نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۱۳۰-۱۲۱

شناسائی و جداسازی قارچ‌های شکمبه گاو سیستانی در زابل

الهام رخشانی [۱]، محمد رضا دهقانی [۲*]، محمد چمنی [۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۴

چکیده

گاو سیستانی بومی منطقه سیستان است. این تحقیق با هدف ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ های شکمبه‌ای بی‌هوازی در گاو سیستانی انجام شد. نمونه محتویات جامد و مایع شکمبه از ۵۰ رأس گاو سیستانی بالغ در کشتارگاه زابل در مدت ده روز تهیه و به عنوان منبع قارچ جهت تلقیح به محیط کشت استفاده شدند در این آزمایش از محیط کشت نیمه‌تعریف شده و کاملا بی‌هوازی برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ استفاده شد.. از روش رول باتل برای خالص‌سازی قارچ‌های بی‌هوازی و از محلول آنتی‌بیوتیکی (آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و کلرامفنیکل) برای مهار رشد باکتری-ها مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های خالص‌سازی پرگنه‌ی قارچ به محیط کشت منتقل و بعد از رشد به روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی، جنس Neocallimastix و گونه‌های Orpinomyces joyonni, Piromyces mae, Piromyces communis, Piromyces minutus, Piromyces rhizinflata در شکمبه گاو سیستانی شناسایی شدند. با شناسایی این گونه های قارچ در شکمبه گاو سیستانی، آزمایش های مولکولی و استخراج آنزیم برای بررسی بیشتر خصوصیات این گونه ها در پژوهش های آینده توصیه می شود.

کلمات کلیدی: مورفولوژی، شکمبه، قارچ‌های بی هوازی، گاو سیستانی

**نویسنده مسئول: محمد رضا دهقانی*

آدرس: گروه علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران. تلفن: ۰۵۴۳۲۲۴۴۴۳

پست الکترونیک: mohrezadehghani@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

توده میکروبی در شکمبه شامل انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها می باشد. قارچ‌های بی‌هوازی یک گروه مهم از میکروارگانیسم های شکمبه هستند که به طور خاص در هضم مواد گیاهی در سراسر دستگاه گوارش نقش دارند (۱۴و۵). تاکنون شش جنس از قارچ‌های بی‌هوازی شناخته شده‌اند: *Caecomyces* (۱۶و۳۳)، *Piromyces* (۳۴)، *Neocallimastix* (۳۳) که الگوهای رشد مونوسنتریک دارا بوده و *Anaeromyces* (۷)، *Orpinomyces* (۲) و *Ruminomyces* (۲۱) که الگوهای رشد پلی سنتریک دارند. قارچ‌های بی‌هوازی در چرخه زندگی دارای دو شکل متحرک زئوسپور و شکل غیر متحرک نباتی (تالوس) هستند (۳۵و ۳). قارچ ها در دستگاه گوارش تمام مناطق جغرافیایی جهان یافت شده اند. قارچ *Neocallimastix frontalis* را از شکمبه گوسفند جدا شد و این قارچ به بافت‌های گیاهان حمله کرده و با رشد میسیلیوم توسعه می یابد (۳۲). یک سویه جدید از قارچ به شدت بی‌هوازی از شکمبه گوسفند جدا شده که این گونه توسط یک تالوس پلی سنتریک، یک ریزومیسیلیوم گسترده و پلی نوکلئاز و زئوسپور-های چند تاژک‌دار مشخص شده است که به گونه *Neocallimastix joyonni* نامگذاری شده است(۶). قارچ‌های بی‌هوازی تاکنون فقط ازدستگاه گوارش پستانداران گیاهخوار استخراج شده اند و تلاش‌های صورت گرفته برای جداسازی آنها از دستگاه گوارش سایر جانوران خشکی‌زی و آبزی بی‌نتیجه بوده است (۱۰و۲۱). ۱۲ گونه قارچ بی‌هوازی از نمونه‌های مدفوع گاو میش وحشی باتلاقی جدا شدند و بر اساس ویژگی مورفولوژی به عنوان گونه‌های *Piromyces, Anaeromyces, Orpinomyces, Neocallimastix* تعیین شدند (۳۷). در پژوهش دیگری قارچ‌های بی‌هوازی از مایع شکمبه گوسفند و از مدفوع لاما و گاو کوهان‌دار جدا شدند که بر اساس شکل شناسی و خصوصیات رشد، ۵ سویه به عنوان گونه‌های *Neocallimastix* شناسایی شدند(۲۹). Barr و همکاران (۱۹۸۹) مراحل رشد و نمو و تنوع شکل شناسی سه گونه قارچ *Neocallimastix sp., Piromyces communis Orpinomyces bovis* از شکمبه گاو هلشتاین را شرح دادند (۲). قارچ‌های بی‌هوازی از محتویات شکمبه و روده نشخوارکنندگان و غیرنشخوارکنندگان مختلف جدا شدند. *Piromyces communis* از پستانداران مختلفی استخراج شده است که از جمله می توان به استخراج آن از شکمبه گاو (۲)، شکمبه گوسفند (۳۴) و شکمبه بز (۳۶) اشاره کرد. گونه های *Anaeromyces, Orpinomyces, Caesomyces Piromyces, Neocallimastix* بر اساس ویژگی شکل شناسی از گاو شیری، بوفالو، گوسفند، بز، گاومیش وحشی، فیل، گوزن، گورخر و گوساله‌ها شناسایی شدند (۳۱). گاو سیستانی یک نوع نژاد کوهان دار زبو (*بوس ایندیکوس*) است که زیستگاه آن در جنوب شرق ایران (زابل) است و می تواند آب و هوای گرم را تحمل کند. تاکنون پژوهشی در مورد ریخت شناسی قارچ های شکمبه گاو سیستانی انجام نشده است، لذا هدف از این تحقیق جداسازی، خالص سازی و شناسائی قارچ های شکمبه گاو سیستانی بوده است.

