بررسی اثر غوطه وری با باکتری های *Vibrio harveyi* و *Vibrio alginolyticus* بر مرگ و میر میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*) و بررسی هیستوپاتولوژی هپاتوپانکراس، روده و هموسیت ها در میگوهای آلوده

رحیم پیغان[۱]، امین بهی[۲*]، عقیل دشتیان نسب[۳]، بابک قائدنیا[۳]، وحید یگانه[۴]

چکیده

ویبریوها باکتریهای محیطهای آبی محسوب می شوند که بصورت گسترده ای در آبهای شیرین، مناطق مصبی و محیطهای دریایی پراکنده شده اند. در این تحقیق تاثیر باکتری های V.harveyi و V.alginolyticus بر روی مرگ و میر پست لاروهای ۷۵ روزه میگوی پا سفید (Litopenaeus vannamei) مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایشات بیماریزایی تجربی به روش غوطه وری ۳۰ دقیقه ای و با غلظتهای ۱۰۸ و۱۰۹ سلول باکتری در میلی لیتر از هر دو باکتری و تحت شرایط نگهداری بدون استرس انجام گرفت. باکتری V.alginolyticus در هیچ یک از غلظت های مورد مطالعه تلفات قابل توجهی را در جمعیت میگوها ایجاد نکرد. باکتری V.harveyi در غلظت ۱۰۹ سلول در میلی لیتر تلفات قابل توجه ۶۱/۹٪ را در جمعیت میگوهای مورد مطالعه ایجاد کرده است که میزان جداسازی باکتری از میگوهای تلف شده ۷۶/۸٪ بوده است. ضایعات میکروسکوپیک ایجاد شده در میگوهای بیمار آلوده به V.harveyi در بافت هپاتوپانکراس شامل نکروز و جدا شدن سلول های پوششی هپاتوپانکراسی، بهم ریختن ساختمان ستاره ای شکل توبول ها، حضور ریزه بافت در توبول ها و در موارد نادر تجمع ملانین در اطراف سلول های نکروز شده بوده است. در بافت روده میگوهای آلوده به V.harveyi در ۲۸٪ موارد نکروز موضعی لایه سلول های پوششی مشاهده گردید. در صد جمعیتی هموسیت های دانه دار بزرگ(LGC) و نیمه دانه دار(SGC) در میگوهای آلوده به V.harveyi کاهش معنی-داری را نسبت به گروه شاهد نشان می دهد در حالی که در صد جمعیتی هموسیتهای بدون دانه کوچک(HC) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داده است ($P\leq ۰/۰۵$). نتایج می تواند به تشخیص هیستوپاتولوژیکی بیماری ویبریوزیس میگو کمک بکند.

واژگان کلیدی : ویبریو هاروی، ویبریو آلجینولیتیکوس ، میگوی پاسفید ، هیستوپاتولوژی

۱- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران اهواز
۲- دانش آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اهواز
۳- عضو هیأت علمی پژوهشکده میگوی ایران، بوشهر، خواجه‌ها
۴- کارشناس بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده میگوی ایران، بوشهر، خواجه‌ها
*- نویسنده مسئول am.behi@gmail.com

مقدمه

عامل مولد بیماری ویبریوزیس در میگو، باکتری-های گرم منفی هستند که به شکل باسیل‌های کمی خمیده و یا مستقیم دیده می‌شوند (۱۷). اکثر گونه‌ها بخوبی در محیطهای آبی، بویژه در محیط های دریایی و مصب‌ها که میزان مواد آلی زیاد است وجود دارند. ویبریوها میکروفلور طبیعی بدن میگو محسوب می-گردند و از عدم سلامت فیزیولوژیکی میگوها که به هر دلیل ممکن اتفاق می افتد استفاده کرده و به صورت عوامل بیماریزای فرصت طلب نمایان می شوند (۱۳). ویبریوزیس تاکنون از مزارع پرورش میگوی زیادی گزارش شده است و در بعضی کشورها مثل تایلند و فلیپین موجب تلفات قابل توجهی در کارگاههای پرورش لاروی و پست لاروی میگوهای *Penaeus monodon* گردیده است (۲٤). در مزارع پرورش میگوی تایلند شیوع آلودگی به ویبریو معمولا در خلال روزهای ۲۱ تا ۷۰ پس از ذخیره سازی پست لاروها به وقوع می پیوندد و معمولا در ٦۸/۹٪ با آلودگی MBV (Monodon Baculovirus) همراه می باشد (۲۰).

توانایی باکتری های جنس ویبریو در آسیب رساندن به میگوها متغیر است و همواره به دلیل اثرات پاتولوژیک متفاوت و حضور عوامل بیماریزای فرصت طلب گوناگون در عفونت های سیستمیک ویبریوزیس تعیین گونه های آسیب رسان ویبریو کاری بسیار مشکل است (۱۷). باکترهای دخیل در بیماری ویبریوزیس در تمامی نقاط جهان با توجه به تنوع گونه ای ویبریوها در شرایط اقلیمی متفاوت و تنوع گونه ای در میگوهای پرورشی متفاوت به نظر می‌رسد. بطور کلی نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که از بین گونه های ویبریو گونه‌های *Vibrio alginolyticus*، *Vibrio anguillarum*، *Vibrio parahaemolyticus*، *Vibrio harveyi*، *Vibrio splendidus* و *Vibrio vulnificus* در ایجاد تلفات در بیماریهای ویبریوزیس موثر می باشند (۱۰).

با توجه اینکه ترشحات خارج سلولی و اگزوتوکسین‌های احتمالی گونه های مختلف ویبریو در اکوسیستم‌های آبی مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت هستند برای تعیین گونه های آسیب رسان و بیماریزا در فلور باکتریایی آب، رسوبات محل زندگی و دستگاه گوارش میگو، نیاز به انجام آزمایشات بیماریزایی می‌باشد. شناسایی سویه های غیر بیماریزای باکتریایی به عنوان کاندیداهای پروبیوتیکی در آبزی پروری و سایر تحقیقات کاربردی امری لازم و ضروری بنظر می‌رسد (۲۷).

