

جدا سازی و شناسایی قارچهای بیماریزا و ساپروفیت از ضایعات آبشش کپور ماهیان پرورشی (کپور معمولی؛ کپور نقره‌ای؛ کپور علفخوار)

دکتر فرید فیروزبخش^۱ دکتر حسینعلی ابراهیم زاده موسوی^{۱*} دکتر علیرضا خسروی^۲

دریافت مقاله: ۱۰ اسفندماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۳ دی ماه ۱۳۸۲

Isolation and Identification of Pathogenic and Saprophytic fungi from gill lesions in cultivated Cyprinids (common carp, silver carp and grass carp)

Firouzbaksh, F.,¹ Ebrahimzadeh mousavi, H. A.,¹ Khosravi, A. R.²

¹Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran. ²Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran.

Objective: Isolation and identification of fungi from gill lesions.

Samples: Gill specimens from the common carp (*Cyprinus carpio*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), grass carp (*Ctenopharingodon idella*).

Procedure: The samples were obtained from the five fish farms in Mazandaran province and transferred to mycology laboratory with ice condition. The samples were inoculated in culture media (Sabouraud glucose agar, glucose pepton agar and corn meal agar+ chloramphenicol).

Statistical analysis: Chi-square and t-test.

Results: Thirty-nine species of fungi were isolated from the gill lesions. The most important pathogenic fungi were *Branchiomyces*, *Saprolegnia*, *Fusarium*, *Phoma* and *Exophiala*. The most frequency isolated fungi were *Fusarium* (46.4%) and *saprolegnia* (25%), whereas *Exophiala* (3.6%) was shown the lowest frequency.

Conclusion: This is the first report of isolation of *Branchiomyces*, *Phoma* and *Exophiala* from fish in Iran. It is concluded that the above-mentioned isolated pathogenic fungi may play an important role in fish diseases. Thus, this study should be continued into the future.

J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 60,1:15-19,2005.

Key words: Fungi, Cyprinids, Gill, *Branchiomyces*.

Corresponding author's email: hmosavi@ut.ac.ir

هدف: جدا سازی و شناسایی قارچها از ضایعات آبشش کپور ماهیان پرورشی استان مازندران.

نمونه‌ها: نمونه‌های آبشش از کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپور علفخوار (*idella*) (*Ctenopharingodon*).

روش: ابتدا سطح آبشش توسط آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس قطعاتی از آبشش به روش استریل جدا و پس از نگهداری در لوله‌های استریل، به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از آن در محیطهای سابوروگلوکز آگار و کورن میل آگار کشت داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون مربع کای و آزمون تی.

نتایج: در مجموع ۳۹ گونه قارچ از ضایعات آبشش ماهیان جدا و شناسایی گردید. مهمترین قارچهای بیماریزای جدا شده شامل برانکیومیسیس، ساپروولگنیاها، گونه‌های فوزاریوم، فوما و اگزوفیالا بودند. گونه‌های فوزاریوم (۴۶/۴۰ درصد) و ساپروولگنیا (۲۵ درصد) بیشترین فراوانی را داشتند در حالی که اگزوفیالا (۳/۶ درصد) کمترین فراوانی را در بین قارچهای بیماریزای جدا شده نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه قارچهای برانکیومیسیس، فوما و اگزوفیالا برای اولین بار در ایران از ماهیان جدا شده است. چنین استنباط می‌شود که قارچهای جدا شده در این مطالعه نقش مهمی را در بیماریزایی ماهی داشته باشند. بنابراین برای بررسی این موضوع به مطالعات بیشتری در آینده نیاز است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۱، ۱۹-۱۵.

واژه‌های کلیدی: قارچها، کپور ماهیان، آبشش، برانکیومیسیس.

قارچها در بهداشت آبزیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند و باید به عنوان یک عامل اساسی در تعیین وضعیت بهداشتی مزارع پرورش ماهیان مد نظر قرار گیرند. لایه اپیتلیومی نازک آبشش ماهیان نسبت به عوامل محرک خارجی موجود در آب بسیار آسیب پذیر است و متعاقب کمترین صدمات وارده، مکان مناسبی را برای رشد و تکثیر قارچها فراهم می‌کند.