مواد و روش‌ها

برای رشد قارچ ها از محیط کشت نیمه تعریف شده استفاده شد. محیط کشت، مخلوطی از محلول نمکی A و B و مایع صاف شده شکمبه بود (۳۰). ترکیبات محلول نمکی A (۳ گرم دی پتاسیم هیدروژن

Archive of SID

www.SID.ir

فسفات) و محلول نمکی B (۳ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۶ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۶گرم سولفات منیزیم، ۶ گرم کلرید سدیم، ۰/۶ گرم کلرید کلسیم) بود. محیط کشت نهائی، مخلوطی از محلول نمکی A (۱۵۰ میلی لیتر)، محلول نمکی B (۱۵۰ میلی لیتر)، مایع صاف شده شکمبه (مایع شکمبه سانتریفیوژ شده به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰) (۱۵۰ میلی لیتر)، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون تریپتیکاز، ۶ گرم بی‌کربنات سدیم، ۱ گرم ال سیستئین هیدروکلراید، ۷ گرم گلوکز بود که با آب مقطر به حجم یک لیتر تهیه شدند. از سیستئین هیدروکلراید به عنوان عامل احیا کننده استفاده شد. جهت حذف اکسیژن محیط کشت از گاز کربنیک خالص استفاده شد و از محلول ریزازورین جهت نشان دادن اکسیداسیون_احیاء محیط کشت استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر محیط کشت، به بطری‌های سرم (حجم ۹ میلی لیتر) تحت شرایط گاز کربنیک تزریق و بعد از گذاشتن درپوش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شدند. برای جلوگیری از رشد باکتری ها از ۰/۲ میلی لیتر محلول آنتی-بیوتیکی که از مخلوط کردن(۵mg/ml پنی‌سیلین G، ۵mg/ml آمپی‌سیلین، ۵mg/ml اکسی‌تتراسایکلین، ۵mg/ml کلرامفنیکل، ۵mg/ml و استرپتومایسین سولفات) به مقدار ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد، به بطری های شیشه ای دارای محیط کشت افزوده شد. همچنین قطعات ریز کاه (۴-۲ سانتی متر) به بطری‌های سرم به عنوان نشانه رشد قارچ اضافه شد. به دلیل رشد قارچ، بطری‌های سرم به رنگ روشن و شفاف شده و ذرات کاه به علت تشکیل میسیلیوم قارچ به شکل به‌هم چسبیده در قسمت بالای بطری ها شناور شدند.

