

شناسایی و حذف انگل خارجی آمیلوآودینیوم اُسلاتوم (*Amyloodinium ocellatum*) در ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) در منطقه چابهار

امیر آرامون^{۱*}، اشکان اژدری^۱، بیژن آژنگ^۱، عبد الغفور چاکری^۱

۱. مرکز تحقیقات شیلاتی آب های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

* نویسنده مسئول: aramoon.haser@gmail.com

چکیده

انگل آمیلوآودینیوم اُسلاتوم، مهمترین و شایعترین انگل دینوفلاژله ماهی می باشد. این انگل خارجی با نفوذ در پوست و آبشش صدمات جدی وارد می کند و باعث خفگی و یا عدم تنظیم اسمزی می گردد و می تواند خطرات جدی برای ماهیان پرورشی دریایی ایجاد نماید. همچنین به خوبی تغییرات شوری و درجه حرارت آب را تحمل کرده و به دلیل غیر اختصاصی بودن در انتخاب میزبان، طیف گسترده ای از ماهیان آب شور و لب شور و ماهیان آکواریومی را به سرعت آلوده می کند. در این تحقیق به تلفات بچه ماهی کفال خاکستری در اثر انگل آمیلوآودینیوم که در کارگاه آبی پروری مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور جهت مولد سازی پرورش می یابند، پرداخته شده است. در بررسی علت تلفات به روش تهیه لام مرطوب از پوست و آبشش، انگل آمیلوآودینیوم اُسلاتوم با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. با کاهش درجه حرارت آب که مصادف با مهرماه در فصل پاییز است، شرایط بروز این انگل فراهم می گردد. جهت درمان تیمارهای دارویی مختلف از جمله حمام بلند مدت آب شیرین، فرمالین ۱۵۰ ppm به مدت ۴۵ دقیقه و حمام کوتاه مدت با استفاده از سولفات مس ۳ mg/l به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. نتایج نشان داد درمان فرمالین و سولفات مس با دوز یاد شده به صورت روزانه بعد از پنج تا هفت روز باعث حذف انگل می شود. هرچند ضدعفونی آب ورودی و جابجایی از یک تانک به تانک دیگر برای حذف تومونت ها ضروری است.

واژگان کلیدی: آمیلوآودینیوم اُسلاتوم، ماهی کفال، انگل خارجی

مقدمه

آمیلوآودینیوزیس^۱ را مترادف بیماری مخملی دریایی^۲ بیماری آودینیوم دریایی^۳ و آودینیوزیس^۴ هم گفته می‌شود. اگر چه این انگل شبیه به عامل بیماری مخملی آب شیرین (*Pilluare piscinoodi*) است ولی این دو انگل خارجی تفاوت‌هایی باهم دارند. نوع دریایی (*A. ocellatum*) کلروپلاست برای تولید مواد مغذی را ندارد بنابراین آودینیوم دریایی ظاهر مخملی را ایجاد نمی‌کند (Levy et al., 2007).

در گذشته تمام فلاژله‌هایی که اندام‌های پوست و آبشش را مورد هجوم قرار می‌دادند در رده *Prasinophyceae* قرار می‌گرفت ولی نتایج تجزیه و تحلیل ژنتیک مولکولی اخیر تغییراتی را در این خصوص ایجاد کرده است به این ترتیب که آمیلوآودینیوم به رده *Dinophyceae* و زیررده *Peridiniphy* منتقل شده و انگل آب شیرین در این گروه در جنس *Piscinodinium* در رده *Dinophycean* و زیر رده *Gymnodiniphycidae* منتقل شده است (Levy, 2007). دینوسپورهای انگل در آب از روش تخصصی و اطمینان بخش به نام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^۵ استفاده کردند. انگل آمیلوآودینیوم اسلاتوم یک تک سلولی تاژکدار (*Dinoflagellates*) بوده که ممکن است همه گیری‌های کشنده در ماهیان دریایی گرمسیری آکواریومی یا ماهیان پرورشی دریایی و لب شور ایجاد کند ولی تلفات سنگین در جمعیت‌های وحشی نادر می‌باشد. این انگل انتشار جهانی دارد (Lom and Dykova, 1992). در ایران چندین گزارش آمیلوآودینیوم اسلاتوم در ماهی آکواریومی آب شور دلک کلاکی وارداتی از آفریقا و همچنین برخی ماهیان دریایی گزارش شده است (اسد زاده منجیلی، ۱۳۹۳؛ ۲۰۲۰؛ et al., Ghanaatian, ۱۳۹۷). مطلوبترین درجه حرارت برای تقسیم تومونت و اسپورزایی ۲۳ تا ۲۷ درجه سانتیگراد بوده اما در درجه حرارت ۱۶ تا

