نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

بررسی فلور مخمری روده ماهیان قزل‌آلای 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 قزل‌آلا 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 قزل‌آلای شهرستان ارومیه با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و افتراقی به همراه روش‌های مولکولی صورت گرفت. نمونه‌برداری از ۶ سایت مختلف پرورش ماهیان قزل‌آلا 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، زمانی‌که محیط‌های کشت قادر به تفکیک برخی گونه‌ها نشدند، با PCR قطعه کوچکی از ناحیه ITS۱ و تعیین توالی محصول PCR صورت پذیرفت. این تحقیق ضمن ارائه مسیر شناسایی فلور مخمری ماهیان قزل‌آلا توانست گونه‌هایی شامل *Candida guilliermondii, Saccharomyces cerevisiae strain LN, Saccharomyces cerevisiae* strain YG۳-۱، *Saccharomyces cerevisiae* 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 stablishe 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 ۲۲). 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 فیزیک 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 (Sabouraud dextrose agar) SDA (حاوی پپتون، دکستروز یا گلوکز و آگار) ، محیط SC (حاوی کلرامفنیکل به میزان ۰٫۰۵ درصد در محیط سابورو دکستروز آگار) ، محیط مایکوزیل آگار (Mycosel Agar) (MA) یا SCC (حاوی سیکلوهگزامید در محیط SC) اشاره نمود. همچنین می‌توان از محیط‌های کشت اختصاصی همانند محیط CHA (CHROMagar Candida Medium) که حاوی سوبستراهای کروموژنیک (حاوی رنگ ویژه شناسایی مخمرها) 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 10^7CFU/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 مخمری روده ماهیان قزل آلا، 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

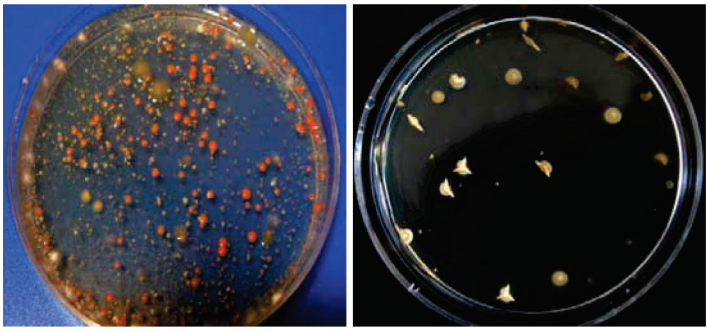
نمونه‌برداری ماهیان از ایستگاه های نمونه‌برداری در تابستان ۱۳۹۲ انجام شد. بدین منظور تعداد ۱۸ قطعه از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن

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 در مراحل مولکولار استفاده شد.

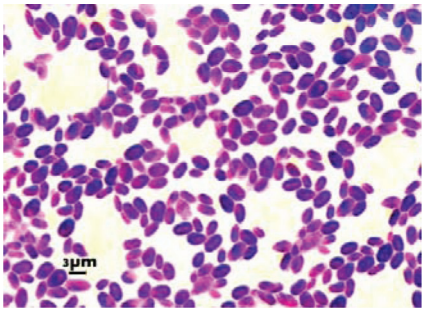
به دلیل دور بودن مسافت محل‌های نمونه‌برداری از محل انجام آزمایش، و به منظور جلوگیری از خفگی نمونه‌ها در اثر کمبود اکسیژن حین انتقال؛ نمونه‌ها پس از صید در همان روز در داخل یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و بلافاصله مورد کالبد شکافی قرار گرفتند. به منظور تشریح، ابتدا سطح بدن

جدول ۱- اسامی مزارع پرورش ماهی در شهرستان ارومیه

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



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



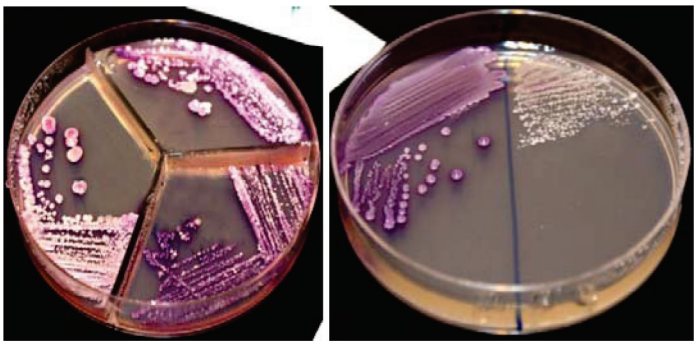
شکل ۲- سلول‌های مخمری در رنگ‌آمیزی گرم در درشت‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ

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 فیزیولوژی استریل، حل شد (برای تهیه محلول stock) ؛ این محلول با سمپلر مخلوط گشت، سپس از آن رقت های ۱-۱۰، ۲-۱۰، ۳-۱۰ و ۴-۱۰ تهیه شد (۲). رقت‌های سریال تهیه شده در پلیت های استریل جداگانه با روش پورپلیت (Pureplate Method) در محیط SDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند (۲) (شکل ۱). پس از رشد کلنی مخمرهای تک‌سلولی نمونه‌ها بر اساس شکل کلنی‌های ایجاد شده دسته بندی‌شده 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).