تعداد قارچهایی که به عنوان انگل ماهی محسوب می‌شوند بسیار اندک هستند. اکثر پاتوژن‌های قارچی متداول ماهیان در زیر مجموعه اوومایستها (*Oomycetes*) قرار دارند که در محیط‌های آبی پراکنده هستند. ساپروولگنیاها از مهمترین قارچهای این گروه می‌باشند که می‌توانند ضایعاتی را در پوست، احشاء و تخم ماهیان ایجاد کنند. حضور رشته‌های کرکی -

پنبه‌ای در سطح زخمها و اطراف تخم ماهیان از مهمترین نشانه‌های ساپروولگنیازیس می‌باشد (۶، ۱۲).

برانکیومیسیس (*Branchiomyces*) عامل بیماری برانکیومیکوزیس می‌باشد که از بیشتر مناطق اروپا و آسیا گزارش شده است و اکثر ماهیان آب شیرین نسبت به این بیماری بویژه در ماههای گرم سال حساس هستند. از عوامل مستعد کننده بیماری می‌توان به افزایش تراکم، شکوفایی جلبکی، افزایش دمای آب بالاتر از ۲۰ درجه سانتیگراد و افزایش آمونیاک غیر یونیزه اشاره کرد. دوره بیماری معمولاً سریع بوده و در موارد شدید در عرض ۲ تا ۴ روز

۱) گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

* نویسنده مسؤل: hmosavi@ut.ac.ir



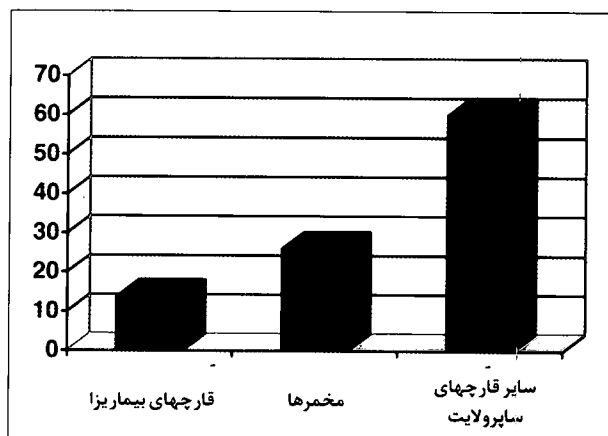
جدول ۱- فراوانی فارچه‌های جدا شده از ضایعات آبشش ماهیان مورد مطالعه

نوع ماهی	کیپور معمولی		کیپور نقره‌ای		کیپور علفخوار		جمع
	عدد	درصد	عدد	درصد	عدد	درصد	
نوع قارچ							
قارچ‌های بیماریزا	۱۷	۱۴/۴۱	۷	۱۴/۲۹	۴	۱۱/۱۱	۲۸
مخمرها	۳۰	۲۵/۴۲	۱۳	۲۶/۵۳	۱۰	۲۷/۷۸	۵۳
سایر قارچ‌های ساپروفیت	۷۱	۶۰/۱۷	۲۹	۵۹/۱۸	۲۲	۶۱/۱۱	۱۲۲
جمع	۱۱۸	۱۰۰	۴۹	۱۰۰	۳۶	۱۰۰	۲۰۳

تلفات بالای ۵۰ درصد در ماهیان مشاهده می‌شود. علت تلفات، آنوکسی (anoxia) ناشی از حضور قارچ در آبشش است (۵،۸،۱۰).

گونه‌های فوزاریوم (Fusarium) علاوه بر آنکه عفونت‌هایی را در اسکلت خارجی و آبشش آبی‌زبان ایجاد می‌کنند، از نظر توکسین‌زایی نیز در حیوانات آبی‌زبان دارای اهمیت بسزایی می‌باشند. در ایران در موارد متعددی قارچ فوزاریوم از عفونت‌های جلدی در ماهی کیپور و ماهی طلایی جدا شده است. همچنین Fusarium tricinctum از کیسه‌های قزل‌آلای رنگین کمان با شنای نامتعادل، Fusarium culmorum به عنوان عامل بیماریزا از چشم و پوست ماهی کیپور و نیز Fusarium oxysporum از تلفات ماهی سیم دریای سرخ جدا شده‌اند. بیماری آبشش سیاه ناشی از فوزاریوم اولین بار توسط Ishakaw در سال ۱۹۶۹ از میگوی ژاپنی گزارش شد (۵). این بیماری تلفات زیادی را در میگوهای پرورشی ژاپن، آمریکا و فرانسه ایجاد می‌کند (۷،۱۳).