بطور کلی هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر دو سویه از باکتریهای *V.harveyi* و *V.alginolyticus* جداسازی شده از مزارع پرورشی میگو در منطقه بوشهر بر روی میزان مرگ و میر میگوهای پرورشی *L.vannamei*، بررسی هیستوپاتولوژیک آلودگیهای تجربی احتمالی ناشی از این باکتری‌ها در اندام های هپاتوپانکراس و روده و تاثیر بیماری‌های احتمالی ایجاد شده توسط این باکتری‌ها برروی درصد جمعیتی انواع مختلف سلول‌های خونی محیطی میگو (هموسیتها) می-باشد که نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در شناخت بهتر پاتوفیزیولوژی این بیماریها در میگو موثر واقع شود.

برخی از مطالعات انجام شده در این زمینه به اختصار شامل بررسی اثر بیماریزایی *Vibrio penaeicida* و *V.harveyi* برروی میگوی *Penaeus monodon* (۱٤)، بررسی اثر باکتریهای *V.harveyi*، *V.parahaemolyticus*، *V.alginolyticus* و *V.penaeicida* بر مرگ و میر مراحل مختلف لاروی میگوی *L.vannamei* (۹) بررسی اثر بیماریزایی و هیستوپاتولوژی باکتری *V.alginolyticus* در میگوی سفید هندی یا *Fenneropenaeus indicus* (۲) بررسی هیستوپاتولوژیک هپاتوپانکراس در ویبریوز تجربی میگوی *P.monodon* با *V.harveyi* (۲۲) بررسی هیستوپاتولوژیک هپاتوپانکراس در ویبریوز تجربی میگوی وانامی با باکتری *V.alginolyticus* (۸) و مطالعه آسیب شناسی روده میگوی *Sicyonia ingentis* در ویبریوز تجربی با باکتری های *V.harveyi* و *V.parahaemolyticus* (۱۹) می باشد.

مواد و روش کار

میگوهای مورد استفاده در این تحقیق از یک جمعیت میگوهای پاسفید که توسط آزمایشات PCR دو مرحله‌ای (Nested PCR) عدم آلودگی آنها به ویروس-ها تائید شده بود انتخاب گردید. وزن میگوهای مورد استفاده در این آزمایشات ۰/۳±۹/۸ گرم و سن آنها پست لارو ۷۵ روزه بود. عمل ذخیره سازی میگوها در آکواریوم های ۱۵۰ لیتری و با حجم آبگیری ٦۰ لیتر انجام شد. دما، شوری و pH مورد استفاده به ترتیب ۱±۲۸ درجه سلسیوس، ۳۵ ppt و ۷/۸ بود. میزان اکسیژن با هوادهی مداوم در حد ۷ ppm نگه داشته شد. غذادهی در ساعات ۹ صبح و ۵ بعد از ظهر توسط غذای فرموله شده میگوی وانامی شماره ٤۰۰۵ هوورواش، و عملیات سیفون کردن آب هر دو روز یکبار انجام گرفت.

منبع تامین باکتری ها و خصوصیات بیوشیمیایی آنها باکتری های مورد استفاده در این تحقیق از آب و رسوبات استخرهای پرورشی میگو در منطقه دلوار توسط بخش میکروبیولوژی پژوهشکده میگو با استفاده از روش لایتنر جداسازی شد (۱۷).

برای کشت انبوه، از کشت خطی باکتری توسط سواپ استریل و بروی محیط کشت جامد TSA با نمک ۲٪ استفاده شد که بعد از کشت، محیطها جهت رشد در دمای ۲۸ درجه و به مدت ۱۸ ساعت (کشت جوان) گرمخانه گذاری شدند. کلنی های باکتری درون آب دریایی استریل با شوری ۳۵ ppt حل شد. برای شمارش باکتری، از روش اسپکتروفتومتری سوسپانسیون باکتری استفاده شد و پس از تخمین تعداد باکتری به صورت سریالی رقیق‌سازی سوسپانسیون صورت گرفت(۲۳).

برای آلوده سازی تجربی از ظرفهایی با حجم سوسپانسیون ۲ لیتر برای هر گروه استفاده شد که شرایط هوادهی مناسب در زمان غوطه وری با سنگ هوای استریل به خوبی برقرار شده بود. پس از انجام عملیات حمام با باکتری، میگوها را با استفاده از ساچوک در آورده و با یکبار شستشو توسط آب دریای ضدعفونی شده آنها را در آکواریومها مستقر کردیم. غلظتهای مورد استفاده برای هر دو باکتری ۱۰۸ و۱۰۹ سلول در میلی لیتر و مدت زمان حمام ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای ارزیابی بیماریزایی دوزهای به کار رفته در مورد هر دو سویه باکتریایی آزمایشی ترتیب داده شد که از گروههای ۲۱ تایی میگو با سه تکرار برای هر دوز استفاده گردید و مرگ و میر میگوها در زمان ١٤ روز پس از آلوده سازی مورد بررسی قرار می گرفت و به منظور تایید بیماری، همولنف میگوهای در حال مرگ بر روی محیط TCBS کشت داده شد (۹).

برای همولنف گیری سرنگ انسولین به میزان ۰/٤ میلی لیتر از ماده ضد انعقادی Alsever (۱۱۵ میلی مول گلوکز، ۳۳٦ میلی مولNaCl ، ۲۷ میلی مول سیترات سدیم و ۹ میلی مول EDTA) با دمای $^{\circ}C$ ۵ پر شد و سپس اقدام به گرفتن همولنف از کنار طناب عصبی شکمی گردید (۱۸). برای شمارش افتراقی هموسیت میگو از روش تهیه گسترش خشک خونی و رنگ آمیزی می- گرانوالد- گیمسا استفاده شد (۱۱). برای شمارش انواع هموسیت میگو با توجه به اندازه و شکل هسته، نسبت هسته به سیتوپلاسم و نوع رنگ بندی سیتوپلاسم سلول ها گسترش های خشک تهیه شده را با بزرگنمایی ۱۰۰۰ بررسی کرده و تعداد حداقل ۲۰۰ سلول از هر لام شمارش گردید (۲٦). ۷ لام از گروه شاهد و ۷ لام از گروه آلوده شمارش گردید.

