نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۴ : ۸۸-۷۵

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی آلودگی های قارچی در پوست و آبشش ماهیان زینتی آب شیرین شهر تهران

مهدی ابراهیمی جعفری[۱]، منصور بیات[۲*]، عادل حقیقی خیابانی اصل[۳]، سیدجمال هاشمی[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحدعلوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد قارچ شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحدعلوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳ - دانشیار آسیب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحدعلوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴- استاد قارچ شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحدعلوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

چکیده

صنعت ماهیان پرورشی و زینتی درگیر حضور ارگانیسم های قارچی است که جمعیت های پرورشی جوان و بالغ را تهدید کرده و منجر به پوسیدگی تخم ها و لاروها می شوند. عفونت های قارچی عفونت های ثانویه در ماهی به دنبال ارگانیسم های اولیه انگلی، ویروسی و باکتریایی هستند. در این تحقیق باید میزان عفونت های قارچی و نوع آلودگی آنها در ماهیان زینتی مشخص میشد. این بررسی بر روی ۹۲ ماهی زینتی با علائم بالینی انجام شد. نمونه ها از مکان های مختلف به دست آمدند. پس از شناسایی قارچ ها بوسیله کشت و PCR فراوانی آنها بررسی گردید. از مجموع ۹۲ مورد بررسی، پوست و آبشش دارای ضایعه در ۳۲ مورد نتیجه کشت قارچ مثبت بود. در بررسی PCR این ۳۲ نمونه، گونه های قارچی شناسایی شده بوسیله توالی ژنی بصورت ۵۳٪ *کلادوسپوریوم*، ۱۸/۷٪ *کاندیدا*، ۱۲/۵٪ *پنیسیلیوم*، ۳٪ *اورئوباسیدیوم پولولنس* و ۳٪ *مخمر رودوتورولا* بودند. ضایعات پاتولوژیک در آبشش‌ها بصورت تیرگی، پرخونی، و در زیر میکروسکوپ بصورت ریزش سلول‌های اپیتلیال و حضور لکوسیت ها بود. در پوست بصورت زخم ماکروسکوپی و میکروسکوپی دیده شد. این قارچ ها مسئول بوجود آمدن ضایعاتی هستند که تحت شرایط خاص مانند بی ثباتی محیطی و عوامل سرکوب کننده سیستم ایمنی دیده می شوند.

کلمات کلیدی: ماهی زینتی، فراوانی، قارچ، پوست، آبشش

*نویسنده مسئول: منصور بیات

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیک: m.bayat@srbiau.ac.ir

مقدمه

از ۲۰ سال پیش تا به امروز، بیماری های قارچی ماهی در کانون توجه قرار گرفته است. تعداد فزاینده ای از قارچ های محیطی فرصت طلب از ماهیان درگیر گزارش شده است. ارگانیسم های قارچی می توانند عفونت هایی را در جمعیت های پرورشی جوان و بالغ ایجاد کنند که منجر به پوسیدگی تخم ها و لاروها می شود. عفونت های قارچی عفونت های ثانویه در ماهی به دنبال ارگانیسم های اولیه انگلی، ویروسی و باکتریایی است. برخی از قارچ ها بیماری زاتر هستند و میکروارگانیسم های مهاجم اولیه هستند. اسپور قارچ منبع عفونت در آبزی پروری است. پروتئاز، گلیکوزیل هیدرولاز، مهارکننده کیناز می تواند به بستر بافت میزبان آسیب برساند(۱). ساپرولگنیا (*Saprolegnia*) یک قارچ جهانی آب شیرین یا آب شور است که به عنوان مشکل اصلی حوزه آب شیرین یافت می شود. گرچه دیده شده که برخی ماهیان مانند سالمون دریای آتلانتیک به ساپرولگنیا مقاوم هستند ولی عمومیت نداشته و وجود آن در محیط آکواریوم فاکتوری مهلک با لزوم درمان و تغییر مدیریت برخورد با قارچها است. از اینرو در بررسی ژنها لحاظ می شود (۲). بطور کلی ویژگی های بالینی مشخص عفونت قارچی سطحی، رشد پنبه مانند سفید روی پوست و قوس های آبشش است. پس از تهاجم هایف ها، فرسایش یا زخم های اپیدرمی کانونی ممکن است رخ دهد (۳, ۴). اطلاعات کمی در مورد شناسایی و تعریف عفونت قارچی در ماهیان زینتی ایران وجود دارد. چنین اطلاعاتی در پیشگیری حیاتی است. یک مطالعه در اصفهان نشان داد که گونه های *آسپرژیلوس* (*Aspergillus sp*)، *آکرمونیوم* (*Acremonium sp*)، *آلترناریا* (*Alternaria*)، *ساپرولگنیا* و *پنیسیلیوم* (*Penicillium sp*) بالاترین میکروارگانیسم های قارچی بودند. این میزان در گورامی کوتوله ۲۳.۳۱ درصد و در گوپی ۶.۶۶ درصد بود (۵). مطالعه دیگری نشان داد که گونه های آسپرژیلوس، موکور (Mucor spp)، پنیسیلیوم، رایزوپوس (*Rhizopus spp*) و فوزاریوم (*Fusarium spp*) از ۸ ماهی آب شیرین قابل خوردن خشک شده با دود به دست آمد (۶). از آنجایی که درمان عفونت های قارچی مشکل و تشخیص و اپیدمیولوژی آن چالش برانگیز است، مطالعه حاضر در نظر داشت تا با ارزیابی تشخیصی-آماری بتواند رهنمودی برای مدیریت بهتر مهار عفونت های قارچی در ماهیان زینتی ارائه دهد. تمایز دقیق برخی از پاتوژن های قارچی به دلیل شباهت های ظاهری میکروسکوپی و حتی کلنی ها دشوار است (۷). در نتیجه، تکنیک های مولکولی برای شناسایی گونه های قارچی پیشنهاد شده است. توالی های DNA ریبوزومی دست نخورده در طول تکامل وجود دارند. DNA ریبوزومی، توالی‌های فضای باز رونویسی داخلی ریبوزومی (ITS) و توالی‌های ژنی 18s rRNA یک الگوی دقیق برای تعیین پاتوژن‌های قارچی ارائه داده است. ITS توالی های کپی کوچک متعددی با تنوع بیشتر در میان گونه های مشابه است. سپس PCR مبتنی بر ITS برای تعیین پاتوژن های قارچی کارایی خوبی دارد (۸). در این مطالعه نمونه های مختلفی از ماهی های زینتی را که به نظر بیمار بودند به طور تصادفی جدا شد. سپس با استفاده از محیط کشت و روش‌های PCR می‌توان میزان فراوانی انواع بیماری‌های قارچی را در این جمعیت ارزیابی کرد. نمونه های مثبت مورد بررسی هیستوپاتولوژی قرار گرفت.