فوما (Phoma) یک ساپروفیت گیاهی است که می‌تواند عفونت کیسه شنا و مجرای هوایی را در ماهیان جوان ایجاد کند. تورم و خونریزی مخرج از علایم بالینی این بیماری بوده و اکثر ماهیان عدم تعادل داشته و به پهلو می‌افتند. اگزوفیالا (Exophiala) نیز بیماری گرانولوماتوز مزمن را در مغز ماهیان ایجاد می‌کند (۱).



نمودار ۱- فراوانی قارچ‌های جدا شده از ضایعات آبشش ماهیان مورد مطالعه

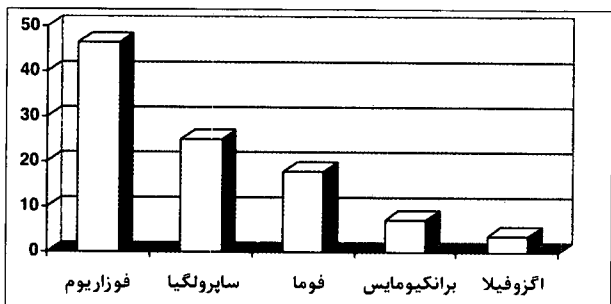
جدول ۲ - فراوانی قارچ‌های ساپروفیتی جدا شده از ضایعات آبشش ماهیان مورد مطالعه

نوع قارچ	عدد	درصد
آلترناریا	۱۲	۹/۸۵
آسپرژیلوس	۴۲	۳۴/۴۰
استامفیلیوم	۱	۰/۸۲
پسیلومایسس	۱	۰/۸۲
پنی‌سیلیوم	۳۰	۲۴/۵۹
رایزوپوس	۳	۲/۴۵
ژنوتریکوم	۲	۱/۶۴
کلادوسپوریوم	۶	۴/۹۲
کورولاریا	۲	۱/۶۴
موکور	۱۷	۱۳/۹۵
نوکاریدا	۴	۳/۲۸
هلمینتوسپوریوم	۲	۱/۶۴
جمع	۱۲۲	۱۰۰

مواد و روش کار

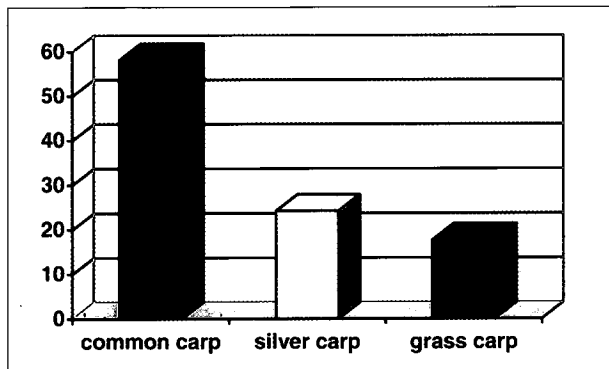
مکان و زمان نمونه برداری: پنج استخر پرورش ماهی از پنج کارگاه پرورش ماهیان گرم‌آبی استان مازندران برای نمونه برداری انتخاب شدند. زمان نمونه برداری در فصل تابستان و دمای آب استخر درجه سانتیگراد بود. روش کار: پس از صید ماهیان از استخر و جمع‌آوری آنها در سطل‌های مخصوص نگهداری ماهی، ابتدا آبشش آنها را مورد بررسی قرار داده و تنها ماهیانی که آبشش آنها از نظر ظاهری دچار تغییر رنگ، پرخونی، خونریزی و یا ضایعه خاصی بودند، به عنوان نمونه انتخاب و سایر ماهیان به استخر برگردانده شدند. که در مجموع تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی به عنوان نمونه انتخاب شد، ماهیان مورد مطالعه به روش مکانیکی بی‌هوش شدند. در ابتدا سربوش آبششی را بریده و سطح آبشش با آب مقطر استریل شستشو داده شد تا از آلودگی‌های سطحی نمونه کاسته شود. پس از بریدن قسمتی از آبشش، آن را در داخل لوله‌های پلاستیکی در پوش دار حاوی آب مقطر استریل + کلرامینیکل قرار داده و در کنار یخ به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند.

