

بررسی فلور مخمری روده ماهیان قزل آلائی پرورشی شهرستان ارومیه با تاکید بر شناسایی جنس‌های *Candida* و *Rhodotorula*، *Saccharomyces*

• رامین مناف‌فر (نویسنده مسئول)

استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

• آرزو باقری

پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

• ساناز رحیمی

پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

• کامبیز دیبا

استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،
دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

تاریخ دریافت: خرداد ۹۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۴

Email: Raminmanaffar@gmail.com



چکیده

مخمرهای تک سلولی بخشی از فلور روده آبزیان می‌باشند. تعدادی از این تک سلولی‌ها مفید و برخی مضر بوده و عامل تعدادی بیماری شناخته شده و ناشناخته می‌باشند. تاکنون هیچ مطالعه جامعی در خصوص شناسایی تنوع فلور مخمری روده ماهیان قزل آلا در ایران انجام نشده است. نظر به اهمیت شناسایی و بررسی امکان استفاده از آن‌ها به عنوان پروبیوتیک‌های بومی، ایزوله سازی و بررسی تنوع مخمرهای فلور روده ماهیان قزل آلائی شهرستان ارومیه با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و افتراقی به همراه روش‌های مولکولی صورت گرفت. نمونه برداری از ۶ سایت مختلف پرورش ماهیان قزل آلا انجام شد. کشت فلور روده با استفاده از محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی *CHA*، *SCC*، *SDA* و *CMA* تا حد شناسایی جنس و گونه مخمرها ادامه یافت. شناسایی قطعی برخی از مخمرها، زمانی که محیط‌های کشت قادر به تفکیک برخی گونه‌ها نشدند، با PCR قطعه کوچکی از ناحیه ITS1 و تعیین توالی محصول PCR صورت پذیرفت. این تحقیق ضمن ارائه مسیر شناسایی فلور مخمری ماهیان قزل آلا توانست گونه‌هایی شامل *Candida guilliermondii*، *Saccharomyces cerevisiae* strain LN، *Saccharomyces cerevisiae* strain YG۳-۱ و همچنین سویه‌هایی از *Rhodotorula* را شناسایی نماید.

کلمات کلیدی: جداسازی، فلور روده، کشت افتراقی، ماهی قزل آلا، مخمر

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 119-127

Study on the intestinal yeast flora of domestic rainbow trout from Urmia city with emphasizing to identification of *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Candida* genuses

By: Manaffar, R., (Corresponding Author) Assistant professor of Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Iran. Bageri, B., Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Iran. Rahimi, S., Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Iran. Diba, K., Assistant professor of Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Iran.

Email: Raminmanaffar@gmail.com

Received: May 2014 Accepted: August 2015

Unicellular yeasts are known as a part of aquatics intestinal flora. Some species are useful and some are known as pathogen for known or unknown diseases. So far any comprehensive study was done to characterize yeast intestine flora of fish in Iran. Due to the importance of isolation and characterization of micro flora of fishes and possibility of introducing this endemic species as Probiotics, in present study, the diversity of the intestinal yeast flora of domestic Rainbow trout fishes of 6 Urmia cities farms was investigated by general and specific diffraction media as SDA, SCC, CHA and CMA following to molecular analyses. Molecular technique of PCR for small fragment of ITS1 was followed by sequencing in order to identifying some complex samples in case of culture methods failure. This study not only succeed to stablish a protocol for characterization of yeast micro flora of fishes but also could identify some species *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* strain LN, *Saccharomyces cerevisiae* strain YG3-1, *Saccharomyces cerevisiae* and also strains of *Rhodotorula*.

Key words: Intestine flora, Isolation, Rainbow trout, Media, Yeast

مقدمه

مخمرها متعلق به زیر شاخه آسکومیست‌ها 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 (۴ و ۲). از نظر مورفولوژیکی مخمرها بر اساس اندازه، شکل سلول، مکانیسم تشکیل سلول دختر، رنگ و قوام کلنی‌ها و تولید یا عدم تولید کپسول طبقه‌بندی می‌شوند. سلول‌های مخمر تنوع فراوانی در اندازه شکل، رنگ و مورفولوژی کلنی دارند، به طوری که سویه‌های خالص از یک مخمر می‌توانند در محیط کشت تنوع شکلی و رنگی را نشان دهند. این تنوع مورفولوژیکی در سلول‌های اختصاصی مخمرها از طریق تغییر در شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت القاء می‌شود (۴).