مایع شکمبه (محتویات جامد و مایع) از ۵۰ رأس گاو سیستانی به مدت ۱۰ روز پس از کشتار در کشتارگاه سیستان به طور تصادفی جمع‌آوری شد. به منظور حفظ دمای آن تا زمان انتقال به آزمایشگاه از فلاسک حاوی آب ۳۹درجه استفاده شد و با پارچه چند لایه صاف شد. مایع شکمبه گاو سیستانی(۱ میلی لیتر) به هر بطری سرم تزریق شد و در انکوباتور (۳۹ درجه سانتی‌گراد) به مدت سه روز نگهداری شد. بطری‌هایی که قارچ رشد نموده بود(محیط کشت شفاف رنگ بوده و ذرات کاه به قسمت بالای بطری منتقل شده بود) جدا شدند. برای خالص‌سازی گونه‌های قارچ از روش رول باتل (Roll bottle) استفاده شد (۲۳). در این روش از محیط کشت دارای قارچ به لوله‌های شیشه‌ای حاوی محیط کشت آگار انتقال داده شد و با سرد کردن بر روی یخ به حالت چرخشی این لایه آگار در سطوح داخلی لوله‌ها تثبیت شد. کلونی‌هائی که در آگار رشد کردند به راحتی جدا شدند. نمونه قارچ روی یک اسلاید شیشه‌ای منتقل شد و در یک میکروسکوپ نوری (Hunt wetzlar,Germany) متصل به رایانه مشاهده و از هر گونه عکس برداری شد.

نتایج

قارچ‌های شکمبه‌ای جدا شده از گاو سیستانی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- جنس و گونه‌های جدا شده از شکمبه گاو سیستانی

جنس/گونه		
Orpinomyces	*Piromyces*	*Neocallimastix*
Orpinomyces joyonii	*Piromyces communis*	----
	Piromyces minutus	---
	Piromyces rhizinflata	---
	Piromyces mae	

***Neocallimastix sp.*:** این قارچ‌ها دارای تالوس مونوسنتریک و اسپورانژیوم‌های اندوژنوس یا اگزونوس می‌باشند (تصویر ۱A و ۱B).

Archive of SID

www.SID.ir

Orpinomyces joyonii. در این جنس اسپورانژیوم اگزوژنوس و کروی یا بیضی شکل است.تصویر ۲A اسپورانژیوم های منشعب و تصویر ۲B اسپورانژیوم بیضی شکل را نشان می دهد.

Piromyces sp.: این قارچ‌ها دارا ی زئوسپورهای تک تاژکی و سیستم ریزوییدی رشته‌ای بودند. اسپورانژیوم در این جنس بی‌قاعده (نامنظم)، تخم مرغی شکل وکشیده است. همچنین دارای برآمدگی-های پاپیلا و غیر پاپیلا همراه با تارهای ریزوئیدی می‌باشد. زئوسپور در این جنس کروی تا گلابی شکل است و اغلب با یک تاژک دیده می‌شود. این قارچ مونوسنتریک است (تصاویر۶-۳).

Piromyces minutus: اسپورانژیوم در این گونه اندوژنوس و به شکل‌های کروی، گلابی شکل یا بیضوی وجود دارند. گونه *پیرومایسس مینوتوس* مونوسنتریک بوده و ریزوییدها از یک و گاهی بیش از یک ریزوییدا اصلی منشاء می‌گیرند (تصویر۳).

Piromyces rhizinflata: اسپورانژیوم در این گونه اندوژنوس یا اگزوژنوس و دارای چند اسپورانژیوم می‌باشند. اسپورانژیوم‌های کوچک ممکن است طویل بوده درحالی که اسپورانژیوم‌های بزرگ‌تر گلابی شکل، تخم مرغی، بیضوی و یا تقریباً کروی با قطری ۷۰ تا ۱۰۰ میکرو متر هستند. تالوس در *پیرومایسس ریزینفلاتا* مونوسنتریک است (تصویر ۴).

Piromyces communis: در این گونه ریزوییدها وجود دارند که پهنای ریزوییدا اصلی حدود پنج تا پانزده میکرو متر است. ریزوییدا اصلی کامل مستقیم و یکنواخت است (تصویر ۵).

Piromyces mae: در این جنس اسپورانژیوم شبیه به قلب است و اندوژنوس می باشد اسپورانژیوم در این گونه تخم مرغی شکل و بدون ساقه است (تصویر ۶).

بحث

زئوسپور قارچ ها به دو شکل اندوژنوس و اگروژنوس وجود دارند. در حالت اندوژنوس زئوسپور هسته را حفظ و اسپورانژیوم جدید تولید می کند در حالی که در حالت اگزوژنوس هسته از زئوسپور خارج شده و اسپورانژیوم را تشکیل می‌دهد (۲۰و۲۴).