برای انجام مطالعات آسیب شناسی از روش لایتنر استفاده گردید. برای تهیه مقاطع بافت شناسی به قطر ۵ میکرون از روش تهیه مقاطع بافتی با پارافین و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین استفاده گردید (۵).

مقایسه آماری میانگین شمارش افتراقی جمعیت هموسیت‌ها بین گروه‌های شاهد و آلوده، توسط نرم-افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون T-test انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از عدم بیماریزایی باکتری *V.alginolyticus* در غلظتهای مورد مطالعه باکتری در شرایط نگهداری بدون استرس بوده است، در حالی که در شرایط بدون استرس، باکتری *V.harveyi* در غلظت ۱۰۹ سلول در میلی لیتر ۶۱/۹٪ تلفات را در جمعیت میگوهای مورد مطالعه ایجاد کرده است. درصد مرگ و میر و میزان جداسازی باکتری از همولنف میگوها ایجاد شده توسط دو سوش باکتری *V.harveyi* و *V.alginolyticus* بر روی میگوها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱- درصد مرگ و میر و جداسازی باکتری از همولنف میگوهای تلف شده در گروه های مورد مطالعه پس از آلوده سازی با غلظت های مختلف باکتری.

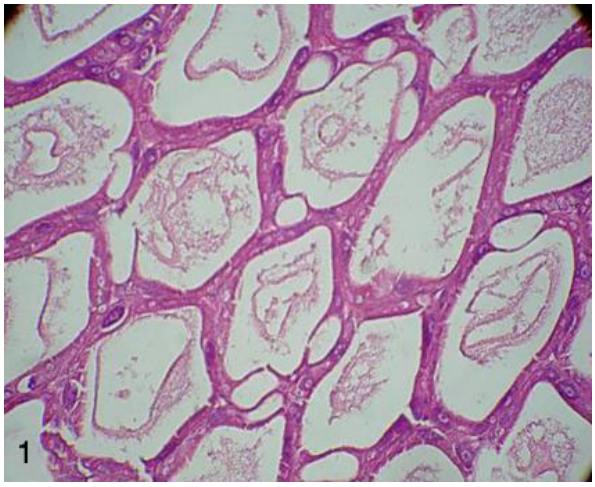
گروه / روز آزمایش	کنترل بدون باکتری	آلوده با 10^8 cell/ml *V.harveyi*	آلوده با 10^8 cell/ml *V.alginolyticus*	آلوده با 10^9 cell/ml *V.harveyi*	آلوده با 10^9 cell/ml *V.alginolyticus*
۱	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۴/۷	۰	۰	۰
۳	۰	۴/۷	۰	۰	۰
۴	۰	۴/۷	۰	۰	۰
۵	۰	۴/۷	۰	۹/۵	۰
۶	۰	۴/۷	۴/۷	۳۳/۳	۰
۷	۰	۴/۷	۴/۷	۳۸	۰
۸	۴/۷	۴/۷	۴/۷	۳۸	۰
۹	۴/۷	۹/۵	۴/۷	۴۷/۶	۰
۱۰	۴/۷	۹/۵	۴/۷	۵۷/۱	۰
۱۱	۴/۷	۹/۵	۴/۷	۶۱/۹	۴/۷
۱۲	۴/۷	۹/۵	۹/۵	۶۱/۹	۴/۷
۱۳	۴/۷	۱۴/۲	۹/۵	۶۱/۹	۴/۷
۱۴	۴/۷	۱۴/۲	۹/۵	۶۱/۹	۴/۷
تلفات تجمعی٪	۴/۷	۱۴/۲	۹/۵	۶۱/۹	۴/۷
جداسازی باکتری از همولنف٪	۰	۰	۰	۷۶/۹	۰

آسیب شناسی هپاتوپانکراس

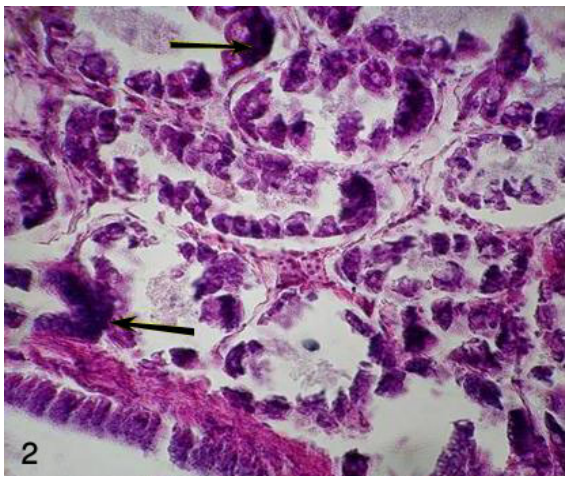
ضایعات ایجاد شده در هپاتوپانکراس شامل: جدا شدن سلولهای اپیتلیال نکروز شده از غشای پایه، گرد شدگی و ایجاد ظاهری گلوله ای شکل در سلولهای نکروز شده و حضور آنها در مرکز توبولها، کمرنگ شدن هسته بعضی از سلولهای نکروز شده و افزایش رنگ پذیری سیتوپلاسم این سلولها نسبت به رنگهای بازوفیلیک، واکوئله شدن برخی از سلولهای اپیتلیال، در موارد نادرتجمع رنگدانه های ملانینی در اطراف برخی از سلولهای نکروز شده، حضور نسبتا فراوان سلولهای هموسیت در سینوسهای هپاتوپانکراسی، وجود ریزه بافتها در فضای لومن توبولها و نهایتا بهم ریختن ساختمان ستاره ای شکل توبولهای هپاتوپانکراسی می-باشد. با توجه به ساختمان نیمه حفظ شده توبولهای هپاتوپانکراسی احتمالا لایه میواپیتلیال (Myoepithelial) کمترین آسیب را دیده است.