تاکنون تنوع زیادی از محیط‌های کشت بر اساس نیازهای فیزیولوژیکی مخمرهای مختلف تعریف و ساخته شده است (۳). مخمرها را می‌توان همانند باکتری‌ها با استفاده از محیط‌های کشت مختلف که بر اساس نیازهای غذایی و فیزیولوژیک گونه‌های مختلف مخمر ساخته شده است شناسایی نمود (۳). از چنین محیط‌های کشتی می‌توان به محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) (Sabouraud dextrose agar) (حاوی پپتون، دکستروز یا گلوکز و آگار)، محیط SC (حاوی کلرامفنیکل به میزان ۰٫۰۵ درصد در محیط سابورو دکستروز آگار)، محیط مایکوزیل آگار

(MA) (Mycosel Agar یا SCC) (حاوی سیکلوهاگزامید در محیط SC) اشاره نمود. همچنین می‌توان از محیط‌های کشت اختصاصی همانند محیط CHA (CHROMagar Candida Medium) که حاوی سوبستراهای کروموزنیک (حاوی رنگ ویژه شناسایی مخمرهای) و محیط CMA (Corn meal Agar) (شناساگر مخمرها بر اساس ظاهر میکروسکوپی اشکال سودوهایف و بلاستوکونیدی) اشاره نمود. مخمرها غیر از حضور در محیط‌های آزاد مختلف می‌توانند به عنوان فلور روده آبزیان و در کل موجودات مختلف مطرح باشند. مطالعات انجام شده تراکم مخمرهای تک سلولی روده آبزیان را تا حد 10^7 CFU/g پیش‌بینی کرده است (۱۱). نظر به مفید بودن تعدادی از این مخمرهای تک سلولی، برخی از گونه‌ها به عنوان جیره غذایی نیز کاربرد فراوانی در پرورش لارو و انواع گونه‌های بالغ آبزیان را دارند (۸ و ۱۹). هدف از این تحقیق ضمن بررسی فلور مخمیری روده ماهیان قزل‌آلا، ارائه بهترین و ساده‌ترین پروتکل کشت و شناسایی مخمرهای تک سلولی روده ماهیان قزل‌آلا با ترکیبی از روش‌های کشت افتراقی و مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

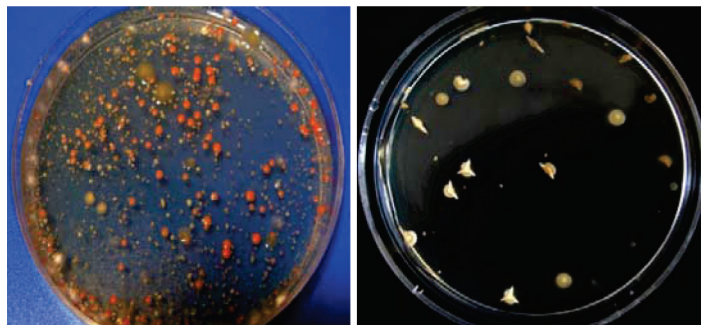
نمونه‌برداری ماهیان از ایستگاه‌های نمونه‌برداری در تابستان ۱۳۹۲ انجام شد. بدین منظور تعداد ۱۸ قطعه از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن

در مراحل مولکولار استفاده شد. به دلیل دور بودن مسافت محل‌های نمونه‌برداری از محل انجام آزمایش، و به منظور جلوگیری از خفگی نمونه‌ها در اثر کمبود اکسیژن حین انتقال؛ نمونه‌ها پس از صید در همان روز در داخل یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و بلافاصله مورد کالبد شکافی قرار گرفتند. به منظور تشریح، ابتدا سطح بدن

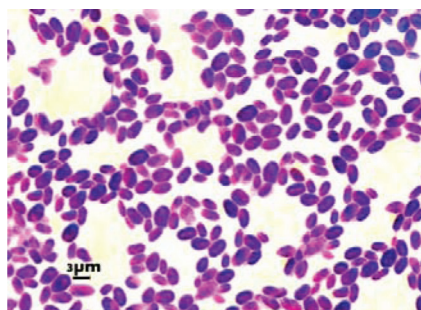
تقریبی ۲۳۵ گرم از ۶ ایستگاه (مزرعه) پرورش ماهی استان (از هر ایستگاه ۳ نمونه) جمع‌آوری شد (جدول ۱). در این تحقیق برای نمونه‌ی استاندارد از سویه‌ی صنعتی *S. cerevisiae* strain YG3-2 با نام تجاری مخمر خوزستان تولید شده در کارخانه مخمرسازی اهواز- خوزستان به منظور بررسی و مقایسه شکل کلنی در مراحل میکروبی و به عنوان کنترل مثبت

جدول ۱- اسامی مزارع پرورش ماهی در شهرستان ارومیه

نام کارگاه پرورش ماهی	آدرس ایستگاه
ماهی سرای غلام پور متین	میرشکارلو
ماهی سرای رشد کن رضایی	جاده اشنوبه
مزرعه قائم وزیری	جاده بالانوش - 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



شکل ۱- اشکال متنوع مجموعه کلنی‌های رشد یافته در محیط SDA با روش کشت pureplate



شکل ۲- سلول‌های مخمری در رنگ‌آمیزی گرم در درشت‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ

۴۸-۲۴ ساعت انجام شد. در نهایت شناسایی دقیق مخمرها به وسیله رنگ آمیزی گرم نمونه‌ها محقق شد (۱۰) (شکل ۲).