۳۰ درجه سانتیگراد امکان شیوع بیماری وجود دارد (Levy, et al., 2007). آمیلوآودینیوم از شوری ۳ تا ۴۵ گرم در لیتر بیماری‌زایی می‌کنند (Paperna, 1984). بهترین اندام برای بیماری‌زایی آبشش می‌باشد و در صورت آلودگی شدید پوست و چشم‌ها هم درگیر می‌شوند. هرچند که گاهی در آلودگی شدید تومنت‌ها در دستگاه گوارش هم دیده می‌شوند (Brown, 1934). یک تومونت می‌تواند چندین سلول میزبان را از بین ببرد (Noga, 1987). این انگل در آبشش هیپرپلازی^۶، همورژی^۷ و نکروز ایجاد می‌کند و در عرض ۱۲ ساعت مرگ اتفاق می‌افتد (Lawler, 1980).

چرخه انگل شبیه بیماری ایک می‌باشد به این صورت که شکل بالغ روی بدن ماهی تروفونت می‌باشد که از کوتیکول تغذیه می‌کند و اندازه ۵۰ تا ۳۵۰ میکرومتر می‌باشد و سپس آزاد شده و با تقسیمات متعدد به تومونت ۱۲ تا ۹۶ میکرومتر و بعد به دینوسپور هشت تا ۱۵ میکرومتر تبدیل می‌شوند که دارای تاژک هستند و به بدن میزبان می‌چسبند و با تغذیه کردن به تروفونت تبدیل می‌شوند و سپس چرخه دوباره تکرار می‌شود (تصویر ۱). چرخه در شرایط دمایی مناسب ۱۰ تا ۱۴ روز کامل می‌گردد (Noga, 2011). قرنطینه ۲۰ روزه می‌تواند بیماری را کاهش دهد اما نمی‌تواند لزوماً آن را حذف نماید. این بیماری با سولفات مس و کلروکوئین دی فسفات و آب شیرین درمان می‌گردد، همچنین میزان ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی گرم در لیتر فرمالین به مدت شش تا نه ساعت جهت جدا کردن تروفونت از بدن ماهی ذکر گردیده است، اما دوباره بعد از تیمار فرمالین تقسیمات سلولی را دوباره شروع می‌کند. تروفونت و تومونت انگل به مواد شیمیایی مقاوم هستند، در حالی که فقط مرحله دینوسپور حساس به مواد شیمیایی می‌باشد لذا می‌بایست در طی چند روز و مداوم درمان صورت گیرد تا تومونت‌ها و تروفونت‌ها به شکل دینوسپور تبدیل گردند (Paperna, 1984).