مواد و روش

شناسایی موارد

تعداد ۹۲ قطعه انواع ماهی زینتی همگی از آکواریوم های خیابان نواب تهران پس از مشاهده آثار بالینی مشابه عفونت قارچی انتخاب شدند. این آثار شامل مشاهده ظاهر رشته ای در محل زخم و پوست بود. این ۹۲ مورد با علائم بیماری توسط فروشندگان خصوصی ماهیان زینتی بوده و نمونه برداری از ماهی آلوده تا حد امکان از جایی که احتمال جدا شدن ارگانیسم وجود داشت انجام شد. پس از کشت همه ۹۲ مورد، از میان آنها ۳۲ مورد با عامل قارچی تشخیص داده شد.

شناسایی قارچ

محل ضایعه با الکل ۷۰ درصد در تمام ۹۲ نمونه بالینی برای حذف باکتری ها و قطرات چربی، با استفاده از ابزارهای استریل نزدیک شعله و زیر هود تمیز گردید تا از رشد میکروارگانیسم های دیگر در پلیت های آگار جلوگیری شود. محیط مورد استفاده شامل سابورودکستروز آگار (SDA)، نوترینت آگار و گلوکزپپتون آگار بود که به همگی به میزان ۴۰۰ میلیگرم در لیتر آنتی بیوتیک کلرامفنیکل اضافه شد. در برخی موارد از محیط کشت مجدد برای بهبود تشخیص یا جداسازی کامل استفاده شد. در شرایط استریل، قارچ از محل ضایعه با یک حلقه تلقیح نزدیک شعله برداشت و کشت داده شد و به مدت دو هفته در انکوباتور نگهداری شد. دمای مورد استفاده برای کشت ۳۰ درجه سانتیگراد بود و نمونه ها هر روز از نظر رشد مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی ماکروسکوپی کشت ها

در مطالعه اولیه، ویژگی‌های مختلف قارچ‌هایی که در محیط‌های مورد استفاده رشد کرده بودند از نظر سرعت رشد، رنگ کلنی، تغییرات پشت کلنی، نوع کلنی و تفاوت رشد در محیط‌های مختلف در نظر گرفته شد.

بررسی میکروسکوپی کشت ها

در طول بررسی کلنی در حال رشد، نمونه‌هایی برای بررسی میکروسکوپی ساختارهای مخصوص قارچ تهیه شد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر برای قارچ‌های کپک‌زده و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر برای مخمر مشاهده شد. ساختارهای تولیدمثلی، انواع هاگ، رنگ میسلیوم، دیواره عرضی و خلوص کلنی مهمترین عوامل در نظر گرفته شده بودند.