همچنین قارچ‌های بی‌هوازی از جهت تولید اندام تولید مثلی به دو شکل مونوسنتریک (تولید یک اندام تولید مثلی) و پلی سنتریک (تولید چندین اندام تولید مثلی) هستند. مونوسنتریک یا پلی سنتریک بودن از ویژگی‌های غیر قابل تغییر است. زئوسپور تالوس را بسته به شرایط محیطی و جنس و گونه‌ی قارچ، به سه شکل مختلف تولید می نماید:۱- اندوژنوس و مونوسنتریک ۲- اگزوژنوس و مونوسنتریک۳- اگزوژنوس و پلی سنتریک (۴). قارچ‌های مونوسنتریک سیستم ریزوئیدی، در حالی که قارچ-های پلی سنتریک، سیستم ریزومیسیلیومی تولید می-کنند در هر دو نوع توسعه مونوسنتریک، هر اسپورانژیوم فقط یک تالوس تشکیل می‌دهد و فقط اسپورانژیوم هسته را شامل می‌شود (۲۰و۲۴). در قارچ پلی سنتریک هسته به بیرون از کیست زئوسپور مهاجرت می‌کند (توسعه اسپورانژیوم اگزوژنوس) و دستخوش تقسیمات میتوز در ریزومیسیلیوم می‌شود که متعاقبا تشکیل چندین اسپورانژیوم می‌دهد. بنابراین، در قارچ پلی سنتریک، هم اسپورانژیوم و هم ریزومیسیلیوم هسته را شامل می‌شوند (۱۳و۲۲). قارچ ها این توانایی را دارند که با سیستم ریزوییدی به بافت های گیاهی که برای دیگر میکروب ها قابل

Archive of SID

www.SID.ir

دسترس نیست، نفوذ کنند (۲۵). گونه های *Neocallimastix* و *Piromyces* و *Orpinomyces* توانایی زیادی برای تجزیه فیبر دارند. Caecomyces فاقد سیستم ریزوییدی توسعه یافته بوده و نمی توانند فیبر را کامل تجزیه کنند (۳۸).

Neocallimastix: قارچ *نئوکالیماستیکس*، یک تالوس مونوسنتریک و اسپورانژیوم اندوژنوس یا اگزوژنوس دارد. اسپورانژیوم *نئوکالیماستیکس* روی اسپورانژیوفور کوتاه یا بلند قرار دارد. اسپورانژیوم اگزوژنوس مونوسنتریک از جنس نئوکالیماستیکس کروی، گلابی شکل، تخم‌مرغی و گاهی اوقات با شکل نامنظم هست و اسپورانژیوم اندوژنوس مونوسنتریک بیضوی، گلابی یا تخم‌مرغی شکل با اندازه قطر متغیر بین ۱۰۰-۱۰میکرومتر است. سیستم ریزوییدی جنس *نئوکالیماستیکس* بسیار منشعب و شاخه‌دار است. زئوسپورها چند تاژکی هستند که شکل و اندازه‌شان مختلف است. اشکال زئوسپور گونه‌ها در این جنس بیضی شکل هستند. تصویر ۱نشان می دهد که این قارچ دارای تالوس با اسپورانژیوم اگزوژنوس و اسپورانژیوفورهای نسبتاً کوتاه می‌باشد. اسپورانژیوم اندوژنوس و اسپورانژیوفور نسبتاً کوتاه دارای ریزوئیدهای فراوانی هست که این ریزوئیدها در هضم فیزیکی و شیمیایی مواد فیبری نقش بسزایی دارند. این جنس با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی ارایه شده (۱ و ۳۰) شناسائی که با این تحقیق مطابقت دارد. اسپورانژیوم اگزوژنوس کروی یا بی‌قاعده روی اسپورانژیوفور بیضوی شکل و طویل قرار دارند. اسپورانژیوم اگزوژنوس بیضوی روی اسپورانژیوفور کوتاه قرار دارد. یک اسپورانژیوم اندوژنوس کروی وجود دارد که سیستم ریزوئیدی از دو محور اصلی منشعب شده و ریزوئید اصلی یک حلقه در اسپورانژیوم اندوژنوس کروی بوجود می آورد (۲۶). وجود قارچ نئوکالیماستیکس در دستگاه گوارش علفخوارها با جداسازی *N. frontalis* از شکمبه گوسفند ثابت شد. این کار توسط Orpin در سال ۱۹۷۵ در انگلستان صورت گرفت (۳۲). این قارچ از شکمبه گاو ، شکمبه گاومیش و شکمبه گوسفند(۲ و ۴) جدا شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