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 صورت می‌پذیرد؛ اما به منظور ظاهر شدن رنگ اختصاصی تولید شده توسط هر گونه و با توجه به خصوصیات خود محیط کشت CHA، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید تا واکنش شیمیایی تولید رنگ اختصاصی کامل شود. با توجه به اینکه گونه‌های مختلف مخمر در محیط‌های کشت مختلف تنوعی از رنگ‌های 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 (۲۱) (شکل ۳).

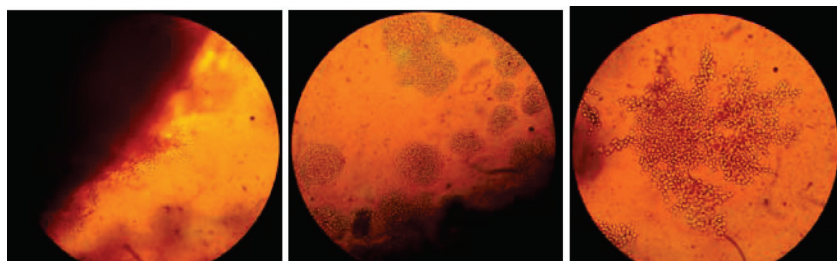
کشت در محیط کشت CMA با روش کشت دالمائو (Dalmau Method) انجام شد. بدین منظور در نوک آنس مقدار کمی از کلنی مخمر به صورت دو خط موازی نزدیک به هم داخل آگار تلقیح شد. در این متد عمق شیارها به قدری باید باشد که آگار پاره نشود. در نهایت لامل استریلی را روی خطوط تلقیحی قرار داده شد و سپس در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون انجام شد (۱۷). در این مرحله

ماهی با استفاده از الکل ۷۰ درصد پاک شده و ناحیه بین دو باله شکمی به طرف جلو تا حفره پریکاردیومی برش داده شد (۱). محتویات روده به کمک پنس استریل از روده خارج شد. به دلیل جامد بودن محتویات و تراکم بالای میکروارگانیسم‌های موجود در فلور روده؛ ۰/۵ گرم از این محتویات در کنار شعله وزن و بعد داخل لوله‌ی حاوی ۴/۵ میلی‌لیتر سرم فیزولوژی استریل، حل شد (برای تهیه محلول stock)؛ این محلول با سمپلر مخلوط گشت، سپس از آن رقت‌های ۱-۱۰، ۲-۱۰، ۳-۱۰ و ۴-۱۰ تهیه شد (۲). رقت‌های سریال تهیه شده در پلیت‌های استریل جداگانه با روش پورپلیت (Pureplate Method) در محیط SDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند (۲) (شکل ۱). پس از رشد کلنی مخمرهای تک‌سلولی نمونه‌ها بر اساس شکل کلنی‌های ایجاد شده دسته‌بندی شده و مرحله دوم کشت به منظور جداسازی آن‌ها انجام شد. در مرحله بعدی با انتخاب کلنی‌های کاملاً مستقل و مجزا، کشت سطحی گسترده بر روی محیط SDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ انجام شد (۷).

ایزوله‌سازی تک کلنی‌های مخمر از کلنی‌های باکتریایی و قارچ‌های ساپروفیت با کشت مجدد بر روی محیط کشت (SCC) MA با روش کشت سطحی گسترده (Streak method) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت



شکل ۳- تنوع رنگ‌های مشاهده شده بر روی محیط کروموزنیک



شکل ۴- تنوع سودوهایف‌های مشاهده شده بر روی محیط CMA

نتایج

نتایج اولیه بررسی کلنی‌های حاصل شده بر روی محیط‌های کشت مختلف نشان داد که در مجموع ۳۹ کلنی مخمر از کشت محتویات روده مخمرها حاصل شده است. این بررسی در ابتدا موفق به شناسایی جنس *Rhodotorula* گردید. در محیط کشت SDA کلنی‌های این جنس با رنگ صورتی مایل به نارنجی با قوام موکوسی مشاهده شدند در حالی که بر روی محیط کشت CHA رنگ کلنی‌ها صورتی تیره و در محیط کشت CMA توده‌های بلاستوکونیدی مشهود بودند (شکل ۵).