روش‌های آزمایشگاهی: در آزمایشگاه از دو روش برای کشت نمونه در محیط‌های سابورو گلوکز آگار، کلوکز پپتون آگار و کورن میل



نمودار ۲- فراوانی نسبی قارچ‌های بیماری‌زای جدا شده از ضایعات آبشش ماهیان مورد مطالعه





نمودار ۳- فراوانی مجموع قارچهای جدا شده بر اساس گونه ماهی

دیواره عرضی بوده که در داخل آن اسپورهای کروی شکل مشاهده می‌گردد. در واقع اسپورانژیوم بدنبال اتساع بخشی از میسلیوم ایجاد می‌گردد (تصویر ۲). اندام تولید مثلی در فوما به صورت اسک بزرگی بوده که در داخل آن اسپورها تولید می‌شوند (تصویر ۳). از مشخصات اگزوفیالا، ماکروکونیدی‌های دارای حالت تجمعی هستند (تصویر ۴).

بحث

از بین قارچهای بیماریزای جدا شده از ماهیان مورد مطالعه فقط برانکیومیسیس را می‌توان به عنوان قارچ اختصاصی آبشش ذکر کرد. این قارچ اولین بار توسط Plehn در سال ۱۹۱۱ از آبشش ماهی کپور معمولی جدا شد (۱۱) در آن سالهای اولیه برانکیومیسیس فقط از منطقه اروپای شرقی گزارش شده بود ولی پس از آن از نواحی مدیترانه و بیشتر قسمتهای اروپا از جمله ایتالیا، سوئیس، آلمان و همچنین از کشورهایی چون ژاپن، تایوان و



تصویر ۲- میسلیومهای برانکیومیسیس

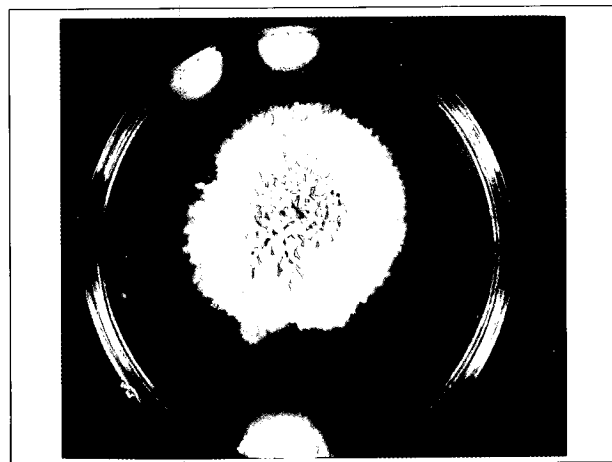
آمریکا گزارش شد (۲، ۴، ۹، ۱۰).

جداسازی این قارچ بسیار مشکل بوده و غالباً به یافته‌های هیستوپاتولوژیک بسنده می‌نمایند. در این مطالعه قارچ برانکیومیسیس در ۲ مورد از ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) جدا گردید که

آگار + کلرامینیکل در داخل پلیت استفاده گردید. در روش اول قطعاتی از آبشش در سه نقطه از محیطهای کشت در کنار شعله تلقیح شدند. در روش دوم ابتدا آبشش‌ها در هاون چینی استریل کاملاً له شدند و پس از سانتریفیوژ کردن عصاره به دست آمده، از رسوب باقی مانده جهت کشت استفاده شد. نمونه‌های کشت داده شده اولیه به مدت ۴۸ ساعت و حداکثر تا دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از بررسی و مشاهده رشد قارچ، پاساژهای دیگر جهت جداسازی و خالص سازی پرکنه‌های قارچی انجام شد. شناسایی گونه‌های قارچی تا حد ممکن با روش اسلاید کالچر (Slide culture) و سایر روشهای اختصاصی شامل استفاده از محیط‌های اختصاصی انجام گرفت.