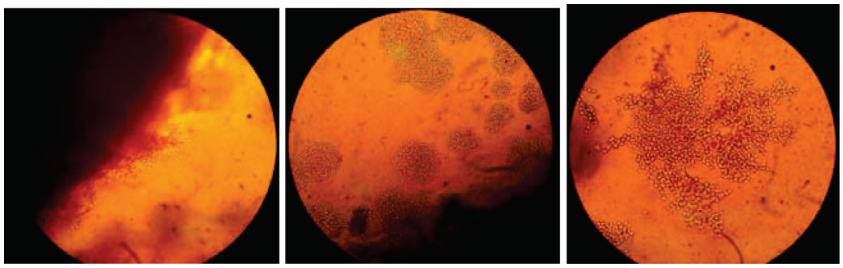
ایزوله‌سازی تک کلنی‌های مخمر از کلنی های باکتریایی و قارچ‌های ساپروفیت با کشت مجدد بر روی محیط کشت MA (SCC) با روش کشت سطحی گسترده (Streak method) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انجام شد. در نهایت شناسایی دقیق مخمرها به وسیله رنگ آمیزی گرم نمونه‌ها محقق شد (۱۰) (شکل ۲).

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 سانتی گراد 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 سانتی گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون انجام شد (۱۷). در این مرحله



شکل ۳- تنوع رنگ‌های مشاهده شده بر روی محیط کروموژنیک



شکل ۴- تنوع سودوهایف‌های مشاهده شده بر روی محیط CMA

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 ITS۱ (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 ۱/۶درصد 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 نمونه های موجود در بانک ژنی از نرم افزار Blast (Basic Local Alignment Search Tool) مربوط به بسته نرم‌افزاری سایت NCBI استفاده شد.

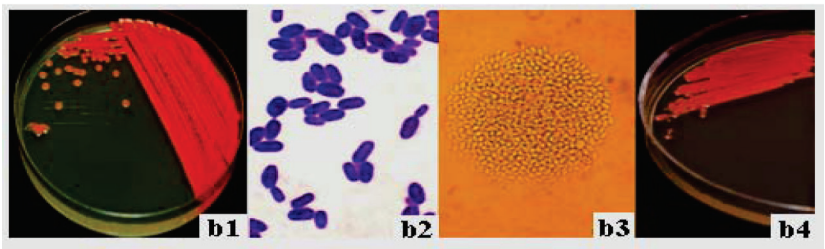
نتایج

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).

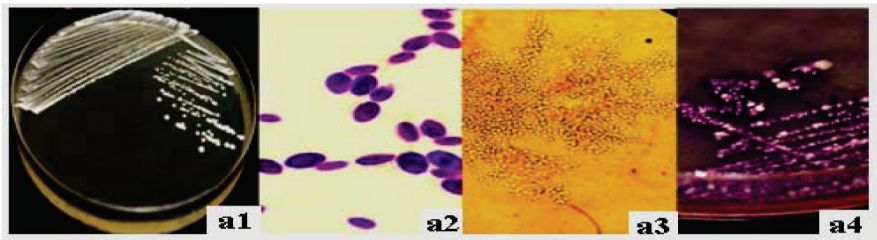
بررسی میکروسکوپی شکل سودوهایف یکی از کلنی‌های مخمری در محیط CMA و بررسی رنگ کلنی آن در محیط CHA موجب شناسایی جنس Candida و گونه *C. guilliermondii* بصورت قطعی گردید. در این محیط کشت، سودوهایف این مخمر به شکل شاخه‌دار مشاهده شد (شکل ۶).

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 محیط های 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 تظاهر یافتند (جدول ۲).