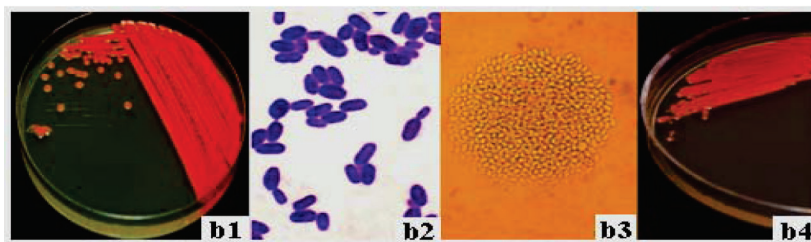
بررسی میکروسکوپی شکل سودوهایف یکی از کلنی‌های مخمری در محیط CMA و بررسی رنگ کلنی آن در محیط CHA موجب شناسایی جنس *Candida* و گونه *C. guilliermondii* بصورت قطعی گردید. در این محیط کشت، سودوهایف این مخمر به شکل شاخه‌دار مشاهده شد (شکل ۶).

در این تحقیق کشت افتراقی با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی توانست دلایل مشابهی در خصوص وجود گونه‌های جنس *Saccharomyces* و گونه *C. glabrata* حاصل نماید. بدین ترتیب ویژگی‌های یکسان هر دوی این مخمرهای احتمال وجود هر دو را در محیط کشت قطعی نمود. بر اساس نتایج حاصل هر دو گونه در محیط‌های کشت CHA کلنی‌های به رنگ ارغوانی روشن مایل به بنفش و در محیط کشت SDA به صورت کلنی‌های سفید تا رنگ کرمی با قوام خمیری ظاهر یافتند (جدول ۲). مشاهدات میکروسکوپی در این کلنی‌های مخمری، رشد یافته در محیط CMA نشان داد که اغلب کلنی‌ها حاوی توده‌های بلاستوکونیدی

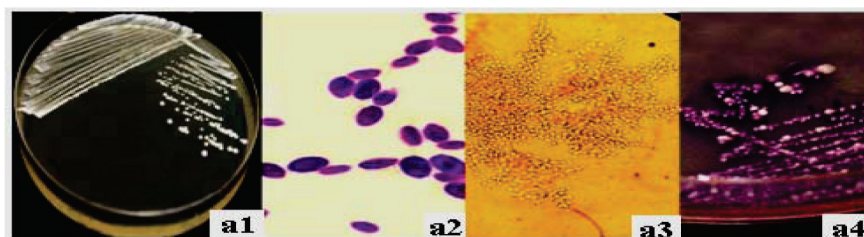
بر اساس ویژگی مورفولوژیکی خاص هر نوع مخمر در محیط کشت CMA کلنی‌ها دسته بندی و جداسازی شدند (۳) (شکل ۴).

بررسی‌های مولکولی

به منظور شناسایی برخی جنس‌های مخمر که محیط‌های کشت اختصاصی قادر به شناسایی آن‌ها نیستند از PCR (Polymerase Chain Reaction) و تعیین توالی بخش کوچکی از ناحیه ITS₁ (Internal Transcribed Spacer) استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA از کلنی‌های خالص مخمرهای مورد نظر توسط روش کار SDS-Chloroform استخراج شد (۲۳). PCR با استفاده از یک جفت آغازگر پیشرو 5'-gTCgTAACAAggTTTCCgTAggTg-3' و آغازگر پیرو 5'-CTCCACAgTgTgTTgTATTg-3' انجام شد. برنامه PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی 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 (۲۰). پس از انجام الکتروفورز و مشاهده کیفیت محصول PCR، تعیین توالی انجام شد. جهت بررسی نام و مشابهت توالی‌های حاصل شده با نمونه‌های موجود در بانک ژنی از نرم افزار Blast (Basic Local Alignment Search Tool) مربوط به بسته نرم‌افزاری سایت NCBI استفاده شد.



شکل ۵- بررسی مورفولوژیکی و میکروسکوپی جنس *Rhodotorula* در انواع محیط‌های کشت. به ترتیب b3: CMA (b4: CHA) مشاهده‌ی میکروسکوپی (b1: SDA (b2)



شکل ۶- نتایج مربوط به شناسایی گونه *C. guilliermondii*. به ترتیب (a1) مشاهده‌ی میکروسکوپی (a2) SDA (a3) CMA (a4) CMA

مخمرها ضمن این که می‌توانند به عنوان فلور روده موجودات مطرح باشند می‌توانند به عنوان یک منبع پروتئینی در رژیم غذایی برخی موجودات همچون انسان، دام و طیور و آبزیان استفاده شوند به طور مثال استفاده از مخمر نان در چندین پروژه تحقیقاتی برای تولید میگو آب شور نتایج درخشانی را داشته است (۱۳). بطور مثال از نوعی مخمر شبیه کاندیدا با نام علمی *Kluyveromyces sp.* در تغذیه انواع مختلفی از موجودات آبی استفاده شده است (۱۸). *Phaffia rhodozyma* از تولید کنندگان استاگزانتین محسوب می‌شود که به عنوان مکمل در کنار برخی مخمرهای دیگر در غذای ماهیان آزاد و میگوهای پرورشی استفاده می‌شود (۲۶).