توالی یابی DNA

استخراج DNA

همه ۹۲ نمونه از نواحی بافت آلوده در SDA و سایر کشت های محیطی (در صورت نیاز) برداشت شدند. DNA قارچ های رشته ای و مخمرها با استفاده از روش نیتروژن مایع و گلوله های شیشه ای به دست آمد. به این روش که پس از جمع آوری نمونه های قارچ، آنها را در آون ۳۰ درجه سانتیگراد درون کاغذ رو باز قرار داده تا خشک شوند. ۰/۰۵ گرم از نمونه و ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج در میکروتیوب ریخته و ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. ۶۰ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول اضافه شد و ۴۰ دقیقه در حمام بن ماری آب گرم ۶۰ درجه قرار گرفت. سپس ۱۶ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریوفوژ شدند. پس از تکرار این مراحل با بافر استخراج۲ فاز رویی را برداشته و دو برابر حجم هر ویال را برداشته و دو برابر حجم هر ویال محلول کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۱ به ۲۴ اضافه گردید. سپس ۱۰ دقیقه روی شیکر بود و دوباره ۱۶ دقیقه سانتریوفوژ ۱۲۰۰۰ دور گردید. فاز رویی پس از چندبار تکرار برداشته شد و ۲/۵ برابر آن ایزوپروپانول

سرد اضافه گردید. ویال ها ۳ ساعت در دمای ۴۰- قرارداده شد. دوباره سانتریوفوژ شده و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوبات بررسی گردید (۹).

توالی ژنهای انتخاب شده

در بررسی توالی ها از مطالعات قبلی استفاده شد (۱۰, ۱۱). در ژنوم DNA استخراج شده از ۳۲ قارچ کشت شده، ژن های18s rRNA با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 (جدول ۱) برای تشخیص قارچ تکثیر شدند. پرایمر دیگری برای شناسایی آفانومایسس (جدول ۱) استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات توالی‌های پرایمری مورد استفاده در تحقیق

نام ژن	توالی
ITS1	5"-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3"
ITS4	5"TCCTCCGCTTATTGATATGC-3"
Aphanomyces sp	Forward primer: 5'-CTTGTGCTGAGCTCACACTC-3' Reverse primer: 5'-ACACCAGATT ACACTATCTC-3'

هر دو محصول برند سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich) بوند. ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۰.۲ میکرومولار از هر پرایمر، ۲۵ میکرولیتر PCR Master Mix (2× Premix) و آب مقطر ۵۰ میکرولیتر مخلوط PCR را فراهم کردند. سی سیکل PCR به عنوان دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، حرارت برای ۵۶ درجه سانتیگراد (۲۰ ثانیه)، و گسترش برای ۷۲ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه)، هر یک از آنها یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه پردازش شد (۱۲, ۱۳).

آسیب شناسی

پس از مشاهده ضایعات ماکروسکوپی و ثبت نوع جراحات آنها در پوست و آبشش ماهیان با علائم بالینی، از محل ضایعات نمونه برای عمل آوری بافت و مشاهدات پاتولوژی اخذ و در فرمالین ۱۰٪ بافردار قرار داده شد. پس از تهیه برشهای ۵ میکرومتری، نمونه ها با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. نیم دیگر بافت ضایعه دیده برای انجام عملیات مولکولی و کشت در نظر گرفته شد.

فراوانی درگیری با محاسبه فرمول زیر به دست آمد:
شیوع درگیری قارچی در هر گونه ماهی (٪) = تعداد ماهیان مبتلا به قارچ / تعداد کل ماهیان مورد بررسی.

نتایج

فراوانی و محل درگیری نمونه ها

ماهی قرمز (Carassius auratus)، *ماهی کپور اوراسیا (Cyprinus carpio)*، *گورخرماهی (Danio rerio)*، *سیکلید دهان آتشی (Thorichthys meeki)*، *سیکلید سوروم (Heros severus)*، *دلار نقره ای (Metynnis argenteus)*، *تترا (Pristella tetra)*، *اسکار (Astronotus ocellatus)*، *گربه ماهی (Clupisomaua)*، *گورامی (Trichogaster lalius)*، *گوپی (Poecilia reticulate)*، *کوی (Cyprinus rubrofuscus)*، *اسکار (Astronotus ocellatus)*، *دم شمشیری (Xiphophorus hellerii)* از جمله ماهی های مشاهده شده در این تحقیق بودندکه بوسیله محیط کشت ارزیابی شدند. نسبت درصد نمونه ها و محل درگیری آن ها در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲. فراوانی آلودگی قارچی مثبت در کشت با گونه های ماهی در ۹۲ مورد بالینی.