مشاهدات میکروسکوپی در این کلنی‌های مخمری، رشد یافته در محیط CMA نشان داد که اغلب کلنی‌ها حاوی توده‌های بلاستوکونیدی



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



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

بدون شـــاخه‌های بلند می‌باشـــند. شکل ۷ مقایسه شـــباهت 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 نشـــان داد با بالاترین درصد همپوشـــانی (بیش از ۹۵ درصد) تمامی نمونه‌های تعیین توالی شده به عنوان سویه‌هایی از گونه *Saccharomyces cerevisia* قابل شناســـایی می‌باشـــند (شکل ۸). بر اســـاس این بخش از مطالعـــه دلیلی بر وجود گونـــه *C. glabrata* در بین نمونه‌های مخمر یافت نشد. این بررسی همچنین نشـــان داد تنوع زیادی در بین گونه‌های مخمر *Saccharomyces cerevisia* یافـــت شـــده در بین نمونه‌های مختلف ماهی وجود داشـــته و اصولاً ســـویه‌های متنوعی از این مخمـــر در ماهیان مورد مطالعه یافت شد.

بحث و نتیجه‌گیری

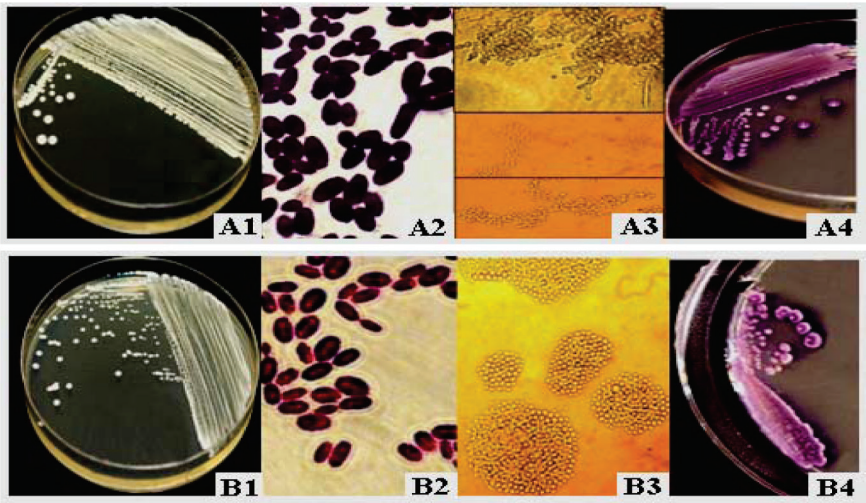
تا امـــروز حدود ۷۰۰ گونه مخمـــر متعلق خانواده مخمرهای تک‌ســـلولی توصیف شـــده است. با توجه به کاربردهای بسیار وسیع مخمرها در صنعت تاکنون محیط‌های کشـــت مختلفی برای شناسایی آن‌ها ارائه شده (۲۵). با وجود انواع مختلف محیط‌های کشت اغلب گونه‌های مخمری دارای صفات مورفولوژیک و ویژگی‌های رشد نزدیک به هم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

مخمرها ضمن این که می‌توانند به عنوان فلور روده موجودات مطرح باشند می‌توانـــند به عنوان یک منبع پروتئینی در رژیـــم غذایی برخی موجودات همچون انســـان، دام و طیور و آبزیان اســـتفاده شوند به طور مثال استفاده از مخمـــر نان در چندین پروژه تحقیقاتی برای تولید میگو آب شـــور نتایج درخشـــانی را داشته اســـت (۱۳). بطور مثال از نوعی مخمر شبیه کاندیدا بـــا نام علمـــی *Kluyveromyces sp.* در تغذیه انـــواع مختلفی از موجودات آبزی اســـتفاده شده اســـت (۱۸). *Phaffia rhodozyma* از تولید کنندگان استاگزانتین محسوب می‌شود که به عنوان مکمل در کنار برخی مخمرهای دیگر در غذای ماهیان آزاد و میگوهای پرورشـــی استفاده می‌شود (۲۶).

در ســـال ۱۹۹۳ تنها مخمرهای گزارش شـــده 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 کـــه در بین آن ها مهم‌تریـــن خانواده Saccharomycetaceae می‌باشـــد و ب) Basidomycota که شـــامل مخمرهای قرمز رنگ Rhodotorula است. گونه غالب مخمر در آبزیان آب شـــور و آب شـــیرین Rhodotorula است، در حالی که بیشـــتر تحقیقاتی که در مورد ماهی قـــزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفته است نشان می‌دهد که مخمرهای *Debaryomyces hansenii* فلور غالب می‌باشـــد. البته مطالعـــات Gatesoup (۱۱) چهار جنس مختلف دیگـــر از مخمرها با نام‌های Filobasidium، Kluyvermyces، Yarrowia و