آسیب شناسی روده

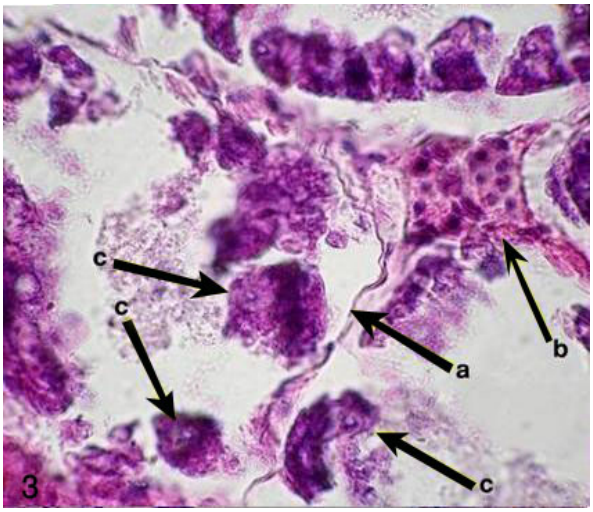
در بررسی آسیب شناسی این عضو در میگوهای بیمار آلوده شده با سویه V.harveyi حداقل ضایعات مشاهده گردید و بجز نکروز کانونی سلولهای اپیتلیال روده در ۲ نمونه (۲۸٪) ضایعه دیگری مشاهده نگردید.



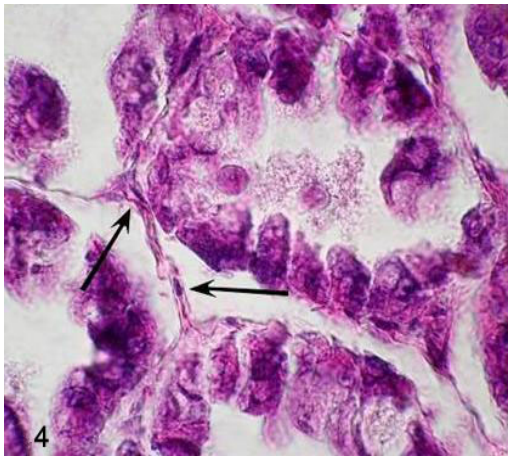
شکل شماره۱- برش عرضی از بافت سالم هپاتوپانکراس. فضای لومن توبول (حفره های لوله ای شکل) هپاتوپانکراسی که غذای خورده شده توسط میگو از معده به این بخش منتقل می شود و مورد هضم آنزیمی و نهایتا جذب قرار می گیرد. بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین.



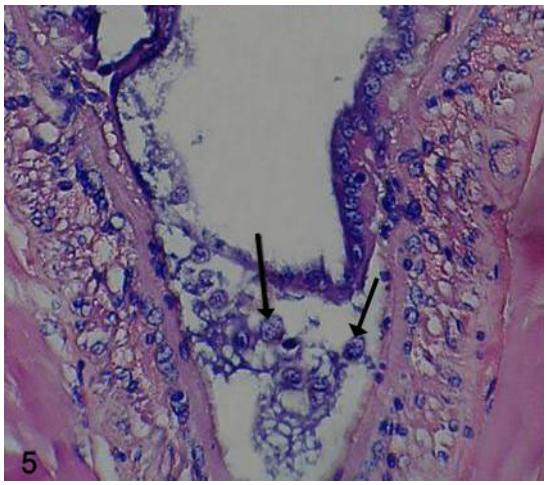
شکل شماره۲- برش عرضی از بافت آلوده هپاتوپانکراس. در این نواحی تجمع ملانین در اطراف سلولهای هپاتوپانکراسی نکروز شده مشاهده می شود (پیکان). به دلیل نکروز سلولهای هپاتوپانکراسی، ساختمان ستاره ای شکل (acinar) توبولها بهم ریخته است. بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین



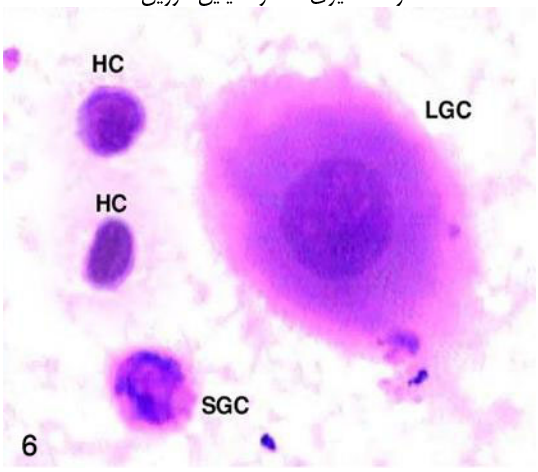
شکل شماره۳- برش عرضی از بافت آلوده هپاتوپانکراس. در این ناحیه لایه غشای پایه مشاهده می شود که سلولهای اپیتلیال هپاتوپانکراسی نکروز شده از سطح آن جدا شده و به ناحیه لومن توبولها رهسپار می شوند (a)، در این ناحیه سینوس هپاتوپانکراسی مشاهده می شود که سلولهای هموسیت فراوانی در آن مشاهده می شود که حاکی از پدیده نفوذ سلولهای هموسیت (haemocyte infiltration) در این ناحیه می باشد (b) ، در این نواحی سلولهای هپاتوپانکراسی نکروز شده مشاهده می شود که از لایه غشای پایه فاصله گرفته اند و هسته آنها کمرنگ شده است که احتمالا به دلیل کاریولیز هسته می باشد. سیتوپلاسم این سلولها رنگ پذیری بازوفیلیک بیشتری را نسبت به سلولهای سالم از خود نشان می دهند (c). بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین.



شکل شماره۴- برش عرضی از بافت آلوده هپاتوپانکراس. در این نواحی هسته‌های کشیده سلولهای لایه میواپیتلیال مشاهده می شود که ظاهری سالم دارند. این لایه در برگیرنده توبولها تا حدودی از آسیب جدی در امان مانده و شکل و ظاهر توبولها را تا حدودی از بهم ریختگی کامل حفظ می کند (پیکان). بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین.



شکل شماره۵- برش عرضی از بافت آلوده روده. در این نواحی سلولهای نکروز شده اپیتلیال روده ظاهری گلوله ای پیدا کرده اند و با فاصله گرفتن از غشای پایه وارد فضای لومن روده شده اند. بزرگنمایی ۱۰۰۰، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین.