Orpinomyces joyonni: اسپورانژیوم در ابتدا رشدی ندارد و تنها اسپورانژیوفور ابتدائی توسعه پیدا می‌کند. ریسه ها در این گونه‌ها خیلی نازک هستند. اسپورانژیوم اگزوژنوس روی اسپورانژیوفور ساده قرار دارد و سیستم ریزوئیدی با ساز و کار خاصی در بافت گیاهی نفوذ می‌کند. این گونه‌ها با تولید یک میسیلیوم چند هسته‌ای جوانه می زنند. اسپورانژیوم‌ها منشعب یا غیر منشعب هستند و اسپورانژیوم اگزوژنوس کروی تشکیل دادند. زئوسپورها کروی وطول تاژک آن‌ها حدود ۳۱-۴ میکرومتر است. زئوسپورها تشکیل سیست داده و سیست لوله زایا تولید که به میسیلیوم چند هسته‌ای توسعه پیدا می نماید (۱۸). در مقابل قارچ مونوسنتریک، سیست‌های این گونه‌ها به اسپورانژیوم‌های مضاعف (متعدد) جوانه تولید می کنند.کشت اولیه این گونه‌ها هیچ رشد اسپورانژیوم ندارد و تنها اسپورانژیوم‌های اولیه توسعه پیدا می‌کند. ریسه‌ها در این گونه خیلی نازک بودند. اسپورانژیوم اگزوژنوس روی اسپورانژیوفور ساده قرار دارد(تصویر ۲). در تصویر ۲A اسپورانژیوم این گونه که منشعب شده را نشان داده است. اسپرانژیوم در این گونه جدا شده بیضی شکل بود(تصویر ۲B). این با خصوصیات این قارچ های جدا شده مطابقت دارد. این گونه از شکمبه گاو در

Archive of SID

www.SID.ir

کانادا(۲۸) شکمبه گاو در آمریکا (۳۸)، شکمبه گوسفند در ایران(۱۱) شکمبه گوسفند در مالزی(۲۱) جدا شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

Piromyces minutus: این گونه‌ها تالوس مونوسنتریک با اسپورانژیوم اندوژنوس دارد. اسپورانژیوم، بیضی، گلابی و کروی شکل هست. سیستم ریزوئیدی از محور اصلی منشعب شده و ریزوئید اصلی هیچ انشعابی ندارد و به سیستم ریزوئیدی با انشعابات کم ختم می‌شود. ریسه تنگ شده است و اسپورانژیوم کوچک این گونه‌ها، در مقایسه با گونه‌های دیگر، علامت تشخیص این گونه هست. این گونه دارای کوچکترین اسپورانژیوم در بین جنس پیرومایسس می‌باشد که با این نشانه می‌توان این گونه را شناسایی کرد و ریسه تالوس دارای تنگ شدگی‌ها و تورم می‌باشد (تصویر ۳). زئوسپورها از رأس اسپورانژیوم تخریب شده و از راه یک روزنه بزرگ آزاد می‌شوند. در اسپورانژیوم‌های بزرگ ممکن است دو روزنه ایجاد شود. دیواره اسپورانژیوم پس از رها شدن زئوسپورها سالم باقی می‌ماند. زئوسپورها کروی (پنج تا ده میکرومتر) و تک تاژکی می‌باشند. تنگ شدگی‌هایی ممکن است در ریزوئیدها دیده شوند. *پیرومایسس مینوتوس* نخستین بار توسط Ho و همکاران در سال ۱۹۹۳ از شکمبه گاو وگوسفند استخراج شد (۱۹). این گونه از شکمبه گوسفند و بز در مالزی جدا شده و با ویژگی‌های ریخت شناختی ارایه شده (۴ و۲۱) همخوانی دارد.