نتایج

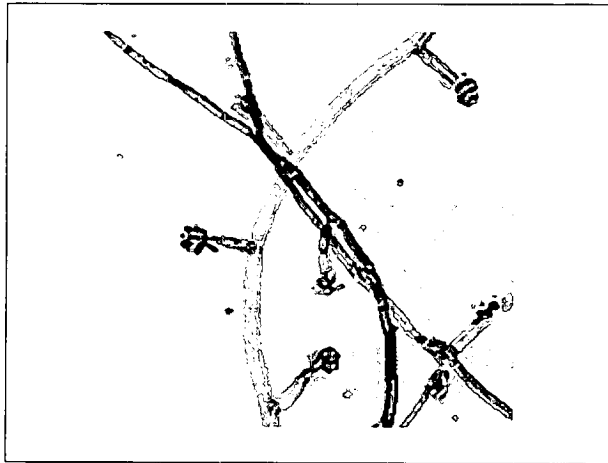
در این مطالعه از ضایعات آبشش ۱۰۰ قطعه ماهی گرم آبی، تعداد ۳۹ گونه قارچ جدا و شناسایی شد. فراوانی قارچهای جدا شده از ضایعات آبشش ماهیان مورد مطالعه در جدول ۱ مشخص شده است. بر این اساس قارچهای بیماریزا ۲۸ مورد (۱۳/۸۰ درصد)، مخمرها ۵۳ مورد (۲۶/۱ درصد) و سایر قارچهای ساپروفیت ۱۲۲ مورد (۶۰/۱ درصد) را تشکیل می‌دهند (نمودار ۱). قارچهای بیماریزای جدا شده شامل فوزاریوم (۴۶/۴۰ درصد)، ساپروولگنیا (۲۵ درصد)، فوما (۱۷/۸۵ درصد). برانکیومیسیس (۷/۱۵ درصد) و اگزوفیالا (۲/۶ درصد) می‌باشند (نمودار ۲). از بین قارچهای جدا شده ساپروفیتی، اسپرجیلوسها (۳۴/۴۰ درصد) و استامفیلیوم (۰/۸۲ درصد) به همراه پسیلومیسیس (۰/۸۲ درصد) به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی نسبی را داشتند (جدول ۲). بر اساس مجموع قارچهای جدا شده از ماهیان مورد



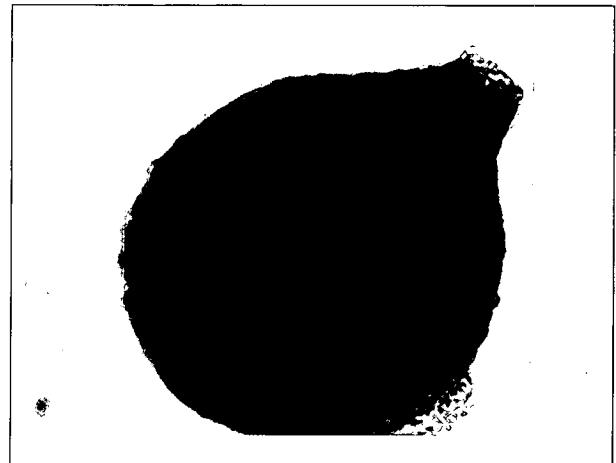
تصویر ۱- کلنی برانکیومیسیس

مطالعه بیشترین قارچها از ماهی کپور معمولی (۵۸/۱۵ درصد) و کمترین آنها از ماهی علفخوار (۱۷/۷۰ درصد) جدا شده است (نمودار ۳). مشخصات سه قارچ که برای اولین بار از ماهی گزارش می‌گردد به شرح زیر است:
کلنی برانکیومیسیس به رنگ کرم متمایل به قهوه‌ای بوده که در وسط آن حالت چین خوردگی مشاهده می‌شود (تصویر ۱). رشته‌های آن شفاف و فاقد





تصویر ۴- کونیدی اگروفیالا



تصویر ۳- آسک فوما

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات آقایان دکتر شریف روحانی و دکتر میر کمالی به خاطر هماهنگی‌های لازم جهت نمونه برداری از مزارع پرورش ماهی قناری می‌گردد. همچنین از خانم‌های آقایی و آقای باقری به خاطر تهیه مواد آزمایشگاهی و همکاری‌های ایشان تشکر لازم بعمل می‌آید. این تحقیق در غالب طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران صورت پذیرفته است.

References

1. Alderman, D.J. (1982): Fungal diseases of aquatic animal. In Microbial Diseases of Fish. Edited by RJ Robert. Academic Press, London, PP: 189-242.
2. Chien, C.H., Miyazaki, T. and Kubota, S.S. (1979): Branchiomycosis of the reared Japanese eel in Taiwan. Fish Pathol., 13: 4, 179-182. [In Japanese, English abstract].
3. Ebrahimzadeh Mousavi, H., Khosravi, A (2001): Isolation of Toxicogenic Fungi from Cultivated Cyprinids in Iran. S.Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 56(3): 67-69.
4. Goven-Dixon, B.A. (1993): Fungal and algal diseases of goldfish, koi and carp. In Fish Medicine. Edited by MK Stoskopf. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, PP: 476-477.
5. Ishakaw, Y., (1969): Preliminary report on black gill disease of the Kuruma Prawn Penaeus japonicus Bate. Fish Pathol. 3, 34-38.
6. Khoo, L. Lead, A.T., Waterstart, P.R., Jack, S.W., and Camp, K.L. (1998): Branchiomycosis infection in