شکل شماره۶- سلولهای خونی میگو. در این شکل سلولهای گرانول دار بزرگ با هسته بزرگ گرد و سیتوپلاسم غالب مشاهده می شود (LGC)، سلولهای نیمه دانه دار دارای اندازه کوچکتری نسبت به سلولهای LGC هستند و سیتوپلاسم آنها کمتر می باشد (SGC)، سلولهای بدون گرانول کوچک دارای هسته غالب و سیتوپلاسم ناچیزی می باشند که از لحاظ اندازه کوچکترین سلول محسوب می شود (HC). رنگ آمیزی مای گرانوالد گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰ با زوم ۳x.

پارامترهای سلولی همولنف

نتایج مربوط به پارامتر تغییرات جمعیتی هموسیتها در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین و درصد هموسیت های گرانول دار بزرگ (LGC)، هموسیت های نیمه گرانول دار (SGC) و هموسیت های بدون گرانول (HC) بین گروههای شاهد و آلوده شده با V.harveyi . (P≤0/05) (انحراف معیار± میانگین).

گروه آزمایشی	LGC (سلول/۲۰۰عدد)	SGC (سلول/۲۰۰عدد)	HC (سلول/۲۰۰عدد)
شاهد (بدون باکتری)	[a]۱۰/۱۱±۲/۱۴ ٪۵/۰۵±۱/۰۷	[a]۲۸/۵۵±۷/۲۴ ٪۱۴/۲۷±۳/۶	[b]۱۶۱/۳۳±۶/۷۶ ٪۸۰/۶۶±۳/۳
آلوده به *V.harveyi*	[b]۴/۸۸±۱/۲۶ ٪۲/۴۴±۰/۶	[b]۱۹/۴۴±۳/۲۸ ٪۹/۷۲±۱/۶۴	[a]۱۷۵/۶۶±۳/۰۴ ٪۸۷/۸۳±۱/۵۲

بحث

سویه‌های پاتوژن ویبریو از میگوهای به ظاهر سالم، آب دریا و رسوبات مناطق ساحلی و مصبی جداسازی شده است و با توجه به آبگیری مزارع پرورشی از این مناطق آب مزارع پرورش میگو، رسوبات و میگوهای پرورشی نیز تحت تاثیر این پاتوژن ها قرار می‌گیرند (۲۳).

در مطالعه اخیر، بیماریزایی باکتریهای ویبریوی جداسازی شده از استخرهای پرورشی بر روی پست لاروهای ۷۵ روزه میگوی پاسفید در شرایط بدون استرس مورد بررسی قرار گرفت که باکتری *V.alginolyticus* در هیچ یک از غلظت های ۱۰۸ و ۱۰۹ سلول در میلی لیتر بیماریزا نبوده و این موضوع در حالی است که باکتری *V.harveyi* در غلظت ۱۰۹

سلول در میلی لیتر قادر به ایجاد بیماریزایی و تلفات قابل توجه تا حد ۶۱/۹٪ می باشد.

Lightner، (۱۹۹۸) برای مطمئن شدن از بیماریزایی ویبریوهای غالب جداسازی شده از بیماری ها و بازبینی اصل کخ آزمایشات بیماریزایی را در مورد سویه های متعددی انجام داده است که در بیشتر مواقع تراکم های زیادی از باکتری برای ایجاد مورد نیاز بوده است. امکان ایجاد بیماریزایی توسط تراکمهای زیاد باکتری ویبریو این نظریه را در ذهن محققین بوجود می آورد که باکتری های ویبریو به عنوان پاتوژن های فرصت طلب در ایجاد عفونتهای ثانویه نقش دارند و فقط در میگوهایی که از لحاظ فیزیولوژیکی به خطر افتاده اند ایجاد بیماری می کنند. عواملی که می توانند میگوهای پرورشی را به این بیماری مستعد کنند شامل عوامل عفونی ویروسی، سو تغذیه، مسمومیت با آلاینده ها، نوسانات فیزیکوشیمیایی محیط پرورش، مدیریت ضعیف پرورش و بطور کلی افزایش عوامل استرس زا در شرایط پرورشی می باشد (۱۶).

Le groumellec و همکاران، (۱۹۹۵) نشان دادند که حمام ۲ ساعته میگوهای *L.stylirostris* با تراکم ۱/۳×۱۰۴ سلول در میلی لیتر باکتری *V.penaeicida* باعث ایجاد تلفات ظرف ۵ روز گشته است و بعضی از سویه های *V.harveyi* در تراکم ۱۰۲ سلول در میلی لیتر قادر به شروع تلفات ظرف ۲ روز در میگوی *P.monodon* بوده است که وجود چنین مواردی اجباری بودن این پاتوژن ها را نشان می دهد (۱۴).

Saulnier و همکاران، (۲۰۰۰) بهترین روش بررسی بیماریزایی باکتری های ویبریو را روش حمام کوتاه مدت بین ۱ تا ۲ ساعت می دانند و عنوان می کنند که استاندارد سازی مراحل آزمایشات بیماریزایی به خاطر شرایط محیطی متفاوت، وضعیت باکتری و شرایط متفاوت فیزیولوژیکی میگوهای تحت آزمایش بسیار مشکل است. شدت بیماریزایی باکتری‌های ویبریو در آلوده سازی تجربی تحت تاثیر گونه میگو، سن میگو، وضعیت فیزیولوژیکی میگو، گونه ویبریو، وضعیت باکتری و روش آلوده سازی قرار می گیرد (۲۳).

Guzman و همکاران، (۲۰۰۲) به بررسی بیماریزایی باکتریهای *V.harveyi*، *V.parahaemolyticus*، *V.alginolyticus* و *V.penaeicida* بر روی مراحل ناپلی، زوآ، مایسیس و پست لاروی میگوی *L.vannamei* در دوزهای ۱۰۳، ۱۰۵ و ۱۰۷ سلول در میلی لیتر و به روش غوطه وری ۳۰ دقیقه ای پرداختند. باکتری *V.penaeicida* در دوزهای پائین باعث ایجاد تلفات معنی داری در میگوها شده بود و این در حالی بود که باکتریهای *V.harveyi* و *V.parahaemolyticus* فقط در دوزهای بالا تلفات ایجاد کرده بودند و باکتری *V.alginolyticus* در دوزهای بالا نیز قادر به ایجاد تلفات در جمعیت میگوها نبوده است (۹).