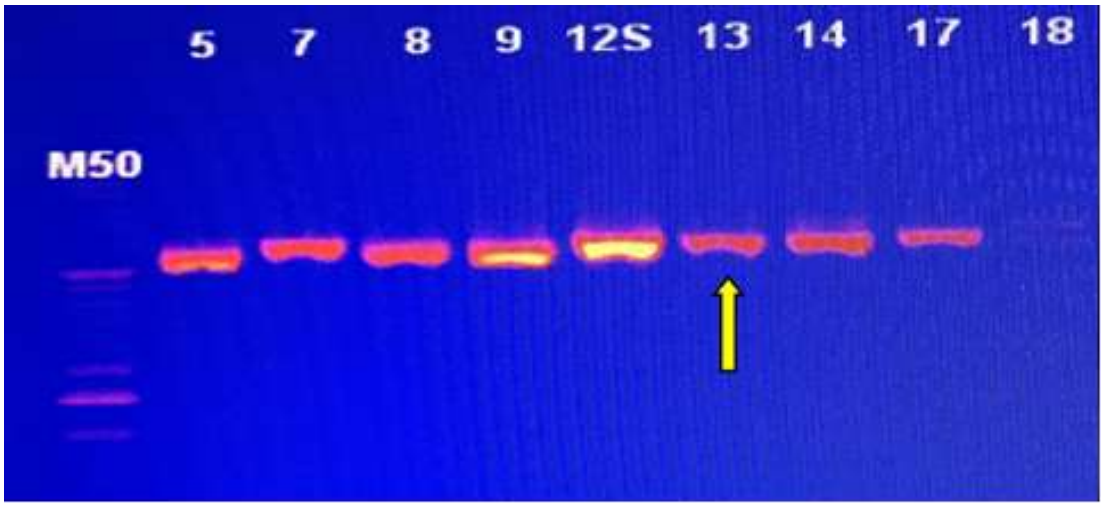
گونه ماهی	تعداد موارد بالینی با مشخصات بیماری قارچی	تعداد بیماری قارچی مثبت در کشت	درصد شیوع
Cyprinus carpio	۲	۰	۰
Carassius auratus	۹	۳	۳۳
Thorichthys meeki	۳	۳	۱۰۰
Heros severus	۲	۱	۵۰
Metynnis argenteus	۶	۲	۳۳
Pristella maxillaris	۲	۱	۵۰
Astronotus ocellatus	۲	۱	۵۰
Clupisoma garua	۲	۱	۵۰
Trichogaster lalius	۱۰	۳	۳۰
Poecilia reticulata	۲۲	۴	۱۸
Cyprinus rubrofuscus	۳	۲	۶۶
Danio rerio	۲۴	۷	۲۹
Melanotaeniidae	۲	۰	۰
Andinoacara rivulatus	۴	۲	۵۰
Xiphophorus hellerii	۷	۲	۲۸/۵
مجموع	**۹۲**	**۳۲**	**۳۴/۷**

جدول ۳. فراوانی و محل درگیری اندام گونه های قارچی در ۳۲ مورد ماهی که در محیط کشت و بررسی مولکولی ارزیابی شدند.

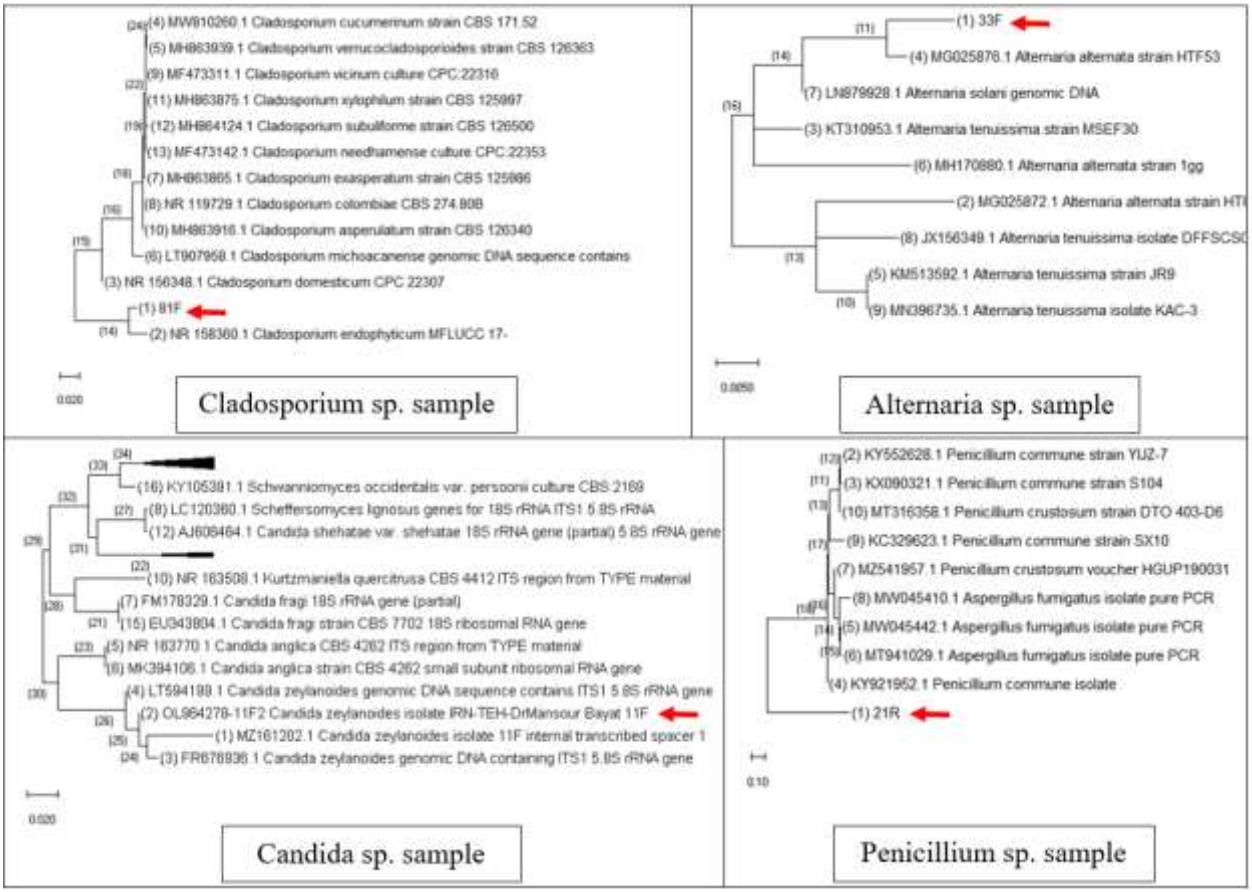
اندام درگیر	گونه ماهی	تعداد	گونه قارچ
آبشش و پوست	Danio rerio	۷	Cladosporium cladosporioides
آبشش و پوست	Cyprinus rubrofuscus	۱	Cladosporium sp.
پوست	Thorichthys meeki	۲	Cladosporium perangustum