اولین جدا سازی این قارچ در ایران می‌باشد. با توجه به نقش برانکیومیسیس در بروز ضایعات آبشش، آن را می‌تواند به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده ضایعه آبشش و در موارد شدیدتر به عنوان یکی از عوامل اصلی تلفات در ماهیان دانست.

سپروولگنیایا به عنوان قارچ‌های پاتوژن مهم در آبزیان مطرح هستند که طیف وسیعی از میزبانها را در بر می‌گیرند. این مطالعه نشان داد که سپروولگنیایا در آبشش نیز می‌تواند حضور یابد و احیاناً ایجاد بیماری کند ولی به هر حال حضور این ارگانیسم خطر بالقوه‌ای برای بیماری‌زایی در جلد و احشای ماهیان خواهد بود خصوصاً که گونه سپروولگنیایا پارازیتیکا (S.parasitica) نیز در این مطالعه شناسایی گردید.

فوزاریومها عامل بیماری‌های مهمی در آبزیان هستند که بیماری آبشش سیاه (Black gill disease) در میگو یکی از مهمترین آنها است. علاوه بر آن نقش توکسین زایی فوزاریومها در حیوانات کاملاً شناخته شده است و توکسین‌های این ارگانیسمها (Fusariotoxins) می‌توانند در آبزیان نیز خساراتی را سبب شوند (۱۳). در طی تحقیقی گونه فوزاریوم سلوانی (F.solani) توسط موسوی و خسروی در سال ۱۳۸۰ از ماهیان ایران جدا شده بود (۳). در مطالعه حاضر نیز گونه‌های مختلفی از فوزاریوم از جمله فوزاریوم سلوانی، فوزاریوم مونیلیفورم (F.moniliform) و فوزاریوم اکسیس پاروم (F.oxysparum) برای اولین بار از ضایعات آبشش ماهیان مورد مطالعه شناسایی شده است. بر این اساس نیاز به مطالعات تجربی و بررسی‌های بیشتری در مورد نقش گونه‌هایی از قارچ فوزاریوم (خصوصاً گونه‌های توکسین زا) در بیماری‌زایی آبشش آبزیان خواهد بود.

فوما (Phoma) به عنوان قارچ آلوده کننده کیسه شنا در ماهیان و اگروفیالا (Exophiala) به عنوان عامل بیماری گرانولوماتوز مزمن در مغز ماهیان گزارش شده است. در این بررسی، برای اولین بار ایندوقارچ از ضایعات آبشش ماهیان جدا گردید. شاید تحقیقات بعدی نقش مهمی را برای بیماری‌زایی این قارچها در ارگانهای مختلف از جمله آبشش تایید نماید.



- farm-reared channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. of Fish Diseases* 21, 423-431.
7. Meyer F.P. and Robinson J.A. (1973): Branchiomycosis: a new fungal disease of North American fishes. *Progressive Fish Culturist* 35, 74-77.
 8. Mokhayer, B. (2002): Diseases of Cultivated Fishes. Univ. Tehran. Publication. 194-196.
 9. Neish G.A. and Hughes G.C. (1980): Branchiomyces: systematic, pathology and epizootiology. In *Diseases of Fishes, Book 6: Fungal Diseases of Fishes*. Edited by SF Sniezko and HR Axelrod. T.F.H. Publications, Neptune, New Jersey, USA, PP: 50-60.
 10. Noga, E.J. (2000): *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press/ Ames. PP: 123
 11. Plehn, M. (1912): Eine neue Karfenkrankheit und ihr Erreger *Branchiomyces sanguinis*, *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*. Abteilung original 62, 129-134.
 12. Roberts, R.J. (2001): The Mycology of Teleosts. In *Fish Pathology*. Edited by RJ Roberts. 3rd edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, PP: 332-346.
 13. Souheil, H., Vey, A., Thuet, P., Trilles, J.P. (1999): Pathogenic and toxic effects of *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) on survival and osmoregulatory capacity of *Penaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture* 178, 209-224.