Piromyces rhizinflata: *پیرومایسس ریزینفلاتا* اسپورانژیوم اندوژنوس یا اگزوژنوس بوده و در این گونه اسپورانژیوم اندوژنوس گلابی‌شکل با استیگما(کلاله) در زیر اسپورانژیوم قرار دارد. اسپورانژیوم اندوژنوس کروی و باریک در ناحیه گردن وجود دارد. (تصویر ۴). سیستم ریزوییدی انشعابات زیادی دارد (تصویر ۴). سیستم ریزوییدی یک سیست زئوسپور که با اسپورانژیوم اگزوژنوس گلابی‌شکل که روی اسپورانژیوفور کوچک واقع شده تولید می‌کند و در تالوس‌های بزرگ به حدود یک میلی متر می رسد. *پیرومایسس ریزینفلاتا* نخستین بار توسط Breton و همکاران در سال ۱۹۹۱ در تونس از مدفوع الاغ صحرایی استخراج شد (۹). *پیرومایسس ریزینفلاتا* از شکمبه گاو و گوسفند در مالزی(۲۱)، شکمبه گاو میش وحشی در کانادا(۱) و مدفوع الاغ در فرانسه(۸) جدا شد.

Piromyces communis: شکل اسپورانژیوم در این گونه گلابی‌شکل هست. علامت تشخیص این گونه، گردن پهن بود (تصویر ۵). از ویژگی قابل توجه این جدایه این است که توسعه مونوسنتریک هم اندوژنوس و هم اگزوژنوس نشان دادند. اسپورانژیوم بیضوی یا گلابی‌شکل هست و آن‌هایی که از کیست زئوسپور توسعه پیدا کردند، کروی هستند. یک مشخصه مهم از *پیرومایسس کومونیس* این است که اسپورانژیا و اسپورانژیوفورها شکننده هستند و از سیستم ریزوئیدی شکسته شدند. زئوسپور تک تاژکی دارد. Chamani و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند زئوسپور در گونه *پیرومایسس کومونیس* تک تاژکی و در بیشتر موارد کروی شکل است. تحقیقات دیگر محققان نشان داد زئوسپور در گونه‌هایی که به تک تاژکی مشهورند، معمولاً یک تاژک داشته ولی در برخی موارد ممکن است زئوسپوهای ۲ تا ۴ تاژکی نیز در بین آن‌ها دیده شود. زئوسپورهای فعال گونه‌های چند تاژکی همیشه بیش از ۴ تاژک دارند (۱۶). گردن باریک یکی از ویژگی‌های متمایز کننده

Archive of SID

www.SID.ir

این گونه از سایر گونه‌های پیرومایسس است که این ویژگی مشابه گزارش Chamani و همکاران در سال۲۰۰۴ می‌باشد (۱۱). *پیرومایسس کومونیس* نخستین بار توسط Orpin (۱۹۷۷) در انگلستان از شکمبه گوسفند استخراج شد (۳۴). تاکنون این گونه از پستانداران مختلف مناطق گوناگون استخراج شده است که از جمله می توان به استخراج آن از شکمبه گوسفند در فرانسه (۱۵ و۱۷) و انگلستان (۳۴) اشاره کرد. این گونه نیز از دستگاه گوارش گوسفند و بز استخراج شده و از این لحاظ با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

Piromyces mae: اسپورانژیوم اندوژنوس و گردن خیلی تنگ از ویژگی مورفولوژیکی این گونه بود. این گونه دارای ریزوییید منشعب و باریک که طول آن تا ۱۷۰ میکرومتر بوده و یک اسپورانژیوم تخم مرغی شکل است. ریزوییید اصلی طویل شده و به یک اسپورانژیوم متورم وصل می شود. اسپورانژیوم ساقه و پایه ندارد و ریزوییدها به صورت منشعب در این گونه دیده می شود (تصویر ۶). زئوسپور در این گونه تخم مرغی شکل و یا کروی است که بدون تاژک و یا به ندرت دو تاژک دارند (۲۷). طول تاژک ۲۳ تا ۳۰ میکرومتر است. این گونه از شکمبه و مدفوع گاو (۱۲)، مدفوع گوسفند (۳۰) و سکوم اسب در کانادا (۲۷) جدا شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

نتیجه گیری

از قارچ های بی هوازی جنس های *Neocallimastix*, *Piromyces* و *Orpinomyces* در شکمبه گاو سیستانی در مرحله مراحل رشد مونوسنتریک و پلی‌سنتریک شناخته شدند. انجام آزمون ملکولی و استخراج آنزیم برای بررسی بیشتر ویژگی‌های قارچ های شکمبه این نژاد در تحقیقات آینده توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

لازم است از مدیریت گروه علوم دامی دانشگاه زابل، آزمایشگاه گروه علوم دامی و گیاهپزشکی سرکار خانم مهندس نخعی مقدم و همچنین مدیران کشتارگاه زابل جهت همکاری تشکر و قدردانی شود.