⁶ Hyperplasia

⁷ Hemorrhage

¹ Amiloodiniosis

² Velvet Disease Marine

³ Marine Oodinium

⁴ Oodiniuisis

⁵ Reaction Chain Polymerase

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) با وزن متوسط 70 ± 10 گرم جهت پرورش و مولد سازی به مرکز نگه داری آبزیان مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور چابهار منتقل گردید. بعد از قرنطینه و ضد عفونی با فرمالین 200 ppm به مدت ۱۵ دقیقه، با غذای ماهی باس دریایی آسیایی شرکت کیمیا گران به میزان یک درصد وزن بدن غذادهی شدند. چند ماه بعد در آبان ماه تلفات دو تا سه درصدی به صورت روزانه مشاهده گردید. دمای آب ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتیگراد و شوری ۳۰ گرم در لیتر با شوری سنج چشمی ثبت گردید. آبشش و پوست ماهی با لام مرطوب در زیر میکروسکوپ نوری (مدل: Nikon, E200) با عدسی $\times 10$ مورد بررسی قرار گرفت.

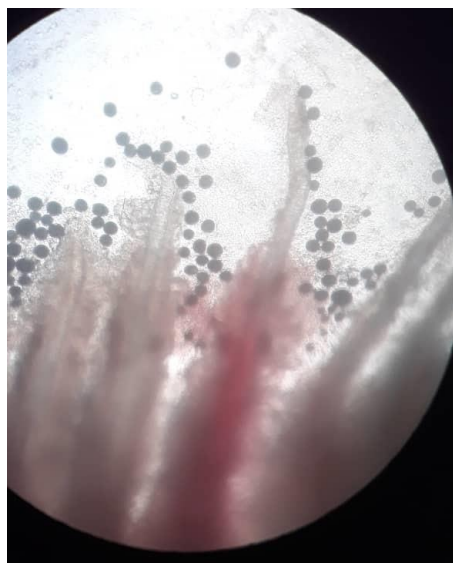
بعد از مشاهده شدن تلفات و بررسی‌های میکروسکوپی و شناسایی انگل، اقدامات درمانی شامل تغییر تانک نگه داری ماهی، حمام بلند مدت آب شیرین و فرمالین 150 ppm به مدت ۴۵ دقیقه و حمام کوتاه مدت سولفات مس 3 mg/l به مدت ۱۵ دقیقه به صورت روزانه صورت گرفت.

ابتدا در یک تانک حمام بلند مدت آب شیرین و فرمالین 200 ppm فقط یک بار به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد که بعد از تعدادی تلفات بررسی‌های میکروسکوپی آسیب روی آبشش مشاهده گردید (شکل ۳). سپس به صورت روزانه از فرمالین 150 ppm به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد. سپس از روش ترکیبی یک روز فرمالین 150 ppm به مدت ۴۵ دقیقه و روز دیگر حمام کوتاه مدت سولفات مس 3 mg/l به مدت ۱۵ دقیقه در آب شیرین استفاده شد و بعد از پنج تا هفت روز بیماری و تلفات برطرف گردید (برای همه تیمارها همزمان با درمان تعویض تانک نیز صورت گرفت).