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

```
S.cerevisiae/strain/LN        ----GGTTTT--ATTTGTCCTA--TAACAA-AAGCACAGAAATCTCTCAC 41
S.cerevisiae/strain/YG3-2     --CGGGTTTT--AATTGTCCTA--TAACAA-AAGCACAGAAATCTCTCAC 43
S.cerevisiae                  CCCCGCCTCTCCATTCGTCTTTACTAACAATAACCACAGAT-TCTCTCAC 49
S.cerevisiae/strain/YG3-1     CCGGGCGTCCCTACTTCTCCT---TTACCGTAAACACAGTTTTCTCTCAC 47
                                  *  *    * *  ** *   * **   ** *****   ********

S.cerevisiae/strain/LN        CGTTTGGAATAACAAAAAAAAAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACT 91
S.cerevisiae/strain/YG3-2     CGTTTGGAATAACAAGAAAGAAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACT 93
S.cerevisiae                  CGTTTGGAATAGCAAAAAAGAAACTTACAAGCCTAGAAAGACCGCGCACT 99
S.cerevisiae/strain/YG3-1     GGTTTGGAATAGCAGAAA--GAACTTACA-GCCTAGCAAGACCGCGCACT 94
                               ********** **  **   ******** ****** *************

S.cerevisiae/strain/LN        TAAGCGCAGGCCCGGGTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAATAA 141
S.cerevisiae/strain/YG3-2     TAAGCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAGTAA 143
S.cerevisiae                  TAAGCGCAGGCCCGGGTGGACTCTCCATTTCTTGTCTTCTTGCCCAGAAA 149
S.cerevisiae/strain/YG3-1     TTAGGGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTTTTGTCTTCTTGCCCAGTAA 144
                              * ** ********** ************ * ***************  **

S.cerevisiae/strain/LN        AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAAAAAAAATCCC---------- 181
S.cerevisiae/strain/YG3-2     AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAAAAAAAATTCCTTTTTAAATT 193
S.cerevisiae                  AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAAAAAAAATCCCTTTTCTAAATT 199
S.cerevisiae/strain/YG3-1     AAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAAAAAAAACTTCCTTT------- 187
                              ***********************************   *

S.cerevisiae/strain/LN        --------------------------------
S.cerevisiae/strain/YG3-2     TTTTTTTTTTTTGAAAAGGCCCCTCCCGGGGG 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 می‌باشد.

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

در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های کشت میکروبی و تکمیلی مولکولی ســـه جنس و دو گونه از مخمرهای تک ســـلولی به عنـــوان فلور روده این آبزیان شناسایی شدند. جنس Rhodotorula شناسایی شده در این تحقیق به عنوان یک جنس ســـاپروفیت و یا پاتوژن معرفی گردید زیرا پیش از این تحقیق مشخص شـــده بود که گونه‌هایی از جنس Rhodotorula می‌توانند با رشـــد بر روی مواد غذایـــی لایه‌ای لزج و صورتی رنـــگ ایجاد نماید که موجب کاهش ارزش محصولات گردند. گونه *Saccharomyces cerevisiae* از معروف‌ترین اعضای جنس Saccharomyces می‌باشـــد که هم به عنوان یک مکمل غذایی مطرح می‌باشـــد و هـــم گونه‌هایی از این جنس به عنوان پروبیوتیـــک با خـــواص مفید در جانوران مطرح هســـتند (۱۲). با توجه به اطمینان از عدم اســـتفاده از این مخمر به عنوان مکمل غذایی آبزیان تحت مطالعه و حضور دائمی این جنس و گونه در فلور روده بنظر می‌رسد نظریه قبلـــی در خصوص غیر دائمی بودن فلور مخمری روده ماهیان قزل آلا قابل رد بوده و احتمـــال پروبیوتیک بودن این گونه افزایش می‌یابد. در خصوص پاتـــوژن بودن مخمرهـــای Candida و به خصوص گونـــه *C. albicans* نیز تحقیقات زیادی انجام شـــده اســـت (۳ و ۱۵). وجود این جنس نیز در فلور روده می‌تواند منشـــاء تعدادی از بیماری‌ها و مشـــکلات ناشناخته ماهیان قزل‌آلا معرفی شود. در تحقیق حاضر روش‌های کشت افتراقی و اختصاصی نتوانســـتند قادر به