Karunasagar و همکاران، (۱۹۹۴) عنوان کردند که برخی از سویه‌های *V.harveyi* که از آب دریا جداسازی شده اند *LD50* (تراکم باکتری برای تلفات ۵۰٪ میگوها) بالایی برای لاروهای میگوی *P.monodon* دارند در حالیکه سویه هایی که از لاروهای تلف شده در اثر بیماری جداسازی شده اند *LD50* پائینی برای لاروهای *P.monodon* دارند که این نکته بیانگر وجود سویه های مختلف این باکتری با قدرت بیماریزایی متفاوت می باشد (۱۲).

Vandenberghe *و همکاران، (۱۹۹۹) عنوان کردند* که باکتری *V.alginolyticus* غالب ترین گونه جداسازی شده در تمامی مراحل لاروی میگوی *L.vannamei* در منطقه آمریکای جنوبی بوده است. این گونه از بیماری های سندرم زوآ۲، سندرم مولد مایزیس *(Mold mysis syndrome)* و بیماری سندرم بولیتاس جداسازی شده است. معروفترین سویه های پروبیوتیک مورد استفاده در هچری های آمریکای جنوبی نیز این گونه می باشد که این محققین با استفاده از آزمایشات ژنتیکی *AFLP* تنوع ژنتیکی بالایی را در این گونه

نشان دادند که این موضوع بیانگر متفاوت بودن ژنتیک سویه‌های پاتوژن و پروبیوتیک باکتری *V.alginolyticus* می‌باشد (۲۵).

تاکنون هیچ موردی مبنی بر وجود سویه‌های بسیار پاتوژن باکتری‌های ویبریو در کارگاههای تکثیر و پرورش میگو در ایران گزارش نشده است. تمجیدی و همکاران، (۱۳۷۵) در پی بروز بیماری های باکتریایی ویبریوزیس پوسته در میگوهای سفید هندی پرورشی *(F.indicus)* در منطقه قفاس آبادان اقدام به جداسازی باکتری های دخیل در این بیماری‌ها از همولنف و هپاتوپانکراس میگوهای بیمار کردند. نتایج بدست آمده از جداسازی باکتری ها از همولنف شامل ٦٤/٤٪ مورد باکتری *V.harveyi*، ۳۲/۲٪ باکتری *Flavobacterium* و در موارد بسیار نادری باکتری های *Aeromonas sp.* و *V.alginolyticus* بوده است. این محقق بیماریزایی عمده در این بیماری ها را به باکتری *V.harveyi* نسبت داده است (۱). کیسمی و همکاران، ۱۳۸۰ به منظور بررسی آلودگی‌های ویبریو در جمعیت میگوهای سفید هندی *(F.indicus)* و ببری سبز *(Penaeus semisulcatus)* پرورشی در منطقه حله بوشهر موفق به جداسازی ویبریوها از ۳۸۵ نمونه میگو شدند. در بررسی بیماریزایی گونه غالب جداسازی شده *V.parahaemolyticus* در میگوی سفید هندی *(F.indicus)* در شرایط آزمایشگاهی از طریق حمام میگو در سوسپانسیون باکتری و تزریق همولنفی میگو با سوسپانسیون باکتری مرگ و میر میگوها مشاهده گردید(۳).

با توجه به بیماریزا بودن سویه V.harveyi در شرایط بدون استرس در این مطالعه و اجماع نظر سایر محققین مبنی بر پاتوژن بودن این گونه می توان عنوان کرد که حضور این سویه (غیر معمول در فلور میگوهای پرورشی منطقه) در آب سیستمهای تکثیر و پرورش و دستگاه گوارش میگو خطری جدی برای کارگاههای تکثیر و پرورش منطقه در شرایط مدیریتی تنش زا، بخصوص در مراحل لاروی و پست لاروی میگوی L.vannamei محسوب می‌شود.

عباسی و همکاران، (۱۳۷۹) به منظور ارزیابی میزان حدت بیماریزایی باکتری *V.alginolyticus* آزمایشات تولید تجربی بیماری به روش تزریق داخل همولنف را در میگوی سفیدهندی *(F.indicus)* و در شرایط استرس زا (شوری ١٦ *ppt* و دمای ۲۲ درجه) انجام دادند. در این تحقیق دوزهای بالاتر از ۳×۱۰۸ سلول در میلی‌لیتر قادر به ایجاد تلفات در میگوها بوده است (۲).

با توجه به عدم بیماریزایی سویه *V.alginolyticus* در تراکمهای بالای باکتری برای میگوی*L.vannamei* و در شرایط بدون استرس در این مطالعه، گزارش عباسی و همکاران، (۱۳۷۹) مبنی بر بیماریزا بودن این گونه در میگوی *F.indicus* درشرایط استرس زا و سابقه جداسازی این باکتری به همراه سایر گونه های ویبریو از بیماریهای ویبریوزیس در منطقه حله توسط کیسمی و همکاران، (۱۳۸۰) می توان عنوان کرد که این گونه غالب در فلور میگوهای منطقه احتمالا به عنوان یک باکتری فرصت طلب در بیماریهای سیستمیک ویبریوزیس به همراه گونه های پاتوژن تر مثل *V.harveyi* در تشدید اثر ضایعات گونه های پاتوژن ویبریو در بیماری های میگو کمک خواهد کرد و احتمال جداسازی این باکتری به همراه سایر گونه های پاتوژن از میگوهای بیمار وجود دارد.