در سال ۱۹۹۳ تنها مخمرهای گزارش شده در فلور روده آبزیان شامل *Candida* و *Saccharomyces cerevisiae* بودند (۶). دیگر مطالعات تکمیلی حاکی از آن است که به طور کلی مخمرهای جدا شده از روده آبزیان به دو شاخه مجزا از سلسله قارچ‌ها تعلق دارند که عبارتند از: الف) *Ascomycota* که در بین آن‌ها مهم‌ترین خانواده *Saccharomycetaceae* می‌باشد و ب) *Basidiomycota* که شامل مخمرهای قرمز رنگ *Rhodotorula* است. گونه غالب مخمر در آبزیان آب شور و آب شیرین *Rhodotorula* است، در حالی که بیشتر تحقیقاتی که در مورد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفته است نشان می‌دهد که مخمرهای *Debaryomyces hansenii* فلور غالب می‌باشد. البته مطالعات Gatesoup (۱۱) چهار جنس مختلف دیگر از مخمرها با نام‌های *Filobasidium*، *Kluyvermyces*، *Yarrowia* و

بدون شاخه‌های بلند می‌باشند. شکل ۷ مقایسه شباهت کلنی جنس *Saccharomyces* و گونه *C. glabrata* را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی‌های مولکولی

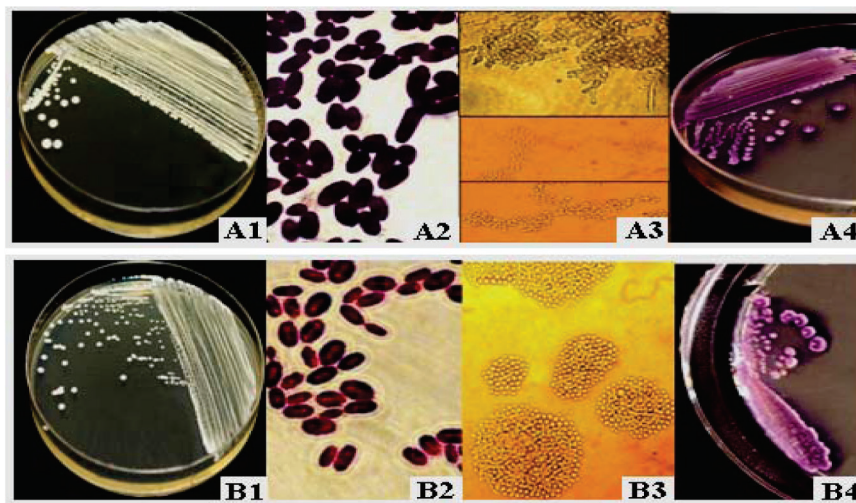
تعیین توالی انجام شده و بررسی مطابقت آن با نمونه‌های بانک ژنی به روش Blast نشان داد با بالاترین درصد همپوشانی (بیش از ۹۵ درصد) تمامی نمونه‌های تعیین توالی شده به عنوان سویه‌هایی از گونه *Saccharomyces cerevisia* قابل شناسایی می‌باشند (شکل ۸). بر اساس این بخش از مطالعه دلیلی بر وجود گونه *C. glabrata* در بین نمونه‌های مخمر یافت نشد. این بررسی همچنین نشان داد تنوع زیادی در بین گونه‌های مخمر *Saccharomyces cerevisia* یافت شده در بین نمونه‌های مختلف ماهی وجود داشته و اصولاً سویه‌های متنوعی از این مخمر در ماهیان مورد مطالعه یافت شد.

بحث و نتیجه‌گیری

تا امروز حدود ۷۰۰ گونه مخمر متعلق خانواده مخمرهای تک‌سلولی توصیف شده است. با توجه به کاربردهای بسیار وسیع مخمرها در صنعت تاکنون محیط‌های کشت مختلفی برای شناسایی آن‌ها ارائه شده (۲۵). با وجود انواع مختلف محیط‌های کشت اغلب گونه‌های مخمری دارای صفات مورفولوژیک و ویژگی‌های رشد نزدیک به هم هستند که کار شناسایی آن‌ها را بسیار سخت می‌نماید (۴).

