی معمـولاً بیماریزای فرصت طلبی است که به بافتهای سطحی آسیب دیده از طریق شکاف روی کوتیکول حمله کرده و با گسترش جراحت، محل صدمه دیده حالت التهابی پیـدا کـرده و بـا ملانیـزه شـدن محل رنـگ سـیاه زخـم بخـوبی آشـکار مـی‌گـردد (Lightner, 1996). فوزاریوم از جراحات آبشش در میگـوی ببـری سـیاه و منودون جدا شده است. میگوهای آلوده علائم مـشخص بیمـاری آبشش سیاه و مرگ و میر را نـشان مـی‌دادنـد (Khoa *et al.*, 2004) اما در این مطالعه علائمی از بیمـاری مـشاهده نـشد کـه شاید مربوط به کیفیت مناسب آب بـوده اسـت. در ایـن تحقیـق هیچگونه علائم ظاهری غیرطبیعی که ناشی از بیماریهای قارچی باشد مشاهده نشد و همه عوامل فرصت طلـب بـوده، ابـتلاء بـه بیماری در اثر این عوامـل بوجـود اسـترس‌هـای وارده بـه میگـو بستگی دارد.

تشکر و قدردانی

از زحمات ریاست محترم مرکز آقای دکتر مرمضی و معاون محترم تحقیقاتی آقای دکتر اسکندری به خاطر توجه ایشان به امر تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از مرحوم مهندس عباسی به خاطر تجربیات ارزنده ایشان و نیز از واحد اطلاعات علمی مرکز سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

سیدمرتـضائی، س. ر.، ۱۳۸۰. بررسـی فلـور قـارچی مراحـل لاروی میگوی سفید هندی در کارگاههای تکثیر استان خوزستان. مجلـه علمی شیلات ایران، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۳۷ تا ۴۳.

Alday-Sanz V., 1994. Studies on the pathogenesis of *Vibrio* spp. infection in *Penaeus monodon Fabricius*. PhD thesis University of Stirling, Scotland.

magiran.com

Briggs M., Funge-smith S., Sabasinghe R. and Philips M., 2005. Introduction and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the pacific. FAO Fisheries Technical paper. 476P.

Buller N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI publishing, 361P.

Cuellar-Anjel J., Brock J.A., Suarez J.A. and Aranguren L., 1998. A survey of the pathogens and disease in penaeid shrimp farmed in Colombia. Book of Abstract, 126P.

Gomez-Gil B., Tronmayen L., Rogue A., Turnbull J.F., Inglis V. and Guerraflores A.L., 1997. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture, Vol. 163, pp.1–9.

Hameed A.S., 1993. A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. Aquaculture, Vol. 117, pp.195–204.

Hisbi D., Vandenberghe J., Robles R., Verdonck L., Swings J. and Sorgeloos P., 2000. Characterisation of *vibrio* and related bacteria associated with shrimp *P. monodon* larvae in Indinesia. Asian Fisheries Science, Vol. 13, pp.57-64.

Hopkin S.P. and Nott J.A., 1980. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* L. with special reference to the B cells in the hepatopancreas. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, Vol. 60, pp.891–907.

Khoa L.V., Hahai K. and Aoki T., 2004. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon Fabricius*, with black gill disease cultured in Vietnam. Journal of Fish Diseases, Vol. 27, No. 9, pp. 507-515.

Li Y., Vandenberghe J., Ji W., Sorgeloos P., Swings J. and Xu H., 2000. Comparison of vibrios isolated from shrimp in different countries. Journal of Fisheries Sciences, China/Zhongguo shuichan Kexue. Vol. 7, No. 4, pp.52-55.

Lightner D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for disease of cultured shrimp. World Aquaculture Society, Baton Regue, Louisiana, USA. pp.112-123.

Lightner D.V., 1993. Diseases of cultured shrimp. In: (ed. P.V. McVey). CRC Handbook of Mariculture. Boca Raton, Fla: CRC Press. pp.393–486.

Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenorer F.C. and Yolken R.H., 1998. Manual of clinical microbiology. Mycology, pp.699-854.

Ruangpan L. and Kitao T., 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon Fabricius*. Journal of Fish Disease, Vol. 14, pp.383–388.

Singh I., 1985. Heterophic bacteria associated with eggs and larvae of *P. indicus* in a hatchery system. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid PRA WNS/shrimps. Iloilo City, Philippines, 4-7 December, 169P.

Vandenberghe J., Verdonck L., Robles–Arozarena R., Gabriel R., Bolland A., Balladares M., Gomez–Gil B., Calderon J., Sorgeloos P. and Swings J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. Applied and Environmental Microbiology, pp.2592–2597.

Vandenberghe J., Li Y., Verdonck L., Li J. and Sorgeloos P., 1998. *Vibriosis* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. Aquaculture, Vol. 169, pp.121–132.

magiran.com

Vandenberghe J., Li Y., Verdonck L., Li J. and Sorgeloos P., 1998. *Vibriosis* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, Vol. 169, pp.121–132.

Wyban J.A. and Sweeney J.N., 1991. Intensive shrimp production technology. High Health Aquaculture Inc, Hawaii. 158P.

Yongcan Z., Ben Z., Xuefen C. and Jiaying Q., 2003. Preliminary studies of the red body disease in *P. vannamei.* Marine sciences/Haiyang Kexue, Vol. 27, No. 5, pp.61-65.

magiran.com

Isolation and identification of bacterial and fungal microflora from *Litopenaeus vannamei* in Choibdeh, Abadan

Ahangarzadeh M. [1]* ; Seyed Mortezaei S.R.[2] ; Houshmand H.[3] ; Afsharnasab M. [4] ; Kor N.M.[5] and Mohseni Nezhad L.[6]

mahangarzadeh@yahoo.com

1,2,3,6 - South Aquaculture Research Center, P.O.Box: 61645-866 Ahwaz, Iran

4- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

5- Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

Received: March 2007 Accepted: November 2008

Keywords: *Litopenaeus vannamei,* Bacteria, Fungi, Abadan, Iran

Abstract

Bacterial and fungal microflora of *Litopenaeus vannamei* cultured in Choibdeh, Abadan was studied. For this purpose, PLs before and after stocking and those shrimps persisting on food tray from June to August, 2006 were taken randomly. Live samples transferred to microbiology laboratory of South Aquaculture Research Center, Ahwaz. Special culture media (e.g. Tryptic Soy Agar + 1.5-2% Nacl & Sabouraud Dextrose Agar + 1.5-2% Nacl) were used for bacterial and fungal culture. We isolated 10 bacterial species of which *Vibrio alginolyticus* (36.92%) had high abundance among bacterial species. We also isolated and identified three fungal species including *Aspergillus niger* (66.66%) *A. fumigatus* (16.66%) and *Fusarium sp.* (16.66%). *A. niger* was predominant among fungal species. All bacterial and fungal species that were identified were opportunistic.

* Corresponding author