هپاتوپانکراس در سخت پوستان مشابه کبد در ارگانیسمهای عالی تر میباشد. این اندام همانند کبد نسبت به توکسینها و سایر آلاینده های آب حساس است و بیشترین جراحات در حین مسمومیتها به این اندام وارد می‌شود (٦). در این مطالعه، ضایعات ایجاد شده در هپاتوپانکراس میگوهای آلوده به *V.harveyi* شامل نکروز، گرد شدگی و جدا شدن سلولهای اپیتلیال از غشای پایه، کمرنگ شدن هسته و افزایش رنگ پذیری بازوفیلیک سیتوپلاسم سلولهای گرد شده، ایجاد

ظاهری واکوئله در برخی از سلولهای نکروتیک، تجمع رنگدانه‌های ملانینی در اطراف برخی از سلولهای نکروز شده و حضور نسبتا فراوان هموسیتها در فضاهای سینوسی هپاتوپانکراس بوده است.

Ruangsari و همکاران، (۲۰۰٤) در بررسی هیستوپاتولوژیک هپاتوپانکراس در آلودگی تجربی میگوی *P.monodon* با سویه های سوکروز منفی و مثبت باکتری *V.harveyi* که توانایی تولید همولیزین را داشتند نکروز و جدا شدگی سلولهای اپیتلیوم هپاتوپانکراسی، پرخونی سینوسهای هپاتوپانکراسی و کاهش وسعت فضای لومن توبولها را در مراحل پایانی بیماری مشاهده کردند (۲۲).

Robertson و همکاران، (۱۹۹۸) در پی آلودگی تجربی میگوی *L.vannamei* با یک سویه *V.harveyi* جداسازی شده از بیماریهای سندرم بولیتاس در مطالعات آسیب شناسی نکروز کانونی هپاتوپانکراس و تجمعات ملانینی را در این بافت اثبات کرده است(۲۱).

Diggles و همکاران، (۲۰۰۰) در بیماریهای ویبریوزیس که توسط *V.harveyi* در لاروهای لابستر *Jasus verreauxi* ایجاد شده بود در آزمایشات هیستوپاتولوژیک پوسته پوسته شدن سلولهای نکروز شده اپیتلیال و آتروفی توبولهای هپاتوپانکراسی را گزارش کردند (۷).

روده در سخت پوستان و میگوها با توجه به حضور غشای کیتینی نازک پری تروفیک دارای نقش بسیار کمی در جذب غذا می باشد و بیشتر به عنوان یک معبر برای عبور غذای هضم و جذب شده در هپاتوپانکراس عمل می کند (٤). در مطالعه حاضر تعداد کمی از میگوهای آلوده به باکتری *V.harveyi* نکروز کانونی را در سلولهای اپیتلیال روده نشان می‌دهند و آسیب وارده به این عضو از وسعت کمی برخوردار بوده است.

Ligthner، (۱۹۹٦) در پی بروز بیماریهای سندرم بولیتاس در هچری های اکوادور گلوله ای شدن و واکوئله شدن سلولهای اپیتلیال روده و هپاتوپانکراس را مشاهده کرد که این پدیده را پاسخی به ترشح اگزوتوکسینهای باکتریایی می داند (۱۷). *Martin* و همکاران، (۲۰۰٤) در پی آلودگی تجربی میگوی *Sicyonia ingentis* با دو سویه پاتوژن باکتری *V.harveyi* و *V.parahaemolyticus* در بررسی دقیق هیستوپاتولوژیک روده نکروز و گرد شدگی کانونی سلولهای اپیتلیال روده را مشاهده کردند که نتایج تحقیق حاضر تا حدودی با شواهد این محقق همخوانی دارد(۱۹).

میزان درصد جمعیتی انواع هموسیتهای میگو در مطالعه حاضر در گروه کنترل ۵٪ برای سلولهای گرانول‌دار بزرگ (LGC)، ۱٤/۲۷٪ برای سلولهای نیمه گرانول‌دار (SGC) و ۸۰/٦٦٪ برای سلولهای کوچک بدون گرانول (HC) برآورد شده است. نتایج در صد جمعیتی سلولهای LGC و SGC در میگوهای بیمار آلوده شده به باکتری *V.harveyi* از لحاظ آماری کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داده است و با توجه به کاهش معنی دار درصد این دو نوع سلول سلولهای هموسیت HC افزایش معنی‌داری را نشان داده‌اند.

Le moullac و همکاران، (۱۹۹۷) درصد انواع مختلف سلولهای همولنف میگوی *L.stylirostris* را در مراحل مختلف پوست اندازی اندازه گیری کردند و عنوان کردند که سلولهای HC (سلولهای کوچک با هسته بزرگ) در اکثر مواقع ۸۰٪ جمعیت سلولها را تشکیل می دهند و این در حالی است که در صد سلولهای SGC (سلولهای نیمه دانه دار) از ۱۳-۱۰٪ و سلولهای LGC (سلولهای بزرگ با سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک) از ٤ تا ۱۰٪ کل سلولها متغیر بوده است (۱۵).

با توجه به مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر محققین، کاهش جمعیتی سلولهای هموسیت LGC و *SGC* در میگوهای وانمی بیمار آلوده به سویه باکتری

V.harveyi را احتمالا می توان تا حدود زیادی به تجمعات هموسایتیک عفونی در محل بافتهای ملتهب نسبت داد.

نتایج مطالعه کنونی می تواند در تشخیص پاتولوژیکی بیماریهای ویبریوزیس در شرایط رخداد عفونتهای طبیعی در جمعیت میگوهای پرورشی کاربرد داشته باشد. در پایان با توجه به گستردگی ژنوم گونه-های نمک دوست ویبریو و حمل ژنهای بیماریزا توسط برخی از گونه ها در میگو پیشنهاد می شود با بررسی تایپینگ مولکولی سویه های باکتری جدا شده در مناطق پرورشی راهی برای شناخت عفونتهای باکتریایی ویبریوی میگوهای پرورشی باز نمائیم، چرا که اثبات کارایی روشهای ملکولی نظیر RAPD-PCR برای مطالعه ویبریوز در میگوهای پنائیده و ماهی ها نشانگر قدرت تشخیص بالای روشهای ملکولی در ردیابی اطلاعات اپیدمیولوژیک عفونتهای ویبریویی بوده است.

تشکر و قدردانی

با کمال تشکر و قدردانی از جناب دکتر دشتیان نسب معاون پژوهشی پژوهشکده میگو که در تامین هزینه های مالی این تحقیق کمک فراوانی نمودند و با تقدیر از زحمت بی شائبه آقای یگانه که در تهیه مقاطع بافتی ما را یاری رساندند.