پوست	Metynnis argenteus	۱	Cladosporium colombiae
آبشش و پوست	Trichogaster lalius	۲	Cladosporium sinuosum
آبشش و پوست	Xiphophorus hellerii	۱	Cladosporium sinuosum
آبشش و پوست	Xiphophorus hellerii	۱	Cladosporium sinuosum
آبشش و پوست	Carassius auratus	۲	Penicillium spp
آبشش و پوست	Andinoacara rivulatus	۱	Penicillium spp
پوست	Heros severus	۱	Penicillium spp
پوست	Thorichthys meeki	۱	Penicillium spp
آبشش و پوست	Carassius auratus	۱	Aureobasidium pullulans
آبشش و پوست	Astronotus ocellatus	۱	Trichophyton tonsurans
آبشش و پوست	Poecilia reticulata	۲	Alternaria alternata
آبشش و پوست	Poecilia reticulata	۲	Candida spp
آبشش و پوست	Andinoacara rivulatus	۱	Candida spp
آبشش و پوست	Trichogaster lalius	۱	Candida Palmioleophila
پوست	Metynnis argenteus	۱	Candida zeylanoides
آبشش و پوست	Cyprinus rubrofuscus	۲	Candida spp
پوست	Pristella maxillaris	۱	Rhodotorula yeast