جدول ۲- نمونه‌ای از بررسی تنوع مخمرهای کشت یافته در محیط کشت CHA بر اساس صفات مورفولوژیک و رنگ کلنی

ایستگاه نمونه برداری	رنگ کلنی پس از ۲۴ ساعت	رنگ کلنی پس از ۴۸ ساعت
سرو	بنفش و صورتی	بنفش
بالانوش	صورتی	بنفش
اشنویه	صورتی و سفید	بنفش
میرشکارلو	صورتی و سفید	بنفش
سرو	بنفش	بنفش
میرشکارلو	صورتی	بنفش
زیوه	صورتی و بنفش	بنفش
میرشکارلو	سفید کرمی	صورتی
بالانوش	سفید	بنفش
زیوه	بنفش و سفید	بنفش
زیوه	سفید	بنفش و صورتی
اشنویه	صورتی و سفید	بنفش
میرشکارلو	صورتی	صورتی



شکل ۷- شباهت های مشاهده شده بین جنس های مختلف مخمر مشاهده شده در این تحقیق به ترتیب:

CHA (A4 CMA (A3 مشاهده میکروسکوپی (A2 SDA (A1 Saccharomyces (A
CMA B4) CHA B3) مشاهده میکروسکوپی (B2 SDA (B1 :C. glabrata (B

S.cerevisiae/strain/LN	---GGTTTT--ATTGTCCTA--TAACAA-AAGCACAGAAATCTCTCAC	41
S.cerevisiae/strain/YG3-2	--CGGGTTTT--AATTGTCCTA--TAACAA-AAGCACAGAAATCTCTCAC	43
S.cerevisiae	CCCCGCCCTCCATTGCTCTTTACTAACAATAACCACAGAT-TCTCTCAC	49
S.cerevisiae/strain/YG3-1	CCGGGCGTCCCTACTTCTCCT---TTACCSTAAACACAGTTTTCTCTCAC	47
	* * * * *	
S.cerevisiae/strain/LN	CGTTTGGAAATAACAAAAAATACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACT	91
S.cerevisiae/strain/YG3-2	CGTTTGGAAATAACAAAGAAAGAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACT	93
S.cerevisiae	CGTTTGGAAATAGCAAAAAAGAACTTACAAGCCTAGAAAGACCGCGCACT	99
S.cerevisiae/strain/YG3-1	GGTTTGGAAATAGCAGAAA--GAACCTTACA-GCCTAGCAAGACCGCGCACT	94
	***** * * * * *****	
S.cerevisiae/strain/LN	TAAGCGCAGGCCCGGGTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAATAA	141
S.cerevisiae/strain/YG3-2	TAAGCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCAGTAA	143
S.cerevisiae	TAAGCGCAGGCCCGGGTGGACTCTCCATTTCTTGTCTTCTTGCCAGAAA	149
S.cerevisiae/strain/YG3-1	TTAGGGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTTTTGTCTTCTTGCCAGTAA	144
	* * ***** * ***** * *	
S.cerevisiae/strain/LN	AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATAATCCC-----	181
S.cerevisiae/strain/YG3-2	AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATAATCCTTTTTAAATT	193
S.cerevisiae	AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATAATCCTTTTTCTAAATT	199
S.cerevisiae/strain/YG3-1	AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATAATCCTTT-----	187
	***** * *	
S.cerevisiae/strain/LN	-----	
S.cerevisiae/strain/YG3-2	TTTTTTTTTTTTTGAAAAGGCCCTCCCGGGG	225
S.cerevisiae	TTTTTTTTTT-----	209
S.cerevisiae/strain/YG3-1	-----	

شکل ۸- توالی مرتب شده مخمرهای Saccharomyces cerevisiae وجود ستاره نشان دهنده شباهت نوکلئوتیدی بین ۴ نمونه می باشد.

تکنولوژی ساخت محیط‌های کشت اختصاصی، همچنین ابداع روش‌های نوین کشت و جداسازی موجودات تک‌سلولی هنوز هم احتمال حذف بخش قابل توجهی از جامعه مخمرها، که قابلیت کشت در محیط‌های کشت مصنوعی را ندارند (unculturable)، وجود دارد (۱۶). زیرا در طی این تحقیق مشاهده شد که در برخی مراحل امکان رشد، دو گونه یا سویه مخمر در یک کلنی کوچک واحد وجود دارد که با تغییر محیط کشت یکی از جمعیت‌ها از دست می‌رفت. شناسایی مخمرهای فلور روده ماهیان قزل‌آلای می‌تواند درک بهتری در خصوص مشاهده برخی نارسایی‌ها و بیماری‌های ناشناخته ماهیان قزل‌آلای حاصل نماید. همچنین در صورت تأیید خواص مفید مخمرهای ایزوله شده در این تحقیق می‌توان در آینده از آنها به عنوان مکمل غذایی و پروبیوتیکی در ماهیان قزل‌آلای استفاده نمود.

