

جداسازی و شناسایی قارچهای توکسین‌زا در استخرهای پرورش کپور ماهیان

دکتر حسینعلی ابراهیم‌زاده موسوی^۱ دکتر علیرضا خسروی^۲

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۶۹-۷۶، ۱۳۸۰

گردیدند. به منظور جلوگیری از آلودگیهای ثانویه احتمالی اطراف کشته‌ها با چسب پوشیده شده و به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردیدند.

در آزمایشگاه مراحل زیر جهت جداسازی و شناسایی قارچها صورت پذیرفت: ۱. قراردادن نمونه‌های کشت اولیه در انکوباتور ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت. ۲. خارج کردن نمونه‌ها از انکوباتور و بررسی کلنیهای قارچی از لحاظ مورفولوژی. ۳. بررسی ریزیبی قارچها جهت شناسایی اولیه و تهیه کشتهای ثانویه به منظور خالص سازی کلنیهای قارچی با استفاده از محیط کشت مناسب. ۴. تهیه اسلاید کالچر به منظور بررسی مطلوب اندامهای زایای قارچ جهت شناسایی دقیق‌تر.

از هر استخر در مراحل نمونه‌برداری نمونه آب با استفاده از لوله‌های استریل درب‌دار تهیه گردید که پس از انتقال به آزمایشگاه قارچ‌شناسی ۱ میلی‌لیتر آب از هر لوله را در محیط کشت ریخته و سپس در انکوباتور ۲۵ تا ۳۰ درجه به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار داده شد و مراحل مختلف شناسایی آن‌چنان‌که در بالا شرح داده شده صورت پذیرفت.

نتایج

در این بررسی در کل از ۲۱۰ عدد ماهی شامل کپور (۷۲ عدد)، فیتوفاگ (۴۵ عدد)، آمور (۱۰۳ عدد) و نیز ۱۰۸ نمونه آب کشت قارچی به عمل آمد. در این مطالعه ۴ گونه قارچ توکسین‌زا به شرح زیر جداسازی و شناسایی گردید: *Aspergillus flavus* (تصویر ۱)، *Alternaria* (sp) (تصویر ۲)، *Penicillium* (sp) (تصویر ۳)، *Fusarium* (sp) (تصویر ۴). از مجموع ۲۰۵ مورد قارچهای توکسین‌زای جدا شده از ماهیان مورد مطالعه، پنی‌سیلیوم با ۴۱ درصد بیشترین فراوانی و *Aspergillus* فلاووس با ۶/۲ درصد کمترین فراوانی را داشتند. فراوانی قارچهای جدا شده از انواع ماهیان در جدول ۱ آمده است. جدول ۲ فراوانی قارچهای توکسین‌زا در ماهی و آب را نشان می‌دهد. از مجموع ۴۱۴ مورد قارچ توکسین‌زای جدا شده ۱۰۹ مورد از آب می‌باشد.

بحث

قارچهای توکسین‌زا از دو بعد بیماری‌زایی و توکسین‌زایی واجد اهمیت می‌باشند و انواع مختلف آنها در آبزیان گزارش شده‌اند. انواع *Aspergillus* ها از قبیل *Aspergillus* فلاووس، *Aspergillus* نایجر، *Aspergillus* ترنوس و *Aspergillus* ژاپونیکوس به عنوان عوامل مهم بیماری‌زا در ماهی به خصوص در مناطق حراره‌ای مطرح بوده که موجب آلودگیهای قارچی خارجی و داخلی می‌گردند. در ایران نیز موارد متعدد *Aspergillus* میکوزیس در ماهیان پرورشی و زینتی مشاهده شده است. آفلاتوکسیکوزیس نیز که در اثر مصرف غذای آلوده به آفلاتوکسین (سم *Aspergillus* فلاووس) در ماهی ایجاد می‌شود به عنوان یکی از مشکلات مهم در صنعت پرورش ماهی می‌باشد. موارد متعددی از آلودگی با انواع پنی‌سیلیوم و *Aspergillus* در ماهی توسط Reichenbach و همکاران (۱۹۱۶، ۱۹۰۳ و ۱۹۵۶ میلادی) گزارش شده است. در ایران نیز از محیط آب، سطح بدن ماهی و تخم ماهی، *Aspergillus* جدا شده است. (خسروی ۱۳۶۵، سادات اخوی ۱۳۷۲ و زرگر ۱۳۷۶). در این مطالعه *Aspergillus* فلاووس با فراوانی کمتر نسبت به سایر قارچهای توکسین‌زا جدا گردید. که با توجه به اهمیت بیماری‌زایی و توکسین‌زایی در ماهی، شایسته است تا دقت بیشتری در ذخیره و نگهداری مواد غذایی و