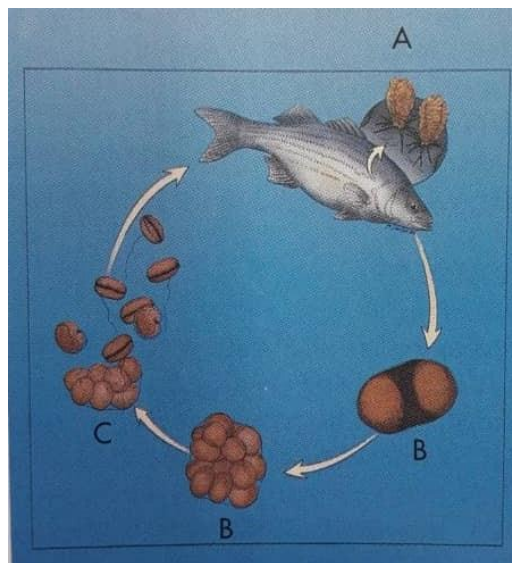
یافته های قابل ترویج

در این پژوهش در ماهی کفال ظاهر مخملی مشاهده نشد اما نشانه‌های انگل شدید آمیلوآدینیو اسلاتوم در آبشش به وضوح مشاهده گردید (شکل ۲) و تورم و خونریزی و هایپرپلازی بعد از تیمار با فرمالین مشاهده شد (شکل ۳)، همچنین تعداد انگل در پوست اندک بود و ضایعات پوستی شامل پتشی^۱ و خونریزی و نکروز مشاهده نگردید و علائم خارجی جز لاغری و بی اشتهاهی مشاهده نشد (شکل ۴)، مگر در تعداد اندک در ناحیه مخرجی که پتشی مشاهده گردید. به نظر می‌رسد مهمترین عامل تلفات هم آسیب بافت آبشش و عدم تبادل اکسیژن و تنظیم اسمزی باشد. چرخه این انگل یک هفته در شرایط مناسب آب طی می‌شود و به دلیل اینکه شکل دینوسپور انگل به مواد شیمیایی حساس است لذا در این آزمایش درمان غیر مداوم با فرمالین 200 ppm در ۴۵ دقیقه باعث شد تا چند روز بعد دوباره تلفات مشاهده گردد، لذا به صورت مداوم و روزانه، استفاده از فرمالین و سولفات مس به مدت بیش از ۵ روز (معمولا بین پنج تا هفت روز) این بیماری درمان گردید و تلفات مشاهده نشد که با مشاهدات Virgula و همکاران (۲۰۱۷) بر روی ماهی خامه ماهی همخوانی دارد. همچنین آهنگرزاده و همکاران (۱۳۹۷) مدت زمان درمان کوتاه مدت با فرمالین برای حذف آمیلوآدینیوم در ماهی صبیتی و باس دریایی آسیایی را پنج روز گزارش کردند. در این پژوهش نشان داد درمان با فرمالین 200 ppm به مدت ۴۵ دقیقه بر روی ماهی کفال آسیب به آبشش وارد می‌شود (تصویر ۳)، مگر اینکه غلظت فرمالین و مدت زمان مواجهه با فرمالین کاهش یابد.

^۱ Petechi



شکل ۲) شکل تومونت انگل خارجی آمیلوآودینیوم آسلاتوم



شکل ۱) چرخه انگل آمیلوآودینیوم، A: تروفونت

B: تومونت، C: دینوسپور. (Noga, 2011)



شکل ۴) ماهی کفال خاکستری آلوده به آمیلوآودینیوم آسلاتوم



شکل ۳) ضایعه‌های آبشش ماهی کفال در اثر آمیلوآودینیوم

و فرمالین

محیط کارگاهی تراکم برای همه گیری انگل بسیار مهم است و دما برای بروز انگل ایده آل گردیده است و همچنین ماهی غذای زنده دریافت نمی‌کند و به میزان غذای کنستانتره یک درصد وزن بدن (که تأثیر روی ایمنی دارد) پسندیده شده است. به نظر می‌رسد قبل از اینکه پوست درگیری شدید داشته باشد ماهی‌ها به خاطر عملکرد آمیلوآودینیوم بر روی آبشش تلف می‌شوند. در این تحقیق نشان داد سولفات مس و آب شیرین و تعویض تانک و استخر و بعد از این‌ها فرمالین راهکارهای مبارزه با این پاتوژن می‌باشند و حتماً می‌بایست به صورت مداوم و بیش از پنج تا هفت روز درمان صورت گیرد. بر اساس نتایج حاضر ماهی کفال میزان پنج میلی گرم بر لیتر سولفات مس را در آب شیرین تحمل نمود. به علت این که ماهی‌های مختلف از نظر تحمل به مواد شیمیایی و اکسیژن متفاوت هستند، تیمار با مواد شیمیایی ابتدا بر روی تعداد اندک ماهی آزمایش شود به خصوص در مورد سولفات مس که میزان آن با شوری و سختی آب تغییر می‌کند و مقدار درمانی آن به میزان غلظت گشندگی ماهی نزدیک است و سپس با تعیین میزان دقیق دوز درمانی دارو، به کل ماهیان تعمیم داده شود. توصیه می‌شود با توجه به اینکه این بیماری به صورت تجربی بعد از خنک شدن هوا در مهرماه و فصل پاییز رخ می‌دهد، قرنطینه و ضدعفونی روزانه تا پنج روز، فیلتر و ضدعفونی آب ورودی و بررسی روزانه استخرها و تانک‌های نگهداری ماهی در اوایل پاییز به خصوص کارگاه‌هایی که مولدین کفال دارند لحاظ گردد.