شناسایی مخمرهای موجود در فلور آبزیان، حائز اهمیت است؛ چرا که تعدادی از این تک‌سلول‌ها که به تک‌یاخته‌های پروبیوتیک معروف هستند، که علاوه بر کمک به گوارش مولکول‌های پیچیده، ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند. این مواد می‌توانند برای گوارش بهینه غذا مفید بوده و در سلامت میزبان و در افزایش کیفیت و رشد بهینه‌ی آبزیان نقش داشته باشند (۵). مطالعات به عمل آمده در خصوص اهمیت مخمرها در دستگاه گوارش موجودات نشان داده است که گونه‌های مختلف می‌توانند نیازهای غذایی متفاوتی داشته و لذا اپتیمم رشد آن‌ها در محیط‌های مختلف اتفاق می‌افتد. نتایج چنین یافته‌هایی که حتی با کشت گونه‌های مختلف مخمرها در محیط‌های کشت مصنوعی مختلف نیز به اثبات رسیده است دلیلی بر یافت چندین گونه و سویه مختلف از مخمرهای تک‌سلولی در این تحقیق در فلور روده یک نمونه فردی از ماهیان می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- ۱- براون، ل. ۱۳۸۰. آبی‌پروری برای دامپزشکان، مدیریت پرورش ماهی و بیماری‌ها. ترجمه، رحیم پیغان، مهرداد عبدالله مشایی. انتشارات دانشگاه چمران. ۹۱۶ ص.
- ۲- جانسون، تد. آر. و کیس، ک. ل. ۱۳۸۱. آزمایش‌های میکروب شناسی عمومی. ترجمه، ناصر گلبنگ (۱۹۴۶). دانشگاه اصفهان. ۲۶۸ ص.
- ۳- دیبا، ک. ۱۳۹۰. اصول قارچ‌شناسی پزشکی. موسسه فرهنگی انتشاراتی شاهد و ایثارگران دانشگاه علوم پزشکی ارومیه. ۲۱۸ ص.
- ۴- واگر، گ. م. ۱۳۹۱. مخمر فیزیولوژی و بیوتکنولوژی. ترجمه پیمان پورنیا، رضا کچوئی. انتشارات جعفری. ۴۸۶ ص.
5. Andlid, T., Vazquez-Juarez, R., and L. Gustafsson. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout, *Salmo gairdneri* and turbot, *Scophthalmus maximus*. *Microbial Ecology* 30: 321-334.
6. Bardócz, S. 1993. The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition* 47: 683-690.
7. Black, J.G. 1999. *Microbiology: Principles and Explorations* Marymount University. Prentice Hall Books 896 p.
8. Bowen, S., Fogarino E., Hitchner K., Dana G., Victor H.S. Chow, Buoncristiani, M., and J. Carl. 1985. Ecological isolation in *Artemia* population differences in tolerance of anion concentra-

از محتویات روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را شناسایی نمود. این مطالعات نشان می‌دهد که تنوع فلور مخمری روده ماهیان قزل‌آلای وابسته به شرایط زیستی موجود می‌باشد.

در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های کشت میکروبی و تکمیلی مولکولی سه جنس و دو گونه از مخمرهای تک‌سلولی به عنوان فلور روده این آبزیان شناسایی شدند. جنس *Rhodotorula* شناسایی شده در این تحقیق به عنوان یک جنس ساپروفیت و یا پاتوژن معرفی گردید زیرا پیش از این تحقیق مشخص شده بود که گونه‌هایی از جنس *Rhodotorula* می‌توانند با رشد بر روی مواد غذایی لایه‌ای لزج و صورتی رنگ ایجاد نمایند که موجب کاهش ارزش محصولات گردند. گونه *Saccharomyces cerevisiae* از معروف‌ترین اعضای جنس *Saccharomyces* می‌باشد که هم به عنوان یک مکمل غذایی مطرح می‌باشد و هم گونه‌هایی از این جنس به عنوان پروبیوتیک با خواص مفید در جانوران مطرح هستند (۱۲). با توجه به اطمینان از عدم استفاده از این مخمر به عنوان مکمل غذایی آبزیان تحت مطالعه و حضور دائمی این جنس و گونه در فلور روده بنظر می‌رسد نظریه قبلی در خصوص غیر دائمی بودن فلور مخمری روده ماهیان قزل‌آلای قابل رد بوده و احتمال پروبیوتیک بودن این گونه افزایش می‌یابد. در خصوص پاتوژن بودن مخمرهای *Candida* و به خصوص گونه *C. albicans* نیز تحقیقات زیادی انجام شده است (۳ و ۱۵). وجود این جنس نیز در فلور روده می‌تواند منشاء تعدادی از بیماری‌ها و مشکلات ناشناخته ماهیان قزل‌آلای معرفی شود. در تحقیق حاضر روش‌های کشت افتراقی و اختصاصی نتوانستند قادر به تشخیص جنس *Saccharomyces* از گونه *C. glabrata* شوند. توانایی روش‌های مولکولی در شناسایی دقیق گونه‌های موجودات بار دیگر در این تحقیق به تأیید رسید. البته غیر از این روش‌های مختلف نیز برای شناسایی مخمرها ابداع و معرفی شده بود که با موفقیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. شناسایی مخمرهای *Candida albicans*، *Candida tropicalis* و *Trichosporon* با استفاده از تست تولید رنگ در محیط کشت CHA (۲۴)، شناسایی کلنی‌های *Candida albicans* با رنگ سبز روشن، *Candida dubliniensis* با سبز تیره و *Candida tropicalis* با رنگ آبی تیره مایل به بنفش از جمله این پیشرفت‌ها می‌باشد (۹، ۱۴ و ۲۷). در این روش کلنی‌های *Candida krusei* به رنگ قرمز روشن با حاشیه‌های سفید تولید می‌شود. این در حالی است که بر اساس نظر برخی محققان، که مطابق با یافته‌های تحقیق حاضر نیز بود، *Candida glabrata* توسط کشت در محیط CHA به تنهایی قابل شناسایی نیست و کلنی‌هایی با مورفولوژی شبیه به *Candida parapsilosis*، *Saccharomyces cerevisiae*، *P. wickerhamii*، *Cryptococcus neoformans* و *C. guilliermondii* ایجاد می‌کنند (۲۴).