در این مطالعه قارچهای توکسین‌زا در استخرهای پرورش کپور ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور جداسازی و شناسایی قارچهای توکسین‌زا ۶ استخر پرورش ماهی انتخاب گردید. از هر استخر نمونه‌های ماهی (از انواع کپور، فیتوفاگ و آمور) و آب تهیه گردید. متعاقباً کشت قارچی (با استفاده از روشهای متداول قارچ‌شناسی) به دست آمده و قارچهای جدا شده مورد شناسایی قرار گرفتند. در مجموع ۴ گونه قارچ توکسین‌زا شامل *Aspergillus* فلاووس، *Alternaria*، پنی‌سیلیوم و فوزاریوم از آب و سطح خارجی ماهی (پوست و آبشش) جدا گردیدند که پنی‌سیلیوم با ۴۱ درصد و *Aspergillus* فلاووس با ۶/۲ درصد بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند.

واژه‌های کلیدی: کپور ماهیان، قارچهای توکسین‌زا، شناسایی، جداسازی.

قارچهای توکسین‌زا عمدتاً جزو قارچهای سایروفیت یا فرصت طلب بوده و گسترش جهانی داشته و به صورت گسترده در محیطهای آبی و خاکی قابل جستجو می‌باشند. این دسته از قارچها از دو بعد واجد اهمیت می‌باشند. بعد اول همان توکسین‌زایی است که تحت شرایط مناسب روی مواد غذایی رشد کرده و تولید سم نموده و متعاقب مصرف این مواد غذایی آلوده در حیوانات اعم از انسان، دام و ماهی می‌تواند سبب بروز عوارض گردند. بعد دیگر قضیه، بیماری‌زایی این قارچها در آبزیان می‌باشد. همان‌گونه که ذکر شد این دسته قارچها عمدتاً فرصت طلب بوده و هنگامی که شرایط مهیا باشد (از قبیل تراکم، سوء تغذیه، استرس، دستکاری، تغییرات محیطی و غیره) می‌توانند باعث ایجاد آلودگی و بیماری گردند. با توجه به نکات ذکر شده و اهمیت بهداشتی و زیست‌شناختی این دسته از قارچها و نیز به منظور پیش‌بینی و پیشگیری از بروز مشکلات ناشی از این دسته قارچها مطالعه حاضر به منظور شناسایی این قارچها روی ماهی و در محیط زندگی صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

۱. مکان نمونه‌برداری: استخرهای مورد مطالعه از شمال کشور و با توجه به امکانات نمونه‌برداری و شرایط موجود و نیز با توجه به تعداد استخرهای موجود به تعداد ۶ استخر پرورش ماهیان گرمایی انتخاب گردیدند.

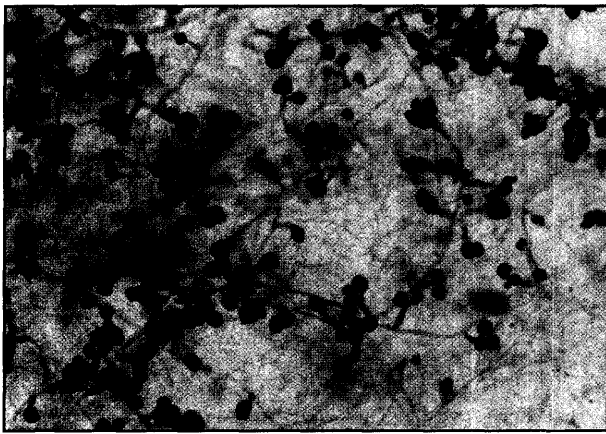
۲. مواد و وسایل: در انجام پژوهش وسایل معمول برای صید ماهی، نمونه‌برداری از آب و ماهی و حمل مورد استفاده قرار گرفتند. از محیط سابوردکستروز آگار برای کشت اولیه استفاده گردید و به منظور جلوگیری از رشد باکتریهای خارجی موجود بر بدن ماهی و آب از کلرامفنیکل به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر به محیط مزبور افزوده شد. برای مطالعه پرگنه‌های پنی‌سیلیوم و بویژه *Aspergillus* از محیط *Czapeks agar* که بسیار مناسب ارزیابی می‌گردد، استفاده شد. همچنین محیط *Czapeks agar* به نحو مطلوبی برای کشت سایر سابروفیتها مورد استفاده قرار گرفت. محیط *Potato agar* برای مطالعه ریخت‌شناسی گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم به کار برده شد. به منظور شفاف کردن و رنگ‌آمیزی نمونه‌های مورد آزمایش از لاکتوفنل آتیلین‌پلو استفاده شد.