بر طبق آزمایشات Fajer -Ávila در سال ۲۰۰۳، میزان حمام بلند مدت فرمالین برای ماهیان ۱۰۰ تا ۲۰۰ ppm در مدت شش تا نه ساعت قابل استفاده است. در این آزمایش برای درمان ماهی کفال میزان ۱۵۰ ppm فرمالین در زمان ۴۵ دقیقه استفاده شد. با توجه به آسیب آبششی و تلفات برخی ماهیان کفال به نظر می‌رسد بیشتر از ۲۰۰ و ۴۵ دقیقه مواجهه با فرمالین لحاظ نگردد. ماهی‌هایی که در برابر کمبود اکسیژن مقاوم هستند و یا موکوس زیاد تولید می‌کنند در برابر آمیلوآودینیوم مقاوم تر هستند (Lawler, 1977). Montgomery-Brock و همکاران در سال ۲۰۰۰ از پراکسید هیدروژن ۳۵ درصد برای درمان بچه ماهی کفال (*Mugil cephalus*) استفاده کردند که در آب دریا در یک دوره با پراکسید هیدروژن ۲۵ میلی گرم در لیتر به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد. Noga در سال ۱۹۹۶ و Paperna در سال ۱۹۸۴، بهترین ماده برای حذف آودینیوم را سولفات مس و کلروکوئین دی فسفات و آب شیرین ارزیابی کردند. میزان سولفات مس برای از بین بردن انگل و میزان آن برای مقاومت ماهی به هم نزدیک است به همین دلیل استفاده از سولفات مس بسته به شوری و سختی آب و ماهیان و پاتوژن‌های مختلف، متفاوت است. در این آزمایش نیز از سولفات مس و آب شیرین و فرمالین استفاده شد که بهترین راهکار برای جلوگیری از تلفات، درمان با سولفات مس و آب شیرین بود، هرچند که فرمالین هم در روند درمان تأثیر گذار بود. نکته حائز اهمیت ماهی کفال این است که این ماهی یوری هالین است و دامنه تغییرات شوری زیادی را تحمل می‌کند و در مواجهه با انگل‌های خارجی آب شور بلافاصله به آب شیرین مقاومت دارد اما انگل‌های خارجی اغلب به آب شیرین حساس هستند، به همین علت سیر درمان را آسان تر می‌نماید.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد شرایط محصور کارگاهی مانند تراکم، دما، مواد آلی، استرس و تغذیه ناکافی شرایط مناسبی برای بیماری‌ها و عاملی برای ظهور پاتوژن‌ها می‌باشد. زیرا در