در تحقیق حاضر نیز که برای اولین بار تنوع جنس‌های مخمرهای تک‌سلولی روده ماهیان قزل‌آلای پرورشی بومی مورد بررسی قرار گرفت ترکیبی از روش‌های موفق کشت افتراقی و مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق سعی شد ضمن مدون‌سازی روش شناسایی این دسته از میکروارگانیسم‌ها در روده ماهیان قزل‌آلای، تنوع جنس‌های مخمرهای فلور روده ماهیان قزل‌آلای مورد بررسی قرار گیرد. نتایج تحقیق حاضر ضمن نشان دادن توانایی محیط‌های کشت جهت جداسازی مخمرهای تک‌سلولی، ضرورت استفاده از روش‌های مولکولی را برای شناسایی دقیق مخمرها را نشان داد. این نتایج نشان داد با وجود رشد

tions. *Journal of Crustacean Biology* 5:106-129

9. Coleman, D.C., Sullivan, D.J., Bennett, D.E., Moran, G. P., Barry, H.j., and D.B. Shanley. 1997. Candidiasis: The emergence of a novel species, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*. *AIDS*. 11:557-567.
10. Deak, T., Chen, J., and L.R. Beuchat. 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4340-4344.
11. Gatesoupe, F.J. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267 (1-4) : 20-30.
12. Hazen, K.C. 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology*, 8,462-478.
13. James, C.M., and B.A. Makkeya. 1981. Production of rotifers, *Brachionus plicatilis*, brine shrimp, *Artemia salina* and copepods for aquaculture. Annual research report, Kuwait Institute for Scientific Research: 103-107.
14. Kirkpatrick, W.R., Revankar, S.G., Mcatee, R.K., Lopez-Ribot, J.L., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Sanche, S.E., Cantu, R.A., Rinaldi, M.G., and T.F. Patterson. 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3007-3012.
15. Kwon-Chung, K.J., and J.E. Bennett. 1992. Medical Mycology. Lea and Febiger, Philadelphia.
16. Lachance, M.A. 1990. Yeast selection in nature. In Panchal, C.J. Editor. Yeast Strain Selection. Marcel Dekker pp. 21-42.
17. Larone, D.H. 2002. Medically important fungi. A Guide to identification. ASM Press. 409 p.
18. Lavens, P., and P. Sorgeloos. 1991. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361.
19. Manaffar, R. 2012. Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
20. Olmos, J., Paniagua, J., and R. Contreas. 2000. Molecular identification of *Dunaliella sp.* utilizing the 18SrDNA gene. *Letters in Applied Microbiology* 30(1) : 80-84.
21. Paritpokee, S., Hall, G., and G. Procop. 2005. Rapid identification of yeast isolates using BD BBLTM CHROMagarTM Candida. Conference presented American society for microbiology.
22. Phaff, H.J., and W.T. Starmer. 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.
23. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
24. San-Millan, R. Ribacoba, L., Ponton, J., and G. Quindos. 1996. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *European Journal of clinical microbial infection disease* 15:153-158.
25. Spencer, J.F.T., and D.M. Spencer. 1990. Yeast Technology. Springer-Verlag, Berlin.
26. Stones, C.S., and Mills, D.V. 2004. The use of live yeast and yeast culture products in aquaculture. *International Aquafeed* 7 (5), 28-34.
27. Sullivan, D., and D. Coleman. 1998. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *Journal of Clin Microbiology* 36: 329-334.