References

1. **Barr D.J.S.** (1995). Contributions on the morphology and taxonomy of some rumen fungi from Canada. *Mycotaxon LIV* **53**: 203-214.
2. **Barr D.J.S., Kudo H., Jackober K.D. Cheng K.J.** (1989). Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp, *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis,* gen. nov., sp. nov. Canadian Journal Chemistry **67**: 2815-2824.
3. **Barrett S.P.** (1997). Human intestinal spirochaetosis (Diseases Associated With Intestinal Spirochaetes). In: *Intestinal Spirochaetes In: Domestic Animals and Humans*. ed. D. J. Hampson and T. B. Stanton. CAB International (ISBN 0 85199 140 8). PP: 243-266.
4. **Bauchop, T.** (1979) Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Applied and Environment Microbiology* **38**:148-158.
5. **Bradshaw L.J.** (1992). Metabolism of Microorganisms. In *Laboratory Microbiology*. 4th edn. ed. L. J. Bradshaw. Saunders College Publishing (ISBN 0 03 047442 6). PP: 137-213.
6. **Breton A., Bernalier A., Bonnemoy F., Fonty G., Gaillard B. Gouet P.** (1989). Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. *FEMS Microbiology Letters* **58**: 309-314.
7. **Breton A., Bernalier A. Dusser M.** (1990). *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov.sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS Microbiology Letters* **70**: 177-182.
8. **Breton, A., Dusser, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., Millet, L.**

Archive of SID
www.SID.ir

polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis, sphaeromunas communis* and *Piromonas communis*. *Journal of General Microbiology* **134**: 1123-1129.

18. **Ho Y.W. and Bauchop T.** (1991). Morphology of three polycentric rumen fungi and description of a procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in cultures. *Journal of General Microbiology* **137**: 213-217.
19. **Ho Y.W., Barr D.J.S., Abdullah N., Jalaludin S. Kudo H.** (1993). A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. *Mycotaxon* **47**: 285-293.
20. **Ho Y.W., Khoo I.Y.S. and Tan S.G.** (1994). Isozyme analysis of anaerobic rumen fungi and their relationship to aerobic chytrids. *Microbiology* **140**: 1495-1504.
21. **Ho Y.W. and Barr D.J.S.** (1995). Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycology Research* **87**: 655-677.
22. **Hungate, R.E. (1966)** The rumen bacteria. In: The Rumen and Its Microbes. ed. R. E. Hungate. Academic Press Inc. New York and London. pp. 8-90.
23. **Joblin K.N.** (1981). Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied Enviromental Microbiology* **42**: 1119-1122.
24. **Karling J.S.** (1978). *Chytriomycetarum Iconographia:* Illustrated and Descriptive Guide to the Chytridiomycetous Genera with a Supplement on the Hyphochytridiomycetes. *J. Cramer: Monticello,NY- Lubrecht and Cramer.*
25. **Kopecny J. and Hodrova B.** (1995). Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Letters Applied Microbiology* **20**: 312-316.
26. **Kostyukovsky V.A., Okunev O.N. Tarakanov B.V.** (1991). Description of two anaerobic fungal strains from the bovine rumen and influence of diet on the fungal population *in vivo. Journal of Microbiology* **137**: 1759-1764.
27. **Li J., Heath I.B. Bauchop T.** (1990). *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica,* two new species of monoflagellated anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant. **Prensier, G.** (1991) *Piromyces rhizinflata* a species of strictly anaerobic fungus from feces of the Saharan ass: a morphological, metabolic and ultrastructural study. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 1-8.
9. **Breton A., Martinie G. Gerbi C.** (1995). Location by fluorescence microscopy of glycosidases and a xylanase in the anaerobic gut fungi *Caecomyces communis, Neocallimastix frontalis,* and *Piromyces rhizinflata. Current Microbiology* **31**: 224-227.
10. **Brookman J.L., Mennim G. Trinci A.P.J.** (2000). Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology* **146**: 393-403.
11. **Chamani M., Rezaeian M., Ershad J. Jamei P.** (2005). The identification of anaerobic fungi in the rumen of sheep and goat and evaluation of morphological, biochemical and metabolic characteristics. *Agriculture Science Journal* 7: 117-134.
12. **Davies D.R., Theodorou M.K., Lawrence M.I. Trinci A.P.J.** (1993). Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology* **139**: 1395-400.
13. **Dore J. and Stahl D.A.** (1991). Phylogeny of anaerobic rumen chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparison. Canadian Journal of Botany **69**: 1964-1971.
14. **Fonty G. and Gouet P.H.** (1994). Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. Pp. 97-112. In: Microorganisms in Ruminant Nutrition Prins, R.A. and Stewart, C.S. eds. Nottingham University Press, Nottingham.
15. **Gaillard B. and Citron A.** (1989). Ultrastructural study of two rumen fungi: *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *Current Microbiology* **18**: 83-86.
16. **Gold J.J., Heath I.B. Bauchop T.** (1988). Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe *Caecomyces* equine assigned to the *Neocallimasticaceae*. *Biosystems* **21**: 403-415
17. **Hebraud M. and Fevre M.** (1988). Characterization of Glycoside and

