المجلة العراقية للأستزراع المائي المجلد (12) العدد (2) – 2015: 19-28

عزل وتسجيل 7 انواع من الفطريات المصاحبة للروبيان النهري الشرقي *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) من احواض تربية الاسماك في موقع كرمة علي – البصرة / العراق

هدى كاظم احمد و سناء قاسم بدر*

قسم الاحياء البحرية/مركز علوم البحار/جامعة البصرة

*قسم التطور الاحيائي في شط العرب وشمال الخليج العربي / مركز علوم البحار/جامعة البصرة

Email: hudamcs@yahoo.com

الخلاصة

اجريت الدراسة على الروبيان النهري الشرقي *Macrobrachium nipponense* المربى في الاحواض الطينية الخاصة بتربية الاسماك في موقع كرمة علي للفترة من اذار الى نيسان 2013 . استخدمت اربع طرق مختلفة لعزل الفطريات من الروبيان وشخصت 7 انواع فطرية هي *Aspergillus flavus* و*A.niger* و*Aspergillus* sp. و *A.terreus* و*Alternaria* sp. و*Penicillium notatum* و *P. chrysogenum* تابعة لثلاثة اجناس مهمة من الفطريات وهي *Aspergillus* و *Alternaria* و *Penicillium*.

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين عدد عزلات الفطريات المشخصة لكل نوع في طرق العزل المختلفة وكانت طريقة الغسل هي الافضل مقارنة بالطرق الاخرى،كما وجد فروق معنوية في عدد العزلات لكل نوع من الفطريات بين شهر آذار وشهر نيسان . اكدت الدراسة على ان وجود الفطريات المرضية من الجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* لها تأثير كبير على اصابة الروبيان بالامراض الفطرية وخاصة عندما تكون ظروف الاستزراع غير ملائمة.

كلمات مفتاحية: فطريات الروبيان، الروبيان النهري الشرقي، *Macrobrachium nipponense*

مقدمة

ينتمي الروبيان *Macrobrachium nipponense* الى العائلة البالمونية Palaemonidae من مجموعة الروبيان الكاريدي Caridean وهو نوع دخيل على بيئة المياه الداخلية العراقية حيث سجل وجوده في العراق لأول مرة في شط العرب (منطقة كرمة علي) من قبل Salman وجماعته في عام 2006 . يعيش في بيئة المياه العذبة الاستوائية ويفضل غالبا التواجد في المياه العكرة (FAO, 2012)، لذا يسمى بروبيان

المياه العذبة ويطلق عليه تجاريا تسمية الروبيان النهري الشرقي. تعد انواع هذا الجنس ذات قيمة اقتصادية متميزة في بعض دول شرق اسيا ومنها الصين، اذ يتميز بقدرته على تحمل مدى واسع من الظروف البيئية المختلفة لذلك يربى ويستزرع في انظمة بيئية متعددة للحصول على انتاج تجاري عالي الجودة قد يصل الى 200000 طن سنويا حسب احصائيات منظمة الفاو لعام 2002 (FAO, 2012).

ان ظروف الاستزراع عادة ما يرافقها مشاكل رئيسية تؤثر على انتاجية المحصول وتتمثل هذه الظروف بالإصابة بالأمراض الفيروسية او البكتيرية والفطرية ولابد من اتخاذ الاجراءات التي تكافح هذه الامراض والتي يؤدي استفحالها الى خسائر اقتصادية كبيرة. وعلى سبيل المثال تسببت انواع الفطريات من جنس *Furarium* بمرض الخياشيم الأسود للروبيان *Penaeus japonicus* في اليابان (Ishikawa, 1968)، جراد البحر *Homarus americanus* في الولايات المتحدة الأمريكية (Lightner & Fontaine, 1975) والروبيان النمر *Penaeus monodon* في فيتنام (Khoa *et al*., 2004)

ان استزراع الروبيان وتكثيره في العراق لازال في مرحلة الدراسات والتجارب المختبرية الناجحة والتي اجريت بشكل خاص في مركز علوم البحار/جامعة البصرة كتلك التي اجريت على الروبيان الشحامي *Metapenaeus affinis* (المالكي، 2009) والروبيان *Penaeus Vannamei* (غازي، 2013) والروبيان النهري *Macrobrachium nipponense* (المالكي، 2015). تعد دراسة امراض الروبيان حديثة في العراق وتقتصر على دراسة (Jassim, 2013) الذي درس الاصابات الفيروسية للأسماك والروبيان ,لذا تهدف هذه الدراسة وهي الاولى الى معرفة انواع الفطريات المصاحبة للروبيان الحي في بيئة الاحواض الطينية التابعة لمركز علوم البحار.