پس از انتخاب ۶ استخر پرورش کپور ماهیان، از هر استخر در ۶ نوبت نمونه‌برداری صورت پذیرفت. در هر نوبت ۵ ماهی به طور اتفاقی صید شده و سپس در ظروف فایبرگلاس بزرگ به آزمایشگاه منتقل می‌گردیدند. سپس بلافاصله با استفاده از آن‌استریل از پوست و آبشش هر ماهی نمونه برداشته و در محیط کشت سابوردکستروز آگار + کلرامفنیکل (SDA+C) تلقیح شد. کشتهای قارچی در شرایط استریل و در کنار شعله تهیه

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

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

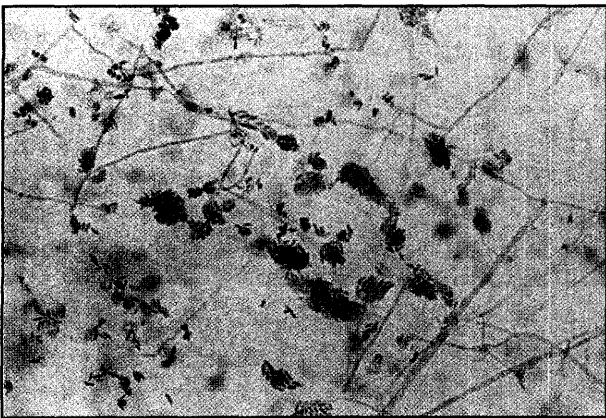




تصویر ۲- قارچ آلترناریا



تصویر ۱- قارچ اسپرگیلوس فلاووس



تصویر ۴- قارچ فوزاریوم



تصویر ۳- قارچ پنیسیلیوم

اختصاص دادند و در منابع هم به عنوان یکی از قارچهای وافر در طبیعت ذکر شده است. پنیسیلیومها یکی از قارچهای شایع در محیطهای آبی در اروپا بوده ولیکن به عنوان بیماریزا از ماهی جدا نشدهاند. بهر حال قارچ پسیلومایسس (Paecilomyces) که از لحاظ طبقه‌بندی در گروه پنیسیلیومها جای دارد در ماهی تولید بیماری می‌نماید (Neish, 1980). پنیسیلیومها می‌توانند تولید سم نموده مانند اکراتوکسینها (Ochratoxins) که باعث ایجاد علائم پاتولوژیک در قزل‌آلای رنگین کمان شده است (موسوی، ۱۳۷۹). آخرین قارچ مورد بررسی آلترناریا می‌باشد. با توجه به منابع موجود، گزارش خاصی از بیماریزایی و مشکلات ناشی از این قارچها در ماهی مشاهده نگردید و به نظر نمی‌رسد که از لحاظ بهداشتی در آبزیان اهمیت چندانی داشته باشد. در این مطالعه همچنین بین قارچهای جدا شده از ماهی و آب ارتباط نزدیکی وجود دارد و در منابع نیز به یکسان بودن فلور میکروبی محیط و ماهی یکسان اشاره شده است.

و بهداشت ماهیان جهت پیشگیری از مشکلات ناشی از این قارچ مبدول گردد. فوزاریومها از جمله قارچهای دیگری هستند که در این بررسی از نمونه‌های مورد آزمایش به دست آمده‌اند. این قارچها می‌توانند بیماریهای جدی در آبزیان از جمله ماهی و میگو (بیماری مهم آبشش سیاه در میگو که اولین بار Ishikawa در سال ۱۹۶۸ میلادی آن را توصیف نمود) ایجاد نمایند و در موارد متعددی از آبزیان در ایران جدا گردیده‌اند. (خسروی ۱۳۶۵، زرگر ۱۳۷۶، موسوی ۱۳۷۹) فوزاریومها به علاوه قادر به تولید سم بوده که زیرانتونها (Zearalenones) و تریکوٹنسها (Tricothencens) از جمله این سموم می‌باشند و می‌توانند مشکلات جدی در حیوانات ایجاد نمایند.