تشخیص جنس Saccharomyces از گونه *C. glabrata* شوند. توانایی روش‌های مولکولی در شناســـایی دقیق گونه‌های موجودات بار دیگر در این تحقیق به تائید رســـید. البته غیر از این روش‌های مختلف نیز برای شناســـایی مخمرها ابداع و معرفی شـــده بود که با موفقیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. شناسایی مخمرهای *Candida*، *Candida albicans* *tropicalis* و Trichosporon با استفاده از تست تولید رنگ در محیط کشت CHA (۲۴) ، شناســـایی 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، ۱۴و ۲۷). در این روش کلنی‌های *Candida krusei* به رنگ قرمز روشن با حاشیه‌های سفید تولید می‌شـــود. 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 شناســـایی نیست و کلنی‌هایی با مورفولوژی شبیه به *P. wickerhamii*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Candida parapsilosis* *Cryptococcus neoformans* و *C. guilliermondii* ایجاد می‌کنند (۲۴).

در تحقیق حاضـــر نیز که برای اولین بار تنـــوع جنس‌های مخمرهای تک ســـلولی روده ماهیان قزل‌آلای پرورشـــی بومی مورد بررســـی قرار گرفت ترکیبی از روش‌های موفق کشـــت افتراقی و مولکولی مورد اســـتفاده قرار گرفت. در این تحقیق ســـعی شد ضمن مدون‌ســـازی روش شناسایی این دســـته از میکروارگانیســـم‌ها در روده ماهیـــان قزل‌آلا، تنـــوع جنس‌های مخمرهای فلور روده ماهیان قزل آلا مورد بررســـی قرار گیرد. نتایج تحقیق حاضـــر ضمن نشـــان دادن توانایی محیط‌های کشـــت جهت جداســـازی مخمرهای تک ســـلولی، ضرورت اســـتفاده از روش‌هـــای مولکولی را برای شناســـایی دقیق مخمرها را نشان داد. این نتایج نشـــان داد با وجود رشد تکنولوژی ساخت محیط‌های کشـــت اختصاصی، همچنین ابداع روش‌های نوین کشت و جداسازی موجودات تک‌سلولی هنوز هم احتمال حذف بخش قابـــل توجهی از جامعه مخمرها، که قابلیت کشـــت در محیط‌های کشـــت مصنوعـــی را ندارنـــد (unculturable)، وجـــود دارد (۱۶). زیرا در طی این تحقیق مشاهده شد که در برخی مراحل امکان رشد، دو گونه یا سویه مخمر در یـــک کلنی کوچک واحد وجود دارد که با تغییر محیط کشـــت یکی از جمعیت‌ها از دست می‌رفت. شناسایی مخمرهای فلور روده ماهیان قزل‌آلا می‌تواند درک بهتری در خصوص مشـــاهده برخی نارسایی‌ها و بیماری‌های ناشـــناخته ماهیان قزل‌آلا حاصل نمایـــد. همچنین در صورت تائید خواص مفید مخمرهای ایزوله شده در این تحقیق می‌توان در آینده از آنها به عنوان مکمل غذایی و پروبیوتیکی در ماهیان قزل آلا استفاده نمود.

شناســـایی مخمرهای موجود در فلور آبزیان، حائز اهمیت اســـت؛ چرا که تعدادی از این تک ســـلولی‌ها که بـــه تک‌یاخته‌هـــای پروبیوتیک معروف هستند، که علاوه بر کمک به گوارش مولکول‌های پیچیده، ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند. این مواد می‌توانند برای گوارش بهینه غذا مفید بوده و در ســـلامـــت مـــیزبان و در افزایش کیفیت و رشـــد بهینه‌ی آبزیان نقش داشته باشـــند (۵). مطالعات به عمل آمده در خصوص اهمیت مخمرها در دســـتگاه گوارش موجودات نشان داده اســـت که گونه هـــای مختلف می‌توانند نیازهای غذایی متفاوتی داشـــته و لذا اپتیمم رشـــد آن‌ها در محیط‌های مختلف اتفـــاق می‌افتد. نتایج چنین یافته‌هایی که حتی با کشت گونه‌های مختلف مخمرها در محیط‌های کشت مصنوعی مختلف نیز به اثبات رســـیده است دلیلی بر یافت چندین گونه و ســـویه مختلف از مخمرهای تک ســـلولی در این تحقیق در فلور روده یک نمونه فردی از ماهیان می‌باشد.

منابع مورد استفاده

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

۲- جانســـون، تد. آر. و کیس، ک.ل. ۱۳۸۱. آزمایش‌های میکروب شناسی عمومی. ترجمه، ناصر گلبانگ (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- واکـــر، گ.م. ۱۳۹۱. مخمر فیزیولوژی و بیوتکنولـــوژی. 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-

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 Acadomic, 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.