Archive of SID

www.SID.ir

Canadian Journal of Botany **68**: 1021-1033.

28. **Li J. and Heath I.B.** (1991). The development and zoospore ultrastructure of a polycentric chytridiomycete gut fungus, *Orpinomyces joyonii*. comb. *Canadian Journal of Botany* **69**: 580-589.
29. **Lolke S. and Bwee T.** (1993). Degradation and utilization of grass cell walls by anaerobic fungi isolated from yak, llama and sheep. *Animal Feed Science and Technology* 44: 221-236.
30. **Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J.** (1987) Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. *Journal of General Microbiology* 133: 1829-1834.
31. **Nagpal R., Puniya A.K., Sehgal J.P. Singh K.** (2011). In vitro fibrolytic potential of anaerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores. *Mycoscience* **52**: 31-38.
32. **Orpin C.G.** (1975). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology* **91**: 249-269
33. **Orpin C.G.** (1976). Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology* **94**: 270-280.
34. **Orpin C.G.** (1977). The rumen flagellate *Piromonas communis:* its life-history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology* **99**: 107-117.
35. **Orpin C.G. and Bauntiff L.** (1978). Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology* **104**: 113-122.
36. **Sakurada M., Morgavi D.P., Tomita Y. Onodera R.** (1995). Chitinolytic activity of the anaerobic rumen fungus *Piromyces communis* OTS1. *Current Microbiology* **31**: 206-209.
37. **Tripathi V.K., Sehgal J.P., Puniya A.K. Singh K.** (2007). Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (Boselaphustragocamelus). *Journal of Anaerobe* **13**: 36-39
38. **Wubah D.A., Fuller M.S. Akin D.E.** (1991). Isolation of monocentric and polycentric fungi from the rumen and feces of cows in Georgia. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1232-1236.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Identification and Isolation of Rumen Fungi of Sistani cattle in Sistan

Rakhshani, E.[1], Dehghani, M.R.[2*], Chamani, M.[3]

1. Graduated student of M.Sc. of Animal Science Department, University of Zabol, Zabol. Iran
2. Assistant professor of Animal Science Department, University of Zabol, Zabol. Iran
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received Date: 9 November 2015 *Accepted Date: 26 July 2017*

Abstract

The Sistani cattle are indigenous breed of Sistan region. The purpose of this research was the separation and studying the appearance morphology of anaerobic fungi in the Sistani cattle rumen in Sistan region. Sampling from the solid and liquid contents of 50 Sistani cattle was done randomly in Zabol slaughterhouse and these samples were used as the source of fungus to inoculation to culture. The semi-defined medium environment was used in this research to cultivation, separation and purification of anaerobic fungi. The roll bottle method was used for purification of rumen fungi and the antibiotic solution (ampicillin, penicillin, streptomycin, oxytetracycline and chloramphenicol) were used for inhibiting growth of bacteria. Samples of pure fungi were transferred to culture and were observed after growth in glass slide with light microscope. With regard of morphologic characteristics the genus of Neocallimastix and species of Orpinomyces joyonni, Piromyces mae, Piromyces communis, Piromyces minutus, Piromyces rhizinflata was isolated in rumen of Sistani cattle. With identification of these fungi species in rumen of Sistani cattle, it is recommended to perform molecular test and enzyme extraction for more survey characteristics in future research.

Keywords: Morphology, Rumen, Anaerobic fungi, Sistani cattle

**Corresponding author: M.R. Dehghani*
Address: Animal Science Department, University of Zabol, Zabol. Iran. Tel: 05132244443
Email: Mohrezadehghani@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir