

اولین گزارش وجود *Kazachstania sp.* به عنوان فلور روده ماهیان قزل آلائی رنگین کمان پرورشیآرزو باقری^{۱*}، رامین مناف فر^۲، ساناز رحیمی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان، واحد ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۲

چکیده

مخمرهای تک سلولی به عنوان فلور روده انواع ماهیان، آبزیان و جانوران مطرح هستند؛ اما اطلاعات جامعی در این خصوص موجود نیست. این تک سلولی‌ها، غیر از اینکه منشاء تعدادی از بیماری‌های شناخته شده و ناشناخته هستند تعدادی از آنها نیز با دارا بودن خواص پروبیوتیکی هم چون تولید برخی آنتی بیوتیک‌ها و ویتامین‌ها برای این موجودات مفیدند. بر اساس تحقیقات به عمل آمده تنوع گونه و جمعیتی فراوانی از مخمرها در فلور روده موجودات پیش بینی می‌شود. در این تحقیق حین بررسی تنوع مخمرهای جنس ساکارومایسس به عنوان فلور طبیعی روده ماهیان قزل‌آلائی پرورشی شهرستان ارومیه گونه‌هایی از یک جنس جدید مخمر مشابه ساکارومایسس در فلور روده این موجودات شناسایی شد. شناسایی دقیق با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و افتراقی و تکنیک‌های مولکولی PCR و تعیین توالی توانست ضمن معرفی چندین گونه و سویه از جنس ساکارومایسس جنس جدیدی را به نام قزاقستانیا در ماهیان قزل‌آلائی پرورشی شناسایی نماید.

واژگان کلیدی: ساکارومایسس، قزاقستانیا، ماهی قزل‌آلا، محیط کشت، مخمر.

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: arezoo.bageri88@gmail.com

۱. مقدمه

و مرتبط را ندارند. مطالعات نشان داده است که در هنگام بررسی یک گونه از مخمر با سویه‌های مختلفی از آن مواجه می‌شویم که با هم اختلافات بیوشیمیایی جزئی دارند؛ (Alani *et al.*, 2004). بنابراین، امروزه روش‌های مولکولی متعدد به شناسایی مخمرها در محیط کمک می‌کنند و همراه با داده‌های به دست آمده از مطالعات فیزیولوژیکی روش‌های حفظ و استفاده از تنوع حیاتی مخمرها را فراهم می‌نمایند (Baghbani *et al.*, 2012).

در تحقیق حاضر که برای اولین بار در ایران انجام شد، با توجه به اهمیت فراوان اقتصادی جنس ساکارومایسس در بخش صنعت شیلات، آبی پروری و بسیاری از صنایع دیگر سعی شد ضمن مطالعه تنوع مخمرهای جنس ساکارومایسس جنس‌های مشابه با این مخمر نیز مورد بررسی قرار گیرد. هدف از تحقیق فوق شناسایی سویه‌ها، گونه‌ها و جنس‌های احتمالی مخمرهای تک سلولی در فلور روده ماهیان قزل‌آلا می‌باشد که بتوان در آینده از آنها به عنوان میکروارگانیسیم‌های مفید استفاده نمود.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه برداری ماهیان از ایستگاه‌های نمونه برداری در تابستان ۱۳۹۲ انجام شد. بدین منظور تعداد ۱۸ نمونه از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن تقریبی ۲۳۵ گرم از ۶ ایستگاه (مزرعه) پرورش ماهی استان (جدول ۱) جمع‌آوری شد.

مخمرها متعلق به زیر شاخه‌ی قارچ‌های آسکومیست جزء یوکاریوت‌های تک سلولی هستند. این موجودات با انتشار جغرافیایی وسیع بر روی اغلب زیستگاه‌ها مانند خاک، فضولات حیوانات، شیر و اغلب مواد غذایی قابل تخمیر بسر می‌برند (Phaff and Starmer, 1987). مخمرها غیر از حضور در محیط‌های آزاد، می‌توانند به عنوان فلور روده‌ی موجودات مختلف از جمله آبزیان مطرح باشند. مطالعات انجام شده تراکم مخمرهای تک سلولی روده آبزیان را تا حد 10^6 CFU/g پیش‌بینی کرده است (Gatesoupe, 2007). نظر به مفید بودن تعدادی از این مخمرهای تک سلولی، برخی از گونه‌ها به عنوان جیره غذایی کاربرد فراوانی در پرورش لارو و انواع گونه‌های بالغ آبزیان دارند (Manaffar, 2012). محصولات مخمری همچنین به عنوان یک منبع پروتئینی در رژیم غذایی استفاده می‌شوند به طور مثال استفاده از مخمران در چندین پروژه تحقیقاتی برای تولید میگو آب شور نتایج درخشانی را داشته است (James *et al.*, 1981). در این ارتباط تحقیقات نشان داده‌اند که اضافه کردن مخمر آبجو به غذای ماهی نیز باعث بالا بردن عکس العمل‌های تدافعی، ایمنی و رشد می‌شود (Siwicki *et al.*, 1994). با توجه به اهمیت مخمرها؛ شناسایی و تعیین خصوصیات آنها خیلی مهم است. بسیاری از روش‌های کلاسیک نه تنها پر هزینه و زمان‌بر هستند، بلکه قدرت تمایز دهی بین سویه‌های نزدیک

جدول ۱. اسامی مزارع پرورش ماهی در شهرستان ارومیه

نام کارگاه پرورش ماهی	آدرس ایستگاه
ماهی سرای غلام پور متین	میرشکارلو
ماهی سرای رشدکن رضایی	جاده اشنویه
مزرعه قائم وزیری	جاده بالانج - سارالان
کارگاه تولیدی و پرورش ماهی وهابی	زیوه
کارگاه پرورشی شفاف بالیق دکتر مدیری	جاده سرو - هنگروان
استخرهای پرورشی پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه	دانشگاه ارومیه

۱-۲- بررسی میکروبی

نمونه‌ها بلافاصله در داخل یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور تشریح، ابتدا سطح بدن ماهی با استفاده از الکل ۷۰٪ پاک شده و ناحیه بین دو باله شکمی به طرف جلو تا حفره پریکاردیومی برش داده شد (پراون، ۱۳۸۰). محتویات روده به کمک پنس استریل از روده خارج و با استفاده از سرم فیزیولوژی رقت‌های مختلفی از آن تهیه شد. رقت‌های تهیه شده در پلیت‌های استریل جداگانه با روش پورپلیت^۱ در محیط SDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت کشت داده شدند (جانسون و کیس، ۱۳۸۱). پس از رشد کلنی مخمرهای تک سلولی نمونه‌ها بر اساس شکل کلنی‌های ایجاد شده دسته بندی شده و مرحله دوم کشت به منظور جداسازی آنها انجام شد. در مرحله بعدی با انتخاب کلنی‌های کاملاً مستقل و مجزا، کشت سطحی گسترده^۲ بر روی محیط SDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ انجام شد (Black, 1999). ایزوله‌سازی تک‌کلنی‌های مخمر از کلنی‌های باکتریایی و قارچ‌های ساپروفیت با کشت مجدد بر روی محیط کشت Mycosel Agar (SCC) با روش کشت سطحی استریک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انجام شد. در نهایت شناسایی دقیق مخمرها به وسیله رنگ آمیزی گرم نمونه‌ها محقق شد (Deak et al., 2000). پس از اطمینان از ایزوله‌سازی مخمرهای تک سلولی، شناسایی جنس‌های مخمرها با استفاده از دو محیط کشت CHA و CMA انجام شد. کشت در محیط CHA با همان روش کشت سطحی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. با توجه به اینکه گونه‌های مختلف مخمر در این محیط کشت تنوعی از رنگ‌ها مختلف را ایجاد می‌کنند، بررسی رنگ اختصاصی تولید شده در هر پلیت یک بار ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه و بار دوم ۴۸ ساعت پس از کشت

اولیه صورت گرفت (Paritpokee et al., 2005). کشت در محیط کشت CMA^۳ با روش دالمائو^۴ انجام شد (Larone, 2002). در این مرحله بر اساس ویژگی مورفولوژیکی خاص هر نوع مخمر در محیط کشت CMA شکل بلاستوکونیدی هر نمونه زیر میکروسکوپ بررسی شد و بر این اساس کلنی‌ها دسته بندی و جدا سازی شدند (دیبیا، ۱۳۹۰).

در این تحقیق نتایج کشت افتراقی برای جداسازی جنس ساکارومایسس به صورت کلنی‌هایی به رنگ ارغوانی روشن مایل به بنفش در محیط‌های کشت CHA و کلنی‌های سفید تا کرم رنگ با قوام خمیری در محیط کشت SDA مشاهده شد.

۲-۲- بررسی‌های مولکولی:

به‌منظور شناسایی تنوع گونه‌های جنس ساکارومایسس از PCR^۵ و تعیین توالی بخش کوچکی از ناحیه ITS₁^۶ استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA از کلنی‌های خالص مخمر مورد نظر توسط روش کار SDS-Chloroform استخراج شد (Sambrook et al., 1989). PCR با استفاده از یک جفت آغازگر پیشرو 5'-gtc-gta-aca-agg-ttt-ccg-tag-gtg-3' و 5'-gtg-tgt-tgt-att-g-3' به عنوان آغازگر پیرو انجام شد. برنامه PCR در ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه، واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۱/۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سپس یک توسعه نهایی در مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل الکتروفورز ۱/۶ درصد بررسی شد (Olmos et al., 2000). پس از انجام الکتروفورز و مشاهده کیفیت محصول PCR، نمونه‌های مورد نظر به شرکت سیناکلون- ایران ارسال شد و تعیین توالی

3 Corn meal Agar

4 Dalmau Method

5 Polymerase Chain Reaction

6 Internal Transcribed Spacer

1 Pureplate Method

2 Streak method

بیشترین جدایی و فاصله ژنتیکی بین دو سویه-
Kazachstania sp. و *Kazachstania sp.* IMBBR1-2 با دیگر نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد. این بررسی نشان داد که تمامی سویه-های *S. cerevisiae* می‌توانند از نظر ژنتیکی به-عنوان زیر گروه جنس قزاقستانی مطرح باشند. این بررسی نشان داد که برخی از سویه‌های مخمر قزاقستانی از نظر ژنتیکی شباهت زیادی با نمونه‌های ساکرومایسس دارد. همچنین بررسی میزان فاصله ژنتیکی بر اساس رابطه Nei's نشان داد که از نظر فیلوژنیک و ژنتیکی قزاقستانی احتمالاً در زمانی نه چندان دور به عنوان زیر شاخه‌ای از جنس ساکارمایسس بوده است. لذا احتمال مشاهده ویژگی‌های فیزیولوژیک مشترک بین این دو جنس بسیار محتمل به نظر می‌رسد.

انجام شد. جهت بررسی نام و مشابهت توالی‌های حاصل شده با نمونه‌های موجود در بانک ژنی از نرم افزار Blast^۱ مربوط به بسته نرم افزاری سایت NCBI استفاده شد.

۳. نتایج

شناسایی تنوع مخمرهای جنس ساکارمایسس با استفاده از تکنیک مولکولی و تعیین توالی ناحیه کوچکی از ITS₁ در شکل ۱ ارائه شده است. این بررسی نشان داد با درصد همپوشانی بالا (بیش از ۹۵٪) اغلب نمونه‌های تعیین توالی شده به عنوان سویه‌هایی از گونه *S. cerevisiae* قابل شناسایی هستند (شکل ۱). به منظور بررسی ارتباط فیلوژنیک سویه‌های مختلف مخمرهای تحت مطالعه، نمودار خوشه‌ای تنوع ژنتیکی مخمرها (UPGMA) بوسیله نرم افزار Splits Tree4, V4.6 رسم شد.

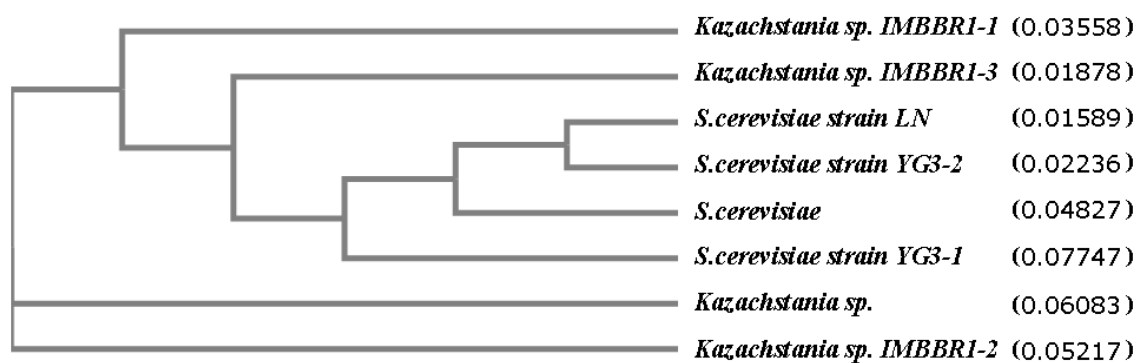
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Kazachstania sp. IMBBR1-۱ GGGGACCCT-CGTTA-----CTTGGAGAAA-TAAAGCTCCGGGGGGTGAAGAATT 49
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ GGGGCCCTT-CGTTACCCCTTTTCCCTGGAGAAA-TAAA-CTCCGGTGTGTGTAA-AATT 56
Kazachstania sp. GCCCACCCCT-CGTTA-----CTGGAGAAAATAAACTCCAGTGGGGTGAAGAATT 49
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ GCCCCCCCTTCGTTTA-----TTGTAAAAA-TAAAACCCGGGGGTGTGAAGAATT 50
S. cerevisiae strain LN -GGGGTTTT--ATTG-----TCCTA--TAACAA-AAGCACAGAAATCTCTCACCGTT 47
S. cerevisiae strain YGr۱ -CGGGTTTT--AATTG-----TCCTA--TAACAA-AAGCACAGAAATCTCTCACCGTT 47
S. cerevisiae --GGGCTCTCCATTTC-----TCTTTACTAACAATAACACAGAT-TCTCTCACCGTT 50
S. cerevisiae strain YGr۱ --GGCGTCCCTACTTC-----TCCT--TTACCGTAAACACAGTTTTCTCTCACGGTT 48
      * * * * *
Kazachstania sp. IMBBR1-۱ ATCGGCGTAGCGAAAAGAACACCTCC-----CGGCGCACTTAAGCGCGAGGC 96
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ ATCGGCGTAACAAAAAGAACACCTCC-----CGGCGCACTTAAGCGCGAGGC 103
Kazachstania sp. TTCGGGTGTA-AAAATGAACAACCTCC-----CGGCGCACTTA-GCGCGAGGC 94
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ ATCGGCGTAACGAAAAAACACCTCC-----CGGCGCACTTAAGCGCGAGGC 97
S. cerevisiae strain LN --TGGAATAACAAAAAAA-AACTTACAAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCGAGGC 104
S. cerevisiae strain YGr۱ --TGGAATAACAAAAAGA-AACTTACAAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCGAGGC 104
S. cerevisiae --TGGAATAGCAAAAAAGA-AACTTACAAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCGAGGC 107
S. cerevisiae strain YGr۱ --TGGAATAGCAAGAAA--G-AACTTACA-GCCTAGCAAGACCGCGCACTTTAGCGCGAGGC 102
      * * * * *
Kazachstania sp. IMBBR1-۱ TCAACTGCCCTCCTCTACCAATTAT-TCATCATTT-----CTTTAATGATCCTTCCG 147
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ TCAACTGTCCCTCCTACCAATTTT-TCATCATTT-----CTTTAATGATCCTTCCG 154
Kazachstania sp. TCAACTGTCCCTCCTACCAATTAT-TCATCATTT-----CTTTAATGATCCTTCCG 145
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ TCAACCGTCCCTCCTACCAATTAT-TCATCATTT-----CTTTAATGATCCTTCCG 148
S. cerevisiae strain LN CCGGGTGGACTC-TCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAATAAAAAGCTCTCATGCTCTTGCCA 163
S. cerevisiae strain YGr۱ CCGGCTGGACTC-TCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAAGTAAAAGCTCTCATGCTCTTGCCA 163
S. cerevisiae CCGGGTGGACTC-TCCATTTCTTGTCTTCTTGCCCAAGAAAAAGCTCTCATGCTCTTGCCA 166
S. cerevisiae strain YGr۱ CCGGCTGGACTC-TCCATCTTTTGTCTTCTTGCCCAAGTAAAAGCTCTCATGCTCTTGCCA 161
      * * * * *
Kazachstania sp. IMBBR1-۱ CAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACAAAAA--- 179
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ CAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACRACAA--- 186
Kazachstania sp. TAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACRACAAA--- 178
Kazachstania sp. IMBBR1-۲ CAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACRACAAAT--- 182
S. cerevisiae strain LN AAA---CAAAAAAAAATAATCC----- 183
S. cerevisiae strain YGr۱ AAA---CAAAAAAAAATAATCCCTTTTTAAATTTT 195
S. cerevisiae AAA---CAAAAAAAAATAATCCCTTTTTTAAATTTT 197
S. cerevisiae strain YGr۱ AAA---CAAAAAAAAATAATCCCTTT----- 184
      * * * * *

```

شکل ۱. توالی مرتب شده مخمرهای *S. cerevisiae* در کنار مخمر *Kazachstania sp.* به عنوان فلور روده ماهیان قزل آلا. وجود ستاره نشان دهنده شباهت نوکلئوتیدی بین ۴ نمونه می‌باشد.



شکل ۲. فیلوگرام سویه‌های مختلف مخمرهای تحت مطالعه. اعداد نشان دهنده فاصله ژنتیکی سویه‌های مختلف بر اساس فاصله ژنتیکی Nei's

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Kazachstania sp. IMBBRI-1</i>	100.00							
2 <i>Kazachstania sp. IMBBRI-3</i>	93.79	100.00						
3 <i>S.cerevisiae strain LN</i>	90.34	91.38	100.00					
4 <i>S.cerevisiae strain YG3-2</i>	91.01	92.09	88.70	100.00				
5 <i>S.cerevisiae</i>	56.96	60.13	53.85	55.06	100.00			
6 <i>S.cerevisiae strain YG3-1</i>	55.69	58.08	53.01	55.03	96.17	100.00		
7 <i>Kazachstania sp.</i>	57.99	59.17	53.57	55.81	90.61	89.58	100.00	
8 <i>Kazachstania sp. IMBBRI-2</i>	54.72	57.23	52.23	53.12	86.52	87.85	85.79	100.00

شکل ۳. درصد تشابهات نوکلئوتیدی ما بین نمونه‌های مخمر تحت مطالعه.

استقرار در روده میزبان را داشته باشد (Andlid et al., 1995). یافته‌های تحقیق حاضر از این جهات نیز می‌تواند مورد تأیید قرار گیرد؛ چرا که تنوع سویه‌ای قابل ملاحظه- ای از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در روده ماهیان مورد مطالعه، یافت شد.

چندین سویه از جنس قزاقستانیا در این تحقیق شناسایی شد؛ به طوری که این شناسایی برای اولین بار در جهان در فلور روده ماهی قزل آلا انجام شده و جنس قزاقستانیا از خانواده *Saccharomycetaceae* است و در سال ۱۹۷۱ برای اولین بار با نام *Kazachstania viticola* از محصولات تخمیری انگور در قزاقستان خالص سازی شد (Zubkova, 1971). جنس قزاقستانیا کاربردهای مفید زیادی دارد (Mu et al., 2010) این جنس یکی از انواع مخمرهای موثر در تولید دانه‌ی کفیر با گونه‌های شناخته شده *K. exigua* و *K. unispora* مطرح هستند (Zhou et al., 2013). علاوه بر گونه‌های فوق وجود گونه‌ی *K. unispora* در کومیس (Koumiss)، که نوعی نوشیدنی تخمیری شیر است، به اثبات رسیده است (Mu et al., 2010). پیش از این نیز

۴. بحث و نتیجه گیری

بر اساس مطالعات انجام شده در این تحقیق، تنوع زیادی از گونه‌ها و سویه‌های جنس ساکارومایسس در ماهیان قزل آلا مشاهده شد؛ این در حالی است که در این تحقیق از مخمرهای تک سلولی در جیره غذایی ماهیان قزل آلا مورد بررسی استفاده نشده بود. پیش از این بر اساس تحقیقات اولیه انجام شده، در خصوص فلور طبیعی روده ماهیان قزل آلا مشخص شده بود که تنوع زیادی از مخمرهای تک سلولی به عنوان فلور (ثابت یا موقت) در روده این دسته از موجودات وجود دارند (Gatesoupe, 2007). در این تحقیق نشان داده شده است که تنوع گونه‌ای و سویه‌ای مخمری روده ماهیان قزل آلا فراتر از حد پیش‌بینی شده است. محققان ثابت کردند که مخمرها توانایی استقرار در روده‌ی ماهی قزل آلا رنگین کمان را دارند. استقرار مخمرها در روده آبزیان می‌تواند به دنبال یکبار مصرف آنها و از طریق آب پرورشی یا غذا باشد. اهمیت این موضوع ناشی از آن است که پروبیوتیک‌ها برای اینکه بتوانند خواص خود را ظاهر نمایند، باید توانایی

از منابع مختلفی همچون آب (Safar et al., 2010)، خاک (Chen et al., 2009) و انگور (Nisiotou and Nychas, 2013) جدا سازی و شناسایی شده بودند. وجود *K. jiaianicus* از خاک‌های نواحی Jiain Hualein از چین (Lee et al., 2008) و *K. jiaianicus sp.* از خاک‌های تایوان گزارش شده است (Ching et al., 2007). در حالی که جنس ساکارومایسس در هر دوی نواحی غربی و شمال شرق تایوان گزارش شد (Tienand Wang, 2004) البته *S. yakushimaensis* گونه دیگری است که از خاک‌های جزیره Yaku Island ژاپن گزارش شده است (Mikata et al., 2011). گونه های از جنس قزاقستانیا نیز حتی به عنوان فلور روده خوکیچه‌ها (Vladimir et al., 2008) و فلور روده‌ی حشرات نیز معرفی شده‌اند (Suh and Zhou, 2011). دیگر مطالعات انجام شده توانستند تاکنون گونه‌ها و سویه‌های مختلفی از این جنس را به عنوان جمعیت‌های پاتوژن و یا غیر پاتوژن شناسایی نمایند (Lu et al., 2004; Wu and Bai, 2005; Imanishi et al., 2007; Limtong et al., 2007).

تاکنون مطالعات با استفاده از تعیین توالی ژنهای مختلف نواحی (18S, 26S and 5.8S-ITS) توانسته سویه‌های مختلفی از جنس قزاقستانیا را از منابع مختلف شناسایی کند (Aspasia et al., 2008; Fabio et al., 2012). با همه این اطلاعات؛ تعداد تحقیقات انجام یافته بر روی شناسایی مخمرهای دریایی بسیار محدود بوده، اطلاعات در این خصوص بسیار ناقص است (Kutty and Philip, 2008). مخمرهای دریایی محدود به یک جنس و خانواده نبوده بلکه شامل گونه‌هایی وسیعی از تعداد زیادی جنس مشهور با نام‌های *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* هستند (Kutty and Philip, 2008). بر اساس مطالعات انجام شده، انواعی از گیاهان آبی محیط مناسبی برای پیدا نمودن جمعیت‌هایی از مخمرهای تک سلولی هستند (Lopez et al., 2009; Whittman, 2000) که گونه‌ها و سویه‌هایی از *S.*

unispuruslike در آن یافت می‌شود. اولین گزارش بر مشاهده *Kazachstania jiaianicus* در مطالعه آب‌های نواحی ساحلی شمال شرق تایوان حاصل شد (Yi-Sheng et al., 2009). از گونه‌های دیگر شناسایی شده از این جنس در محیط‌های آبی *K.aquatica*, *K.unispora*, *K.aerobia*, *K.servazzii* و *K.solicol* است (Limtong et al., 2007).

نکته قابل توجه مطالعات انجام شده، این است که تا سال ۲۰۰۷ بیشتر تحقیقات در خصوص بررسی تنوع مخمرهای روده آبزیان توسط Gatesoupe (۲۰۰۷) انجام شده، متعاقب آن بخش عمده‌ای از تحقیقات بر روی استفاده از مخمرهای تک سلولی به عنوان مکمل غذایی آبزیان معطوف شد؛ این در حالی است که تعداد کمی از مطالعات بر روی شناسایی تنوع مخمرهای فلور طبیعی آبزیان انجام شده است (Paola and Dariel, 2014). بدین ترتیب اطلاعات بسیار کمی در مورد تنوع فلور مخمری آبزیان مختلف وجود داشته، عمده نتایج حاصل شده از بررسی تنوع این مخمرها در محیط‌هایی غیر از فلور روده آبزیان و حتی آب محیط رشد آنها است.

شناسایی مخمرهای موجود در فلور آبزیان، حائز اهمیت است؛ چرا که این مخمرها در افزایش کیفیت و رشد بهینه‌ی آبزیان به دلیل اثر پروبیوتیک برخی گونه‌های مخمری، همچنین کاهش هزینه‌های درمان و نگهداری آبزیان موثر هستند. بررسی فلور مخمری روده ماهیان قزل آلا در ایران برای اولین بار در این تحقیق انجام شد و همچنین برای اولین بار در جهان جنس قزاقستانیا از فلور طبیعی روده ماهی قزل آلا شناسایی شد.

تاکنون مخمرها در انواعی از محیط‌ها شامل آبشش-ها، دهان، مدفوع، روده و پوست آبزیان شناسایی شده‌اند. این مخمرها می‌توانند در استخرهای پرورشی ماهیان نیز یافت شوند. بیشتر این مطالعات بر اساس توانایی رشد آنها بر روی محیط‌های کشت مختلف است نه بر اساس روش-های مولکولی (Slavikova and Vadkertiova, 1995). بر اساس مطالعات انجام شده در سال 1993 تنها مخمرهای گزارش شده در فلور روده آبزیان *Candida* و *S. cerevisiae* بود (Bardócz et al., 1993). دیگر مطالعات تکمیلی حاکی از آن است که به‌طور کلی

از منابع مختلفی همچون آب (Safar et al., 2010)، خاک (Chen et al., 2009) و انگور (Nisiotou and Nychas, 2013) جدا سازی و شناسایی شده بودند. وجود *K. jiaianicus* از خاک‌های نواحی Jiain Hualein از چین (Lee et al., 2008) و *K. jiaianicus sp.* از خاک‌های تایوان گزارش شده است (Ching et al., 2007). در حالی که جنس ساکارومایسس در هر دوی نواحی غربی و شمال شرق تایوان گزارش شد (Tienand Wang, 2004) البته *S. yakushimaensis* گونه دیگری است که از خاک‌های جزیره Yaku Island ژاپن گزارش شده است (Mikata et al., 2011). گونه های از جنس قزاقستانیا نیز حتی به عنوان فلور روده خوکیچه‌ها (Vladimir et al., 2008) و فلور روده‌ی حشرات نیز معرفی شده‌اند (Suh and Zhou, 2011). دیگر مطالعات انجام شده توانستند تاکنون گونه‌ها و سویه‌های مختلفی از این جنس را به عنوان جمعیت‌های پاتوژن و یا غیر پاتوژن شناسایی نمایند (Lu et al., 2004; Wu and Bai, 2005; Imanishi et al., 2007; Limtong et al., 2007).

تاکنون مطالعات با استفاده از تعیین توالی ژنهای مختلف نواحی (18S, 26S and 5.8S-ITS) توانسته سویه‌های مختلفی از جنس قزاقستانیا را از منابع مختلف شناسایی کند (Aspasia et al., 2008; Fabio et al., 2012).

با همه این اطلاعات؛ تعداد تحقیقات انجام یافته بر روی شناسایی مخمرهای دریایی بسیار محدود بوده، اطلاعات در این خصوص بسیار ناقص است (Kutty and Philip, 2008). مخمرهای دریایی محدود به یک جنس و خانواده نبوده بلکه شامل گونه‌هایی وسیعی از تعداد زیادی جنس مشهور با نام‌های *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* هستند (Kutty and Philip, 2008). بر اساس مطالعات انجام شده، انواعی از گیاهان آبی محیط مناسبی برای پیدا نمودن جمعیت‌هایی از مخمرهای تک سلولی هستند (Lopez et al., 2009; Whittman, 2000) که گونه‌ها و سویه‌هایی از *S.*

IMBBRI-3 sp. به عنوان فلور روده‌ی ماهی قزل‌آلا اثبات گردید.

گزارش‌های پیش از این حاکی از این موضوع هستند که مخمرهای تک‌سلولی نمی‌توانند به عنوان فلور دائمی جانوران مطرح باشند. بررسی فلور مخمری روده ماهیان قزل‌آلا در ایران برای اولین بار در این تحقیق انجام شد و همچنین برای اولین بار در جهان جنس قزاقستانیا از فلور طبیعی روده ماهی قزل‌آلا شناسایی شد. با توجه به تنوع سویه‌های مشاهده شده در تحقیق حاضر و همچنین برخی گزارش‌ها و با استناد به توان رشد و سازگاری مخمرها در هر محیطی و همچنین توانایی آنها به تثبیت در فلور روده آبزیان و اثرات مثبت آنها بر روی سیستم گوارشی و ایمنی آبزیان می‌توان پیش‌بینی نمود، مخمرها می‌توانند به صورت دائمی به عنوان فلور روده آبزیان حضور داشته باشند. این تحقیقات همچنین این نکته را نشان دادند که تعدادی از مخمرهای تک سلولی قادرند به صورت فلور طبیعی دستگاه گوارش آبزیان مطرح شوند و تأمین کننده بقاء مناسب این موجودات شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان با تلفیقی از روش‌های میکروبی کشت و مولکولی می‌توان فلور مخمری روده آبزیان را شناسایی نموده و پس از بررسی دقیق اثرات و ویژگی‌های آنها در آینده در تحقیقات بیوتکنولوژیک از آنها استفاده کرد.

منابع

براون، ل. ۱۳۸۰. آبی‌پروری برای دامپزشکان، مدیریت پرورش ماهی و بیماری‌ها. ترجمه، رحیم پیغان، مهرداد عبدالله مشایی. انتشارات دانشگاه چمران. ۹۱۶ ص.

جانسون، تد. آر. و کیس، ک.ل. ۱۳۸۱. آزمایش‌های میکروبی شناسی عمومی. ترجمه، ناصر گل‌بانگ. دانشگاه اصفهان. ۲۶۸ ص.

دیب، ک. ۱۳۹۰. اصول قارچ شناسی پزشکی. موسسه فرهنگی انتشاراتی شاهد و ایثارگران دانشگاه علوم پزشکی ارومیه. ۲۱۸ ص.

مخمرهای جدا شده از روده‌ی آبزیان به دو شاخه مجزا از سلسله قارچ‌ها تعلق دارند که عبارتند از *Ascomycota* که در بین آنها مهم‌ترین خانواده *Saccharomycetaceae* است و *Basidiomycota* که شامل مخمرهای *Rhodotorula* می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده، گونه‌ی غالب مخمر در آبزیان آب شور و آب شیرین، مخمر قرمز رنگ *Rhodotorula* است؛ در حالی که بیشتر تحقیقاتی که در مورد ماهی قزل‌آلی رنگین‌کمان صورت گرفته است، نشان می‌دهد که مخمرهای *Debaryomyces hansenii* فلور غالب است اما سایر محققین اظهار داشتند که مخمرهایی مثل *Candida*، *S. cerevisiae* و *Leucosporidium* فلور غالب روده ماهی قزل‌آلی رنگین‌کمان هستند (Gatesoupe, 2007). مطالعات نشان داده‌است که مخمرهای روده ماهیان قزل‌آلی می‌توانند به صورت پایا در مخاط روده ماهی رشد کنند (Andlid et al., 1998) که این ویژگی می‌تواند به ساختار سطح سلولی آب دوست سلول‌ها (Vázquez et al., 1994) و حتی سویه‌های مختلف این مخمرها ربط داده‌شود (Andlid et al., 1998). بر اساس این مطالعات تراکم مخمرهای تک سلولی روده آبزیان نیز تا 10^6 CFU/g پیش‌بینی شده‌است (Gatesoupe, 2007).

در این تحقیق نشان داده شده‌است که تنوع گونه‌ای و سویه‌ای مخمری روده‌ی ماهیان قزل‌آلی از حد پیش‌بینی شده بیشتر است. با توجه به مطالعات انجام شده و اطمینان از عدم استفاده از جیره غذایی مخمری در غذای ماهیان نمونه برداری شده در تحقیق حاضر، بررسی انجام شده نهایتاً توانست با قطعیت وجود چندین سویه، گونه و جنس از مخمرهای تک سلولی را شناسایی نماید. با توجه به یافته‌های این تحقیق علاوه بر سویه‌های مختلفی از جنس مخمری ساکارومایسیسه نام‌های *S. cerevisiae* strain LN، *S. cerevisiae* strain YG3-1، *Kazachstania sp. IMBBRI-1*، *Kazachstania sp. IMBBRI-2*، *Kazachstania* که از محتویات فلور روده‌ی ماهیان قزل‌آلی رنگین‌کمان شناسایی شد؛ برای اولین بار وجود سویه‌های

- Alani, B., Zarghami, N., Jabbarzadeh, S., Rahbani, M. and Mashayekhi, M., et al., 2004. Using random amplified polymorphism DNA (RAPD) technique for DNA polymorphism in isolated strains of *Fusarium oxysporum*. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences.
- Andlid, T., Vazquez-Juarez, R. and Gustafsson, L. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout, *Salmo gairdneri* and turbot, *Scophthalmus maximus*. Microb Ecol. 30:321-334.
- Andlid, T., Vazquez-Juarez, R. and Gustafsson, L. 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. Mol Mar Biol Biotech. 7(2) 115-26.
- Aspasia, A.N. and George, J.E. 2008. *Kazachstania hellenica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast from a Botrytis-affected grape must fermentation. IJSEM. 58, 1263-1267.
- Baghbani, A.F., Tajbakhsh, M., Hashemi, S.A., Rajaei, B., Siadat, S.D. and Aghasadeghi, M., et al., 2012. Molecular Typing of *Salmonella paratyphi* B and *Salmonella paratyphi* C Isolates from Clinical Samples in Iran. Journal of fasa University of Medical Sciences., 1, 19.
- Bardócz, S. 1993. The role of dietary polyamines. Eur J Clin Nutr. 47:683-690.
- Black, J.G. 1999. Microbiology: Principles and Explorations Marymount University. Prentice Hall Books. 896 p.
- Chen, R., Wei, S.C., Jiang, Y.M., Wang, Q.M. and Bai, F.Y. 2009. *Kazachstania taianensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from orchard soil. Antonie Van Leeuwenhoek. 95(4):335-41.
- Deak, T., Chen, J. and Beuchat, L.R. 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. AEM. 4340-4344.
- Fabio, V., Arau', J.O., Carlos,A.R., Larissa, F.D., Freitas, M.A. and Lachance, A. et al., 2012. *Kazachstania bromeliacearum* sp. nov., a yeast species from water tanks of bromeliads. IJSEM. 62, 1002-1006.
- Gatesoupe, F.J. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aqua*. 267(1-4): 20-30.
- Imanishi, Y., Ueda-Nishimura, K. and Mikata, K. 2007. Two new species of *Kazachstania* that form ascospores connected by a belt-like intersporal body: *Kazachstania zonata* and *Kazachstania gamospora*. FEMS Yeast Res 7, 330-338.
- James, C.M. and Makkeya, B.A. 1981. Production of rotifers, *Brachionus plicatilis*, brine shrimp, *Artemia salina* and copepods for aquaculture. Annual research report, Kuwait Institute for Scientific Research: 103-107.
- Kutty, S.N. and Philip, R. 2008. Marine yeasts a review. Yeast 25:465-483.
- Larone, D.H. 2002. Medically important fungi. A Guide to identification. ASM Press. 409 p.
- Lee, C.F., Liu, C.H., Young, S.S. and Chang, K.S. 2008. *Kazachstania jiainicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from soil in Taiwan. FEMS Yeast Res. 8:114-118.
- Lee, C.F., Liu, CH., Young, S.S. and Chang K.S. 2008. *Kazachstania jiainicus* sp.nov. and ascomycetous yeast species isolated from soil in Taiwan. FEMS Yeast Res. 8(1):114-8.
- Limtong, S., Yongmanitchai, W., Tun, M.M., Kawasaki, H. and Seki, T. 2007. *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 57(Pt 2):419-22.
- Lopez, L.C.S., No' brega Alves, R.R. and Rios, R.I. 2009. Microenvironmental factors and the endemism of bromeliad aquatic fauna. Hydrobiologia. 625, 151-156.
- Lu, H.Z., Cai, Y., Wu, Z.W., Jia, J.H. and Bai, F.Y. 2004. *Kazachstania aerobia* sp. nov., an ascomycetous yeast species from aerobically deteriorating corn silage. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 2431-2435.
- Manaffar, R. 2012. Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- Mikata, K., Ueda-Nishimura, K. and Hisatomi, T. 2001. Three new species of *Saccharomyces* sensu lato van der Walt from Yaku Island in Japan: *Saccharomyces naganishii* sp. nov., *Saccharomyces humaticus* sp. nov. and *Saccharomyces yakushimaensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 2189-2198.
- Mu, Z., Yang, X. and Yuan, H. 2010. Detection and identification of wild yeast in Koumiss. Can J Microbiol. 56(9):707-14.
- Nisiotou, A.A. and Nychas, G.J. 2013. *Kazachstania hellenicasp.* nov., a novel

ascomycetous yeast from a Botrytis - affected grape must fermentation. PLoS One. 8(7).

Olmos, J., Paniagua, J. and Contreas, R. 2000. Molecular identification of *Dunaliella sp.* utilizing the 18SrDNA gene. LETT APPL MICROBIOL. 30(1): 80-84.

Paola, N. and Dariel, T.R. 2014. Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. Navarrete and Tovar-Ramírez; licensee InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/57196>.

Paritpokee, S., Hall, G. and Procop, G. 2005. Rapid identification of yeast isolates using BD BBLTM CHROMagarTM Candida. Conference presented American society for microbiology.

Phaff, H.J. and Starmer, W.T. 1987. Yeasts Associated with Plants, Insect and Soil. Pp.123-180. In: The Yeasts, Vol.1. Eds .A.H. Ros and J.S.Hamilton Academic, London.

Safar, S.V., Gomes, F.C., Marques, A.R., Lachance, M.A. and Rosa, C.A. 2010. *Kazachstania rupicolasp.* nov., a yeast species isolated from water tanks of a bromeliad in Brazil. Int J Syst Evol Microbiol. 60(Pt 6): 1473-6.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immune stimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 125-139.

Slavikova, E. and Vadkertiova, R. 1995. Yeasts and yeast-like organisms isolated from

fish-pond waters. Acta microbiologica Polonica. 44(2) 181-9.

Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. 1990. Yeast Technology. Springer-Verlag, Berlin.

Suh, S.O. and Zhou, J.J. 2011. *Kazachstania intestinalis sp.* nov., an ascosporegenous yeast from the gut of passalid beetle *Odontotaenius disjunctus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 100(1):109-15.

Vázquez-Juárez, R., Andlid, T. and Gustafsson, L. 1994. Cell surface hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. Colloids Surf B Biointerfaces. 2(1-3) 199-209.

Vladimir, U., Pawel, J., Robert, P. and Wolfgang, B.S. 2008. Biological diversity of yeasts in the gastrointestinal tract of weaned piglets kept under different farm conditions. FEMS Yeast Res 8.

Whittman, P.K. 2000. The animal community associated with canopy bromeliads of the lowland Peruvian Amazon rain forest. Selbyana. 21, 48-51.

Yi-Sheng, C., Fujitoshi, Y. and Liang-Yu, C. 2009. Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan. Aquatic boil. 55-60.

Zhou, J., Liu, X., Jiang, H. and Dong, M. 2013. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Antonie Van Leeuwenhoek. 104(6): 925-31.

Zubkova, R.D. 1971. Genus novum *Saccharomyceta cearum Kazachstania*. Bot Mater Gerb Inst Bot Akad Nauk Kazakh SSR 7, 53-56 (in Russian).

First report of *Kazachstania* sp. intestinal flora of cultured Rainbow troutArezoo Bageri^{1,3*}, Ramin Manaffar², Sanaz Rahimi^{1,3}

1. Department of Biology, Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Iran
3. Islamic Azad University, Young Researchers Clup, Urmia branch, Urmia, Iran

Abstract

Yeasts, single-celled organisms in the intestinal flora of fish are useful due to their probiotic properties such as production of some antibiotics and vitamins. According to research, great population and species diversity of these unicellular yeasts can be anticipated in the intestine flora. In present study, along with study on species diversity of *Saccharomyces* genus as natural intestines flora of Rainbow trout, several new species similar to *Saccharomyces* genus were detected. Identification of the yeasts flora of rainbow trout by molecular techniques of PCR as well as diffraction media could characterize not only some strain of *Saccharomyces* genus but also a new genus of *Kazachstania* in cultured rainbow trout.

Keywords: *Saccharomyces*, *Kazachstania*, Rainbow trout, Culture media, Yeast.

*Corresponding author, E-mail: arezoo.bageri88@gmail.com