مواد وطرق العمل

1- عينات الروبيان

تم جمع 80 روبيانه من احواض مركز علوم البحار / جامعة البصرة خلال شهري اذار ونيسان من العام 2013 في اكياس بلاستيكية حاوية على ماء من الحوض نفسه لحين وصولها الى المختبر ووضعها في احواض التجربة سعة 15 لتر، مزودة بجهاز التهوية.

2- الزرع الجرثومي

استنادا للمصادر المتخصصة (Barnett *et al*., 2000 ; Carmichael *et al*., 1980) اجريت تجربة الزرع الجرثومي باستخدام 40 روبيانه لكل شهر، تراوحت اطوالها بين 2.8– 3سم، وقيم اوزان تراوحت بين 0.29 - 0.34 غم. كانت طرق الزرع على اربعة انواع كما مبين في ادناه باستخدام الوسط الزرعي PDA وذلك للتأكد من نتائج وجود الفطريات المصاحبة للروبيان.

أ- الغسل

غسلت 10 افراد من الروبيان بوضعها في قناني زجاجية معقمة سعة 500 مل حاوية على 50 مل من الماء المقطر المعقم وبعد وضع الروبيان فيها اجريت عملية هز سريعة لمدة ربع ساعة بواسطة جهاز الهزاز المغناطيسي ومن بعدها يتم اخذ 1 مل من ماء الغسل ووضعه في اطباق زرع معقمة بلاستيكية سعة 9 سم ومن ثم صب الوسط الزرعي PDA المعقم بدرجة حرارة 45 م بمقدار 25 مل وبواقع ثلاث مكررات ومن ثم تركه ليتصلب ثم يحضن بدرجة 25 م لمدة 3 – 7 يوم.

ب- التجفيف

تم تجفيف 10 افراد من الروبيان في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 45 °م في اطباق زجاجية معقمة لمدة 48 ساعة ومن بعدها تطحن العينات بواسطة مطحنة كهربائية بعد تعقيمها بالكحول بتركيز 70 % وتركه يجف ثم يصبح جاهز للطحن وبعدها اخذ من المسحوق الروبياني الذي بلغ وزنه 1,4 غم مقدار 0,2 غم ووضعه في ثلاث اطباق زرع بلاستيكية معقمة ومن ثم صب الوسط الزرعي عليه كما في طريقة الغسل سابقا .

ت- التجميد

جرى تجميد 10 افراد من الروبيان في مجمدة الثلاجة بدرجة حرارة (−17) لمدة 24 ساعة ومن ثم يعصر الروبيان المجمد بالخلاط والذي جرى تعقيمه مسبقا ومن ثم اخذ مقدار 0,2 غم من العصير الروبياني الذي بلغ وزنه 2,4 غم وزرع في الوسط كما بين في الطريقتين السابقتين.

ث- المعاملة بالملح NaCl بتركيز 5%

وضعت 10 افراد من الروبيان في محلول ملحي ذو تركيز 5% لمدة خمس دقائق وتكرار العملية ثلاث مرات ومن ثم ينقل الروبيان في قنينة زجاجية معقمة سعة 500 مل تحتوي 50 مل ماء مقطر معقم مع اجراء عملية الغسل بالهز كما ذكر في طريقة الغسل وزرع ماء الغسل كما في طريقة الغسل اعلاه.

3- التحليل الاحصائي

تم تحليل بيانات البحث احصائيا بأستخدام برنامج Spss باختبار التباين واختبار t تحت مستوى دقة (0.01 =P).

النتائج

من خلال استخدام اربع طرق مختلفة لعزل الفطريات بينت نتائج الدراسة في الجدولين 1 و2 الحصول على عدد من العزلات التي تضمنت مستعمرات 7 انواع من الفطريات تابعة الى 3 اجناس شائعة في البيئة المائية خلال اذار ونيسان 2013. اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين الطرق المستخدمة في العزل وبين عدد الانواع الفطرية المعزولة من الروبيان *M. nipponens*, وايضا وجود فرق معنوي بين شهري اذار

و نيسان 2013، حيث لوحظ ان في شهر آذار ان الفطر *A. niger* سجل اعلى فرق معنوي حيث بلغ 6.83، بينما سجل الفطر *P. chrysogenum* اقل فرق معنوي بلغ 1.50، كما في الشكل (1).