نظر به پراکندگی این قارچ در کشور، ضروری است نسبت به عفونتها و مسمومیتهای ناشی از این قارچ و نیز مشاهده موارد بالینی فوزاریو مایکوزیس، توجه بیشتری شود.

در این مطالعه پنیسیلیومها بیشترین موارد جداسازی را به خود

جدول ۱- فراوانی قارچهای توکسین‌زا در ماهیان مورد مطالعه

جمع		آمور		فیتوفاگ		کپور		ماهی مورد
		درصد	عدد	درصد	عدد	درصد	عدد	
درصد	عدد	درصد	عدد	درصد	عدد	درصد	عدد	نوع قارچ
۶/۲	۱۹	۷/۶	۱۰	۴/۶	۳	۵/۵	۶	اسپرگیلوس فلاووس
۳۳/۸	۱۰۳	۲۸/۱	۳۷	۴۳/۱	۲۸	۳۵/۲	۳۸	آلترناریا
۴۱	۱۲۵	۴۸/۵	۶۴	۳۵/۴	۲۲	۳۵/۲	۳۸	پنیسیلیوم
۱۹	۵۸	۱۵/۸	۲۱	۱۶/۹	۱۱	۲۰/۱	۲۶	فوزاریوم
۱۰۰	۳۰۵	۱۰۰	۱۳۲	۱۰۰	۶۵	۱۰۰	۱۰۸	جمع



جدول ۲- فراوانی قارچهای توکسینزا در مجموع ماهیان مورد مطالعه و آب

جمع		آب		ماهی		نمونه مورد	نوع قارچ
درصد	عدد	درصد	عدد	درصد	عدد		
۶/۱	۲۵	۵/۵	۶	۶/۲	۱۹		آسپرگیلوس فلاووس
۲۶/۳	۱۰۹	۵/۵	۶	۳۳/۸	۱۰۳		آلترناریا
۴۷/۳	۱۹۶	۶۵/۱	۷۱	۴۱	۱۲۵		پنیسیلیوم
۲۰/۳	۸۴	۲۳/۹	۲۶	۱۹	۵۸		فوزاریوم
۱۰۰	۴۱۴	۱۰۰	۱۰۹	۱۰۰	۳۰۵		جمع

correlation between the level of contamination of skin and gills among fish being studied.

Key words: Isolation, Cyprinids, Toxigenic fungi.

References

۱. ابراهیمزاده موسوی، ح. (۱۳۷۹): قارچ شناسی و بیماریهای قارچی ماهی جزوه تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
۲. امامی، م، کردبچه، پ. (۱۳۶۵): اصول قارچ شناسی پزشکی انتشارات دانشگاه تهران.
۳. خسروی، ع. ر. (۱۳۶۵): آلودگی آبها به آسپرگیلوس و آسپرگیلوزیس آبزیان پایان نامه جهت اخذ دکتری دامپزشکی دانشگاه تهران.
4. Alderman, D.J. (1985): *Fusarium tabacinum* as a gill parasite in the cray fish. *Journal of Fish Disease*. 8: 245-252.
5. Gordan, A. Neish. (1980): *Fungal Diseases of Fish*. T.F.H Publication, Newjersy.
6. Hatai, K. (1966): *Fusarium oxysparum* in red sea bream, *Journal of Wildlife Diseases*.
7. Jungerman, P.F, (1985): *Veterinary Medical Mycology* Lea and Febiger, Philadelphia, 200-210.
8. Post, G. (1988): *Textbook of Fish Health*. T.F.H Publication, Newjersy.
9. Raper, K.B. (1991): *The Genus Aspergillus*. William Wilkins, 293-357.
10. Rippon, J.W. (1988): *Cutaneous aspergillosis in animals*. *Medical Mycology*, W.B. Saunders, 579-612.
11. Willoughby, L.G. (1994): *Fungi and Fish Diseases*. Pisces Press, Stirling.

Isolation of Toxigenic Fungi at Cyprinids Farms in northern Iran

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 Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

This study was carried out to indicate the toxigenic fungi of cyprinids and aquatic environment at fish farm in northern Iran. For the determination of toxigenic fungi infestation of three fish species (Common carp, Grass carp and Silver carp) samples were obtained from skin, gills and their ponds water. Four species of toxigenic fungi were isolated that included: *Aspergillus flavus* (6.2%), *Alternaria* spp (33.8%), *penicillium* spp (41%) and *Fusarium* spp (19%). There was a significant