منابع

۱- تمجیدی، ب. اسماعیلی، ف. مزرعاوی، م. جهانشاهی، ع.ا. و کر، م.ن(۱۳۷۵): گزارش نهایی بررسی بیماریهای باکتریایی پوسته و ویبریوزیس در میگوهای پرورشی منطقه آبادان، موسسه تحقیقات شیلات.

۲- عباسی، س. جمشیدیان، م. شریف پور، ع. و رجب زاده، ا(۱۳۷۹): بررسی تجربی بیماریزایی ویبریو آلجینولیتیکوس در میگوهای سفید هندی پرورشی به روش تزریق داخل همولنف. مجموعه مقالات اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان ایران، ۲۵ الی ۲۷ بهمن ۱۳۷۹، اهواز.

۳- کیسمی، م.آ. کاکولکی، ش. شریف پور، ع. و سلطانی، م(۱۳۸۰): بررسی آلودگی زئونوز باکتریهای ویبریو در میگوهای پرورشی منطقه حله استان بوشهر. اولین کنگره سراسری طب و دریا، ۸-۱۰ اسفند ۱۳۸۰، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر.

4- Ahearn, G.A., Duerr, J.M., Zhuang, Z., Brown, R.J., Aslamkhan, A., Killebrew, D.A., (1999): Ion transport processes of crustacean epithelial cells. Physiol Biochem Zool.72(1):1-18.

5- Bell, T.A. and Lightner, D.V., (1988): A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 114 p.

6- Bhavan, P.S and Geraldine, P., (2000): Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn Macrobrachium malcolmsonii exposed to endosulfan. Aquatic Toxicology 50, p: 331–339.

7- Diggles, B. K., Moss, G. A., Carson, J. and Anderson, C. D., (2000): Luminous vibriosis in rock lobster Jasus verreauxi (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by Vibrio harveyi. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS 43, p:127-137.

8- Esteve, M. and C. Herrera, F., (2000): Hepatopancreatic Alterations in Litopenaeus vannamei (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) Experimentally Infected with a Vibrio alginolyticus Strain. Journal of Invertebrate Pathology 76, p:1–5.

9- Guzman, G.A., Juárez, R.V., and Felipe Ascencio, F., (2002): Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (Litopenaeus vannamei) to Four Vibrio Species. Journal of Invertebrate Pathology Volume 78, Issue 4, P: 215-219.

10- Guzman, G.A., Labreuche, Y., Ansquer, D., Espiau, B., Levy, P., Ascencio, F and Saulnier, D., (2003): Proteinaceous exotoxins of shrimp-pathogenic isolates of Vibrio penaeicida and Vibrio nigripulchritudo. Ciencias Marinas, p: 77-88.

11- Houwen, B., (2000): Blood Film Preparation and Staining Procedures. Laboratory Hematology 6:1–7, Carden Jennings Publishing Co., Ltd.

12- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I., (1994): Mass mortality of Penaeus monodon larvae due to antibiotic resistant Vibrio harveyi infection. Aquaculture 128, 203–209.

13- Karunasagar, I., Karunasagar, I. and Umesha, R.K., (2002): Microbial Diseases in Shrimp Aquaculture. Department of Fishery Microbiology,University of Agricultural Sciences, College of Fisheries, Mangalore-575 002, India.

14- Le Groumellec, M., Haffner, P., Martin, B., Martin, C., (1995): Comparative study of bacterial infections responsible for mass mortality in penaeid shrimp hatcheries of the Pacific zone. In: Shariff, M., Arthur, . J.R., Subasinghe (Eds.) , Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 163–173.

15- Le moullac, G., Le groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Peva levy and AQUACOP, (1997): Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp Penaeus stylirostris in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish & Shellfish Immunology, Vol 7, p: 227-234.

16- Lightner, D.V., (1988): Vibrio disease of penaeid shrimp. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. Eds. , Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture Developments in Aquaculture and Fisheries Science vol. 17 Elsevier, Amsterdam, pp. 42–47.

17- Lightner, D.V. (ed.)., (1996): A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

18- Lopez, N., Cuzon, G., Gaxiola, Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual,C., Sanchez, A. and Rosas, C., (2003): Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in Litopenaeus vannamei juveniles. Aquaculture 224, 223–243.

19- Martin, G.G., Rubin, N. and Swanson, E., (2004): Vibrio parahaemolyticus and V.harveyi cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp Sicyonia ingentis. Dis Aquat Org, Vol. 60: 21–29.

20- Nash. G.L., (1990): Penaeus monodon grow out disease (in malysia), Ed by New, M.B.; Sarsam, H.D. and Singh.T. Technical and economic aspects of shrimp farming . pp.172-182.

21- Robertson, P.A.W.; Calderon, J.; Carrera, L.; Stark, J.R.; Zherdmant, M. and Austin, B., (1998): Experimental Vibrio harveyi infections in Penaeus vannamei larvae. Dis Aquat Org 32, p: 151-155.

22- Ruangsri, J., Wannades, M., Wanlem, S., Songnui, A., Arunrat, S., Tanmark, N., Pecharat, J. and Supamattaya, K., (2004): Pathogenesis and virulence of Vibrio harveyi from southern part of Thailand in black tiger shrimp, Penaeus monodon Fabricius. Songklanakarin J. Sci. Technol., 26(1) p: 43-54.

23- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P. and Ansquer, D., (2000): Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191, P: 133–144.

24- Sindermann, C.J. and Lightner, D.V., (1988): Disease diagnosis and control in north American marine aquaculture.Elsevier Science Publishers, second edition, Vol 8, p: 318-323.

25- Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., 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, p: 2592–2597.

26- Van De Braak , C.B.T., Botterblomi, M.H.A., Liu, W., Taverne, N., Van Der Knaap, W.P.W. and Rombout, J.H.W.M., (2002): The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (Penaeus monodon). Fish & Shellfish Immunology 12, 253–272.

27- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W., (2000): Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, December 2000, p. 655-671, Vol. 64, Nu 4.