جدول (1): عدد مستعمرات انواع الفطريات في الروبيان *M. nipponens* خلال شهر آذار 2013 باستخدام اربع طرق عزل مختلفة

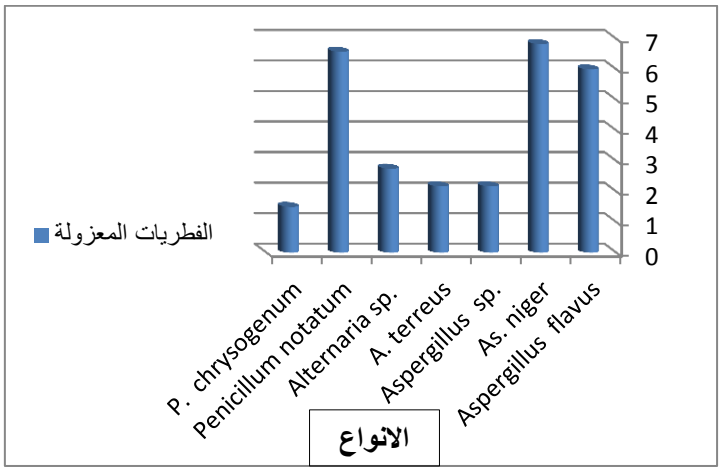
عدد مستعمرات الانواع الفطرية	الغسل *			التجفيف			التجميد			المعاملة بالملح		
Aspergillus flavus	15	16	16	10	12	11	6	5	5	2	1	1
A.niger	20	18	19	14	15	15	3	3	4	1	1	2
A spergillus sp.	6	7	5	5	6	4	1	2	1	0	0	1
A.terrus	4	3	4	4	3	5	2	3	3	0	0	0
Alternaria sp.	8	9	9	6	8	9	3	4	2	1	0	0
Penicillium notatum	20	21	19	17	15	16	7	9	8	3	2	1
P. chrysogenum	13	14	11	16	12	10	7	8	6	1	0	1

*مستوى معنوية 0.01

جدول (2): عدد مستعمرات انواع الفطريات في الروبيان *M. nipponens* خلال شهر نيسان 2013 باستخدام اربع طرق عزل مختلفة

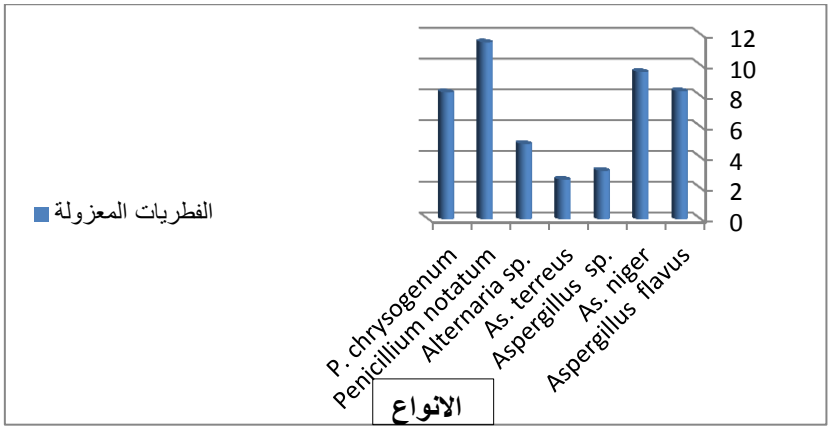
*مستوى معنوية 0.01

عدد مستعمرات الانواع الفطرية	الغسل *			التجفيف			التجميد			المعاملة بالملح		
Aspergillus flavus	12	15	11	8	7	7	4	3	4	1	0	0
A.niger	13	16	12	11	12	12	1	2	1	1	1	0
Aspergillus sp.	3	2	5	4	1	2	2	3	3	0	0	1
A.terrus	2	4	4	5	4	3	1	1	2	0	0	0
Alternaria sp.	7	6	8	1	3	4	1	2	1	0	0	0
Penicillium natatum	10	13	12	9	11	12	2	4	2	2	1	1
P. chrysogenum	2	2	1	4	3	4	1	1	0	0	0	0



شكل (1) : عدد مستعمرات الفطريات المشخصة والمعزولة من الروبيان *M. nipponense* خلال شهر اذار 2013