فهرست منابع

- اسد زاده منجیلی، علی. ۱۳۹۳. انگل آمیلوآودینیوم آسلاتوم در ماهی آکواریومی دلک کلازکی آلاری آب شور، نشریه دامپزشکی مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۱۰۷، ۷۶-۷۷
- آهنگرزاده، مینا، هوشمند حسین، سید مرتضایی سید رضا، طرفی منصور. ۱۳۹۷. شناسایی انگل آمیلوآودینیوم آسلاتوم در ماهی صبیتی و AOADC02_136 سی باس پرورشی در استان خوزستان. دومین همایش ملی آبی پروری دریایی و محیط‌های محصور، کد
- Brown, E. M. (1934, September). On *Oodinium ocellatum* Brown, a paxasitic dinoflagellate causing epidemic disease in Marine Fish. In Proceedings of the Zoological Society of London (Vol. 104, No. 3, pp. 583-607). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Fajer-Ávila, E. J., Abdo-de la Parra, I., Aguilar-Zarate, G., Contreras-Arce, R., Zaldívar-Ramírez, J., & Betancourt-Lozano, M. (2003). Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*, 223(1-4), 41-50.
- Ghanaatian H. Ajdari A. Gharache M. And Bozorgpanah SH. 2020. Treatment of Marine Fish Broodstocks Involved with *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) Ectoparasite. 4th International Congress on Fisheries and Aquatic Research, Tehran, Iran. 62 november 2020.
- Lawler A. R., 1980. Studies on *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellata) in Mississippi Sound: natural and experimental hosts. *Gulf and Caribbean Research*, 6(4), 403-413.
- Lawler A. R., 1977. Dinoflagellate (*Amyloodinium*) infestation of pompano. *Dinoflagellate (Amyloodinium) infestation of pompano*. 257-264.
- Levy, M. G., Litaker, R. W., Goldstein, R. J., Dykstra, M. J., Vandersea, M. W., & Noga, E. J. (2007). Piscinoodinium, a fish-ectoparasitic dinoflagellate, is a member of the class Dinophyceae, subclass Gymnodiniophycidae: convergent evolution with *Amyloodinium*. *Journal of Parasitology*, 93(5), 1006-1015.
- Lom, J. and Dykova, I., 1992. Protozoan parasites of fishes. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, (Elsevier, Amsterdam), 26, 315 pp.
- Noga E.J. 1987. Propagation in cell culture of the dinoflagellate *Amyloodinium*, an ectoparasite of marine fishes. *Science*, 236(4806), 1302-1304.
- Noga E.J. 2011. Fish disease diagnosis and treatment. *Marin velvet disease*, 2nd edition. Pp 105.
- Montgomery-Brock, D., J.Y. Sylvester, C.S. Tamaru, and J. Brock. 2000. Hydrogen peroxide treatment for *Amyloodinium* sp. on mullet (*Mugil cephalus*) fry. *Center for Tropical and Sub Tropical Aquaculture, Aqua Tips Regional Notes*, 11(4),4-6.
- Paperna I. 1984. Chemical control of *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) (Dinoflagellida) infections: in vitro tests and treatment trials with infected fishes. *Aquaculture*, 38(1), 1-18.
- Virgula, J. C., Cruz-Lacierda, E. R., Estante, E. G., & Corre Jr, V. L. (2017). Copper sulfate as treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida) on milkfish (*Chanos chanos*) fry. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 10(2), 365-371.

Identification and removal of ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* in *Mugil cephalus* in Chabahar region

Amir Aramoon^{*1}, Ashkan Ajdari¹, Bijan Azhang¹, Abdolqhafour Chakeri¹

1. Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran

*Corresponding author: aramoon.haser@gmail.com

Abstract

Amyloodinium ocellatum parasite is the most important and common dinoflagellate parasite of fish. This ectoparasite penetrates the skin and gills and can cause serious damage, suffocation or non-osmoregulation in marine fishes. It also tolerates salinity and water temperature changes well and, due to its nonspecific host, quickly infects a lot of brackish and saltwater and aquarium fishes. This research deals with the mortality of gray mullet juveniles caused by the *Amyloodinium* parasite, which are cultured in the aquaculture workshop of the Offshore Fisheries Research Center for breeding. *Amyloodinium ocellatum* parasite was observed by light microscopy and wet smear from skin and gills to investigate the cause of mortality. By the decrease in water temperature, coinciding with October in autumn, the conditions are provided for the occurrence of this parasite. A long-term bath of fresh water and formalin 150 ppm for 45 minutes and a short-term bath of copper sulfate 3 mg/l for 15 minutes daily after five to seven days can remove the parasite. However, inlet water disinfection and exchange tanks are necessary to remove tomonts.

Keywords: *Amyloodinium ocellatum*, Mullet, Ectoparasite