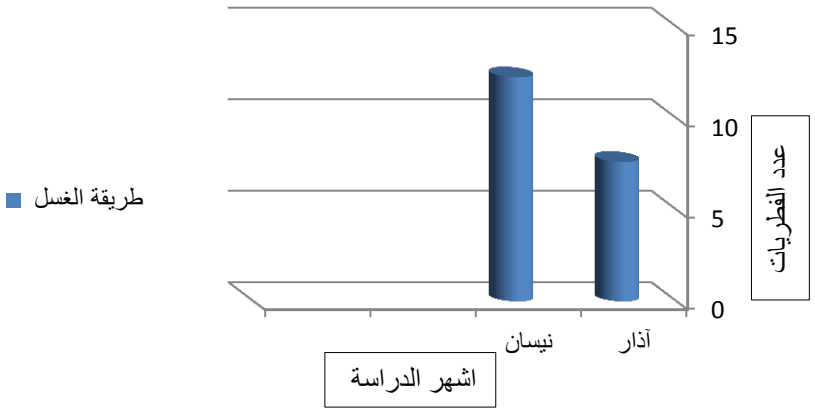
ونلاحظ في الشكل (2) بأن الفطر *P. notatum* سجل اعلى فرق معنوي وبلغ 11.50 بينما سجل فطر *A. terreus* اقل فرق معنوي بلغ 2.58 في نتائج شهر نيسان.



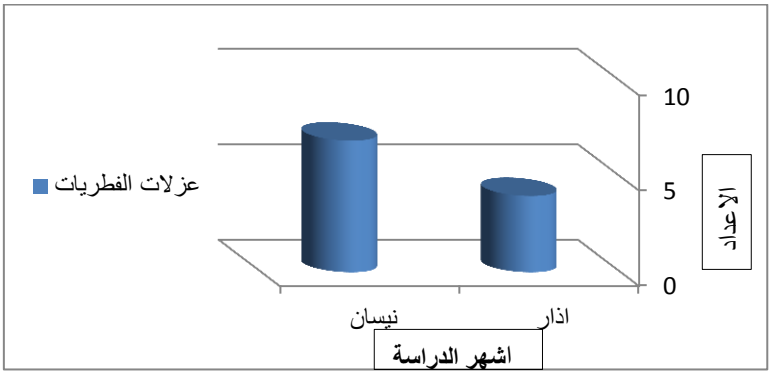
شكل (2): عدد مستعمرات الفطريات المشخصة والمعزولة من الروبيان *M. nipponense* خلال شهر نيسان 2013

وقد لوحظ بان افضل الطرق لعزل الفطريات من الروبيان وقد اعطت اعلى فرق معنوي هي طريقة الغسل وبلغ 7.62 لشهر اذار و 12.24 لشهر نيسان كما في الشكل (3).

وكما اظهر اختبار t بوجود فرق معنوي في عدد عزلات الفطريات الموجودة على الروبيان ،في الشكل (4) بلغت الاعداد في شهر نيسان (6.9) وهي اعلى مما سجلت في شهر اذار (4).



شكل (3): مقارنة بين شهري آذار ونيسان 2013 باستخدام طريقة الغسل لعد الفطريات المعزولة من الروبيان *M .nipponens* .



شكل (4): اعداد مستعمرات انواع الفطريات المعزولة من الروبيان *M. nipponens* بين شهر اذار ونيسان 2013.

المناقشة

اظهرت نتائج البحث تسجيل 7 انواع من الفطريات تابعة لثلاثة اجناس هي *Alternari* و *Aspergillus* و *Penecillium* المصاحبة للروبيان النهري الشرقي *M. nipponens* في بيئة احواض الاسماك الطينية وهذه الفطريات شائعة التواجد في التنوع الحياتي للبيئة المائية. وقد ذكر Sliva وجماعته (2010) تسجيل الاجناس *Furarium* و *Aspergillus* و *Penecillium*, باعتبارها الاكثر سيادة ضمن20 جنس من الفطريات في مزرعة الروبيان *Litopenaeus vannamei* في البرازيل.

ان البحوث المتعلقة بعزل الفطريات من الروبيان_المستزرع محدودة عالميا وتقتصر على دراسات Calorni, 1989; Khoa *et al*, 2004 and Silva,*et al*.,2010، اما محليا فهذه الدراسة تعد الاولى في الفطريات المصاحبة للروبيان، وقد اظهرت الدراسة ان معظم الانواع المسجلة من الجنسين *Aspergillus* و *Penecillium* هي فطريات انتهازية وتصبح مرضية عندما تكون الظروف البيئية ملائمة وهي غالبا ما تصيب الانسان او الحيوان ضعيف المناعة.

جمعت عينات الروبيان خلال فترة تغير الظروف الحرارية بين شهر آذار (25±1 م°) ونيسان (34± 2 م°) بزيادة مقدارها 10 م° تقريبا حيث لوحظ زيادة في اعداد مستعمرات الفطريات المسجلة خلال شهر نيسان .كما بينت النتائج ان استخدام طريقة الغسل في الزرع الجرثومي هي الافضل في دراسة تنوع الفطريات على الروبيان وقد اكدت العديد من الابحاث ان هذه الطريقة اساسية للزرع الجرثومي للأحياء المجهرية. ان وجود بعض انواع الفطريات في البيئة المائية يسبب امراض خطيرة للاحياء المائية ومنها الروبيان اذا لم تكافح في بداية اصابتها، وعادة ما تحدث هذه الامراض بسبب سوء نوعية المياه وظروف التربية السيئة وعدم وجود اجراءات الحجر الصحي (Carl,1976).وعلى الرغم من ان الفطريات تفرز بعض الانزيمات الضرورية للعمليات الفسلجية والتقنية للكائنات الحية (Gouka, et al.,1997)، مع ذلك في الفطريات المرضية تعمل الانزيمات على تسهيل اختراق الفطر لأنسجة المضيف مسببة تهشيم لجدران الخلايا (Ghannom,2000) فضلا عن قدرتها على اختراق القشر او الدرع الخارجي للروبيان (Campos *et al*.,2007).

بينت الدراسة الحالية بان الانواع الفطرية المعزولة من الروبيان المدروس بمختلف الطرق المستخدمة للعزل ،تشكل خطرا مباشرا او غير مباشر ، فالروبيان يدخل ضمن السلسلة الغذائية لكائنات اخرى منها الاسماك وعندما تتناول الاسماك روبيان محمل بعدد من الابواغ التي تعود الى تلك الفطريات المعزولة بالدراسة او غيرها يؤدي الى تراكمها في انسجة الاسماك. اما الخطر المباشر فيظهر عند بعض الشعوب التي تعتبر الروبيان مصدر غذائي بروتيني مهم جدا لذلك يتم تناول الروبيان نيئ او بطهيه بصورة غير جيدة وبذلك ستنتقل ابواغ الفطريات المرضية الى جسم الانسان مما يتسبب في اصابته بعدة امراض ومنها امراض الحساسية Aspergillosis وامراض السرطان حيث بعض تلك الفطريات تفرز سموم مسرطنة (Groopman *et al*.,1992)

كما تقوم بعض انواع الجنس *Aspergillus* التي سجلت في البحث وخاصة النوع *A. flavus* بأنتاج مادة الافلاتوكسين والمايكوتوكسين من عملية الايض الثانوي وهي افرازات سامة تؤثر على الكائنات

المستزرعة وخاصة في المزارع التي تستخدم الغذاء الصناعي الذي تدخل الحبوب في تصنيعه (Groopman *et al.*,1992)، لذلك توصي الدراسة على ضرورة الانتباه الى تاثير الفطريات على مزارع الاسماك والروبيان كما يستوجب اتباع مقومات الادارة الصحية المناسبة لمنع انتشار الإصابة بأمراض الفطريات المعدية للحيوان والمستهلك.

شكر وتقدير

تتقدم الباحثتان بالشكر والتقدير لإدارة مركز علوم البحار وقسم الاحياء البحرية للتسهيلات المختبرية وشكر خاص للسيد جاسم مغراف لمساهمته في توفير عينات الروبيان.

المصادر

المالكي، طارق حطاب ياسين (2009). مقارنة معدلات نمو الروبيان الشحامي Jinga shrimp *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edward, 1837) المربى في ثلاث انظمة استزراع مختلفة. جامعة البصرة– كلية الزراعة، قسم الاسماك والثروة البحرية، رسالة ماجستير. 108ص.

المالكي، طارق حطاب ياسين (2015). دراسة بعض الجوانب الحياتية والبيئية للروبيان الشرقي *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) وطرائق تربيته واكثاره في البصرة، العراق. جامعة البصرة– كلية الزراعة, قسم الاسماك والثروة البحرية,رسالة دكتوراه 24 ص.

غازي، عبد الحسين حاتم (2013). إكثار الروبيان ذو الارجل البيضاء (*Penaeus (Litopenaueus) vannamei* وتربيته في محافظة البصرة. كلية الزراعة– جامعة البصرة، العراق. رسالة دكتوراه 209 ص.

Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D.(2000). Yeasts characteristics and identification. Cambridge University Press, Spain.

Campos, A. A. B. ; Maia, E.P.; Costa, W.M. ; Brito, L .O. and Oliverira, A. (2007). Descriçáo dos prinicipais groups fitoplanctônicos do alfluente e elfuente em fazenda de criaçáo do camarão *Litopenaeus vannamei* com sistema de recirculaçáo parcial de ãgua.*B. Inst. Pesca*. 33, 113-119.

Carl, J. Sindermann. (1976). Diseases and disease control in *Macrobrachium* culture. Second workshop on prawn Culture June 14. Informal Report No. 114 .Middle Atlantic Coastal Fisheries Center.

Carmichael,J.W.; Kendrick, W.B.; Conners, I.L.; Singler, L.(1980). Genera of Hyphomycetes. University of Alberta Press, Canada.

Cruz da Sliva,L. Roberta; Camilo de Souza, O.; Fernandes,M.J.; Lima, D.M.M; Coelho, R. R. R. and Souza- Motta, C. (2011). Culturable Fungal diversity of shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone from breeding farms in Brazil. Ghannom, M.A. (2000). Potential role of phospholipase in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev*. 13, 122- 143.

Gouka, R.J.; Punt, P.J. ; van den Hondel, C. A. M. J. J. (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus* progress, limitations and prospects. App. Microbiol. Biotechnol, 47, 1-11.

Groopman , J.D.; Cain, L.G.; Kensler, T.W.(1992) . Exposure in human Populations : measurements and relationship to cancer. CRC Crit. *Rev. Toxicol* . 19,113-145.

Ishikawa Y. A. (1968). Fungus caused black gill condition in cultured kuruma prawn.
Fish Pathol. 1968;3:34–49 (in Japanese).

Jassim, A.A.(2013). Study on some parasites of Acanthopagrus latus and disease
agents of two peanaeid shrimps from Iraqi coastal waters. PhD Thesis, College of Agriculture,University of Basrah, Iraq.127P.

Khoa, L.V.; Hatai K.; Aoki T.(2004) *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon Fabricius*, with black gill disease cultured in Vietnam. J Fish Dis.27:507–15.
doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00562.x.

Lightner D.V.; Fontaine C.T. (1975). A mycosis of the American lobster *Homarus americanus* caused by *Fusarium* sp. J. Invertebr.
25:239–45. doi:10.1016/0022-2011(75)90074-9.

FAO,(2012). Fisheries& Aquaculture *Macrobrachium resenbergii*. Program of database.

Salman, S.D.; Page, T.J.; Naser, M.D. and Yasser, A.G. (2006). The invasion of *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) (Caridea: Palaemonidae) into the Southern Iraqi marshes. Aquatic Invasions, 1:109-115.

Iraqi J. Aquacult. Vol. (12) No. (2) - 2015: 19- 28

Isolating and recording 7 species of fungi associated with the Eastern River Shrimp *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) from the fish ponds in the Garmat Ali campus ,Basra-Iraq

Huda K. Ahmed Sana Q. Bader *

Marine Biology/Marine Science Center/University of Basrah
*Department of Ecological Development of Shatt Al-Arab & N. Arabian Gulf/ Marine Science Center/University of Basrah

Abstract

Study on Eastern River shrimp *Macrobrachium nipponense* in earthen ponds for raising fish in Garmat Ali campus ,Basrah , for the period of March to April 2013. Used four different ways to isolate the fungi of shrimp and diagnosed 7 species of *Aspergillus flavus* , *A.niger*, *Aspergillus* sp., *A.terreus* , *Alternaria* sp., *Penicillium notatum* and *P. chrysogenum* belong three genus of the fungus *Aspergillus* ,*Alternaria* and *Penicillium*. Statistical analysis showed significant differences between the number of diagnosed fungi isolates of each species in different insulation methods , and differences found in the number of isolates of each species of fungi among March and April. The study confirmed that the presence of pathological fungi *Aspergillus* and *Penicillium* have a large impact on shrimp diseases fungal infection, especially when the culture conditions are not appropriate.

Key words: Shrimp fungi, Eastern River Shrimp, *Macrobrachium nipponense*