نتایج توالی یابی

تمامی ۳۲ نمونه قارچی که در محیط کشت رشد کرده بودند، بوسیله روش PCR نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. همه موارد مثبت کشت در PCR نیز مثبت تشخیص داده شدند و تطابق ۱۰۰٪ داشتند (تصویر ۱). از میان ۳۲ جدایه شناسایی شده بوسیله PCR *Cladosporium spp* (53%)، *Candida spp* (18.7%)، *Penicillium spp* (12.5%)، *Aureobasidium pullulans* (۳٪) و مخمر *Rhodotorula* (۳٪) گزارش شدند. بعلت اینکه آفانومایسس نباید بهیچ وجه در آکواریوم باشد و بومی ایران نیست با وسواس بیشتری پیگیر شدیم. ما نتوانستیم هیچ گونه Aphanomyces sp را در محیط کشت و روش PCR شناسایی کنیم. پس از توالی یابی ژنتیکی و ثبت آن در سیستم NCBI، مقایسه بین توالی های ثبت شده با نزدیک ترین قارچ های معرفی شده در سیستم انجام شد و سپس با کمک نرم افزار درخت فیلوژنتیک مگا X، توالی های نوکلئوتیدی ژن های آنها در جدول نمایش داده شد (تصویر ۲).



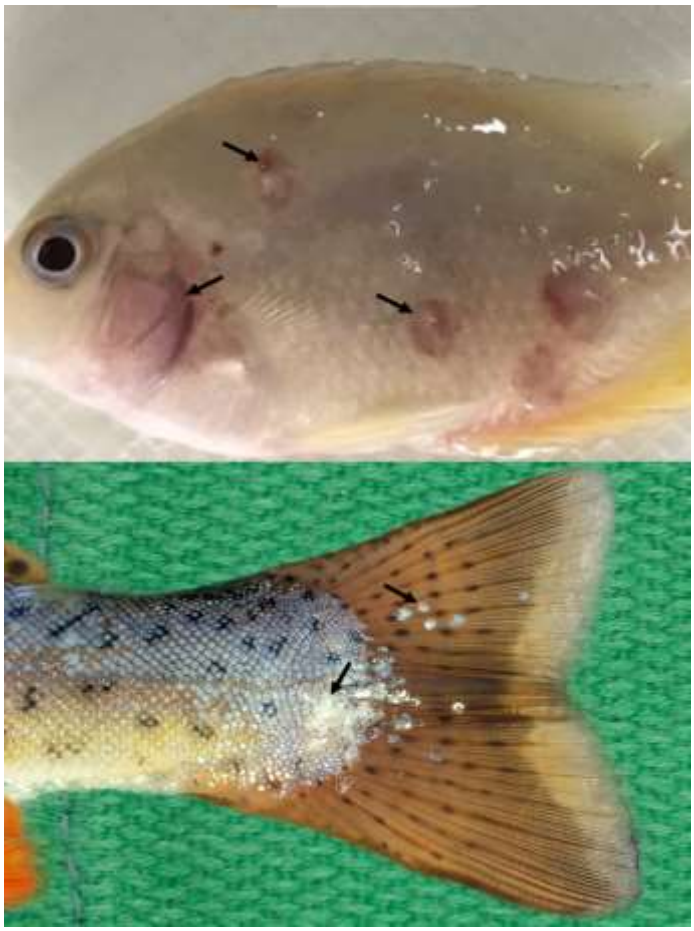
تصویر ۱ –ژل الکتروفورز PCR برای تشخیص قارچ از موارد مختلف بود. به عنوان مثال، Cladosporium sp در ماهی Heros Severus در خط شماره ۱۳ (پیکان) شکل گرفته است. خطوط دیگر متعلق به موارد دیگر است.



تصویر۲ – چهار فیلوگرام حداکثر احتمال با استفاده از ITS که رابطه بین برخی از نمونه ها و گونه های نماینده متعلق به جنس های مختلف را نشان می دهد که در ۴ نمودار متنی به آن اشاره شده است.

چهره ظاهری

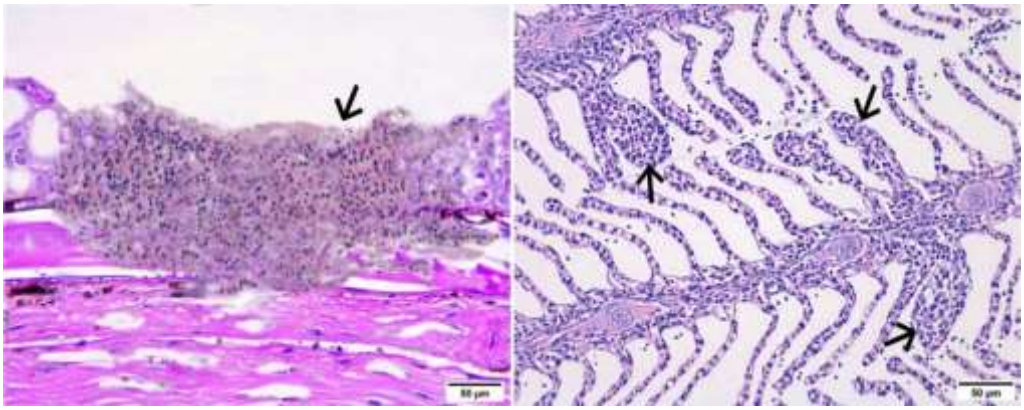
بیشترین یافته‌ها، پوست زخمی در اطراف آبشش‌ها یا باله‌ها بود. فلس ها به خصوص از قسمت دم تا شکم از دست رفته بود. برخی آبشش ها علاوه بر پرخونی دارای تکه های اکسودایی بود. باله های سینه ای و لگنی نیز در برخی موارد آسیب داشت (تصویر ۳).



تصویر۳ – دو نمونه ماهی مبتلا به عفونت قارچی. ماهی آلوده به قارچ پنیسیلیوم (بالا) که دارای ضایعات (فلش) پوست و آبشش است. ماهی آلوده به قارچ کلادوسپوریوم (پایین) که دارای ضایعات (فلش) پوست باله دمی است.

چهره میکروسکوپی آسیب شناسی

ضایعات غیر اختصاصی در آبشش بیشتر بصورت پرخونی با حضور لکوسیت در فیلامنت ها و سینوزوئیدها بود (تصویر ۲). ضایعات پوستی نیز درماتیت حاد همراه با زخم و حضور لکوسیت ها دیده شد (تصویر ۴).



تصویر۴ – برش بافتی پوست (چپ) و آبشش (راست) ماهی آلوده که حضور لکوسیت ها را در سطح زخم (فلش) و تیغه آبششی (فلش) نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

کاهش تنظیم اسمزی در عفونت های قارچی موجب از دست رفتن سلامت طبیعی و مرگ ماهی می شود. تهیه اسمیر از ناحیه ضایعه راهی سریع برای تشخیص افتراقی است. بیماری قارچی آبزیان بجز بیماری ناشی از Ichthyophonus hoferi شایع نیست (۱۴). ضایعات خارجی آن تغییر رنگ های متعدد با پاپول های سفید است. برخی از گونه های قارچ در التهاب گرانولوماتوز پوست ماهی ها نقش دارند. ظاهر پوست گرفتار گرانولوم های کیستیک متعدد می شود و درمان برای این بیماری های قارچی مؤثر نیست (۱۵). برخی از مطالعات نشان داده که موش های مبتلا به Cladosporium sp گلومرول های پرخون، احتقان کبدی و نوکلئومگالی دارند (۱۶). اسپیسرهای رونویسی شده داخلی، نواحی در رونویسی RNA ریبوزومی هستند که با بلوغ قارچ ها قطع می شوند. آنها برای بررسی فیلوژنتیکی هستند که منجر به شناسایی سویه می شود (۱۲). شناسایی سویه های قارچی که به پوست، آبشش ها و سایر بافت های ماهی حمله می کنند برای تجویز ضد قارچ ضروری است. استفاده از کشت به دلیل شناسایی نادرست بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، رشد طولانی مدت، حساسیت کم و نتایج مثبت کاذب آلوده، در کیفیت نتایج کاملا ارضا کننده نیست. ارزیابی هیستوپاتولوژیک می تواند قارچ را در رنگ آمیزی PAS در نمونه های بافتی نشان دهد. با این حال، گونه های میکروارگانیسم ها را نمی توان با هیستوپاتولوژی شناسایی کرد. این نتایج برای انجام یک درمان ضد قارچ قابل تعمیم نیست. از سوی دیگر، تشخیص تست‌های سرولوژیک و PCR از خون یا بافت‌ها ممکن است بدون هیچ استاندارد حساسی دشوار باشد (۱۷). با توجه به این نکات مشخص میشود که هرچقدر راه تشخیص قارچ سریعتر و ارزانتر باشد دقت و کرایی آن کم میشود. بنظر ما روشهای مولکولی بهترین هستند و اگر محیط های کشت جواب مناسبی بوجود نیاورد نمونه هایی که مبهم بوده اند را میتوان با روش مولکولی به قطعیت تشخیص داد. در ضمن وجود قارچ در برخی از نمونه های منفی حتی در PCR را می توان با روش هیبریداسیون فلورسانس در محل (FISH) نشان داد (۱۸). استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی پاتوژن‌های قارچی از بافت‌های تثبیت شده با فرمالین و پارافین (FFPE) ممکن است تشخیص ضایعات قارچی را تقویت کند و منجر به درمان‌های ضد قارچی مناسب شود. عوامل قارچی بیماری های مرموزی هستند که میزبان های حیوانی مختلف را تحت شرایط اپیدمیولوژیک مختلف گرفتار می کنند. در میان سیستم‌های آب شیرین طبیعی و آکواریومی نگهداری ماهی، فراوانی بیماری قارچی در شرایط طبیعی از ماهی‌های آکواریومی بیشتر است. در برخی از مطالعات قبلی، بیشتر موارد قارچ‌های جدا شده از پوست، آبشش، کبد و کلیه ماهی نشان داد که آسپرژیلوس شایع‌ترین گونه یافت شده و سپس گونه‌های کلادوسپوریوم دارای بیشترین شیوع هستند. البته آلترناریا Alternaria alternata و گونه پنیسیلیوم نیز به طور مکرر ماهی را آلوده می کنند. بیشترین تعداد درگیری بافت با مخمرها در تمامی گونه های ماهی مربوط به آبشش و پوست است (۱۹, ۲۰). ساپرولگنیا Saprolegnia یک قارچ جهانی آب شیرین یا آب شور است که به عنوان مشکل اصلی حوزه آب شیرین یافت می شود. رشد ساپرولگنیا در pH کم، دما مناسب و حضور موجودات یا گیاهان در حال پوسیدگی بیشتر می شود. آنها بیشترین پاتوژن های قارچی شناسایی شده در آکواریوم هستند. قارچ‌های ساپرولگنیا در داخل

پوست و آبشش‌ها نشست می‌کنند ولی به عمق و عضلات نفوذ نمی‌کنند. سیستم ایمنی ممکن است بتواند از تهاجم عمیق هایف های مهاجم جلوگیری کند. برخلاف هایف ها که به عمق بافت ماهی حمله می کنند، هاگ ها به دلیل وجود موکوس سطح بافت پوششی نمی توانند به عمق بافت ها تهاجم کنند. هاگ های ساپرولگنیا روی پوست سالم نمی توانند نفوذ داشته باشند. کاهش دمای آب، آلودگی آلی، حمل و نقل، تغذیه نامناسب و جابجایی، سرکوبگرهای ایمنی ناشی از استرس هستند که منجر به تشکیل کلونی قارچی و تهاجم آنها می شوند (۲۱). علیرغم تلاش کافی ما، نتوانستیم ماهی آلوده به ساپرولگنیا را در شهر مورد مطالعه خود پیدا کنیم. در این رابطه، یافته‌های ما با گزارش‌های محققانی که اعلام کرده‌اند قارچ ساپرولگنیا در ماهیان زینتی شایع‌تر است، همخوانی ندارد. کلادوسپوریوم یک قارچ شایع ساپروفیتی است که ممکن است زخم های پوست و آبشش را آلوده کند (۲۲). یک محقق در نیجریه گونه های رایزوپوس، آسپرژیلوس، موکور، ترایکوفایتون وروکوزوم verrucosum *Trichophyton* و پنیسیلیوم را از محصولات ماهی جدا کرد (۲۳). در مطالعه دیگری، آسپرژیلوس، موکور، پنی سیلیوم، ساپرولگنیا، اسکوپولاریوپسیس، فوزاریوم، کورولاریا و ریزوپوس از نمونه ماهی های Clarias gariepinus و Oreochromis بدست آمدند (۲۴). محققان ایرانی گونه‌های آلترناریا، آسپرژیلوس، پنیسیلیوم و ساپرولگنیا و سایر گونه‌های قارچی را از تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان شهر کرمانشاه جدا کردند (۲۵). تیم ایرانی دیگر توانستند گونه های آلترناریا، آسپرژیلوس، پنیسیلیوم و ساپرولگنیا، آکرمونیوم Acremonium spp.، فوزاریوم، موکور و کلادوسپوریوم را از تخم ها و بدن قزل آلای رنگین کمان بالغ در استانهای غربی ایران جدا کنند (۲۶). در تحقیق دیگر گونه های رایزوپوس، آلترناریا، آسپرژیلوس، پنیسیلیوم، ساپرولگنیا و بلاستومایسس Blastomyces از گونه های کپور جدا شدند (۲۷). برخی از کپک‌های فرصت طلب مانند گونه های فوزاریوم، موکور، ساپرولگنیا و پنیسیلیوم باعث ناباروری و مرگ ۲۲ درصد از تخم‌های Acipenser شدند (۲۸). به دلیل فراوانی گونه های Cladosporium در این تحقیق از گونه جدا شده Aspergillus در تحقیقات دیگران شایع تر بود (۲۹). با این وجود، از نظر تضاد با سایر قارچ ها مانند *Penicillium spp* و محل درگیری مشابه کار سایر محققین بود (۶, ۲۶, ۳۰). فراوانی گزارش شده این تحقیق در مورد رخداد بیماری قارچی در ماهی کپور اوراسیا، ماهی قرمز، سیکلید آتشین، دم شمشیری، ترور سبز، دلار نقره ای، اسکار و گوپی احتمالاً به دلیل حجم نمونه کم اغراق آمیز شده است. اندازه نمونه بزرگتر امکان تعیین دقیق تری از شیوع گونه ها را فراهم می کند. بسیاری از قارچ ها مانند Cladosporium spp، *Aspergillus spp* و *Penicillium spp* فلور قارچی طبیعی هستند که باعث آلودگی قارچی می شوند. بیشتر قارچ ها به عنوان پاتوژن های فرصت طلب در نظر گرفته می شوند که به ندرت باعث ایجاد بیماری هایی مانند آسپرژیلوزیس و عفونت پنی سیلیوم می شوند (۲۷). این عوامل قارچی احتمالاً از طریق محیط به خصوص خوراک ماهی پخش می شوند (۳۱).

نتیجه گیری

در پایان، قارچ های جدا شده از ضایعات مختلف در ماهی های متعدد، فلور قارچی طبیعی محسوب می شوند، در مقابل که این قارچ ها مسئول شرایط مضر

در محیط خاص هستند. اینها فلور قارچی طبیعی هستند اما نیاز به مراقبت بیشتری برای پیشگیری از درگیری قارچی در سلامت ماهیان زینتی دارند.

تضاد منافعی وجود ندارد.

منابع

1) Sarkar, P., Raju, V. S., Kuppusamy, G., Rahman, M. A., Elumalai, P., Harikrishnan, R., et al. (2022). Pathogenic fungi affecting fishes through their virulence molecules. *Aquaculture*, **548**:737553.
2) Misk, E., Gonen, S., Garber, A. F. (2022). Resistance to Saprolegnia parasitica infection: A heritable trait in Atlantic salmon. *Journal of fish diseases*.
3) Murphy, K. M., Lewbart, G. A., editors. Aquarium fish dermatologic diseases. Seminars in Avian and Exotic pet medicine; 1995: Elsevier.
4) Sakaguchi ,S. O., Ogawa, G., Kasai, H., Shimizu, Y., Kitazato, H., Fujikura, K., et al. (2019). Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in Japan and possible sources of their infection. *Aquaculture International*, **27**:1739-49.
5) SHAHRAKI, M. M., Asgari, M. R. (2014). Prevalence of Argulus foliaceus and fungal infections in some ornamental fishes [discus (Symphysodon discus), dwarf gourami (Trichogaster lalius) and guppy (Poecilia reticulata)] in Isfahan City of Iran. *Young*, **1**:2.
6) Fafioye, O. O., Fagbohun, T., Olubanjo, O. (2008). Fungal infestation and nutrient quality of traditionally smoke-dried freshwater fish. *Turkish Journal of fisheries and Aquatic sciences*, **8**:7-13.
7) Ke, X., Wang, J., Li, M., Gu ,Z., Gong, X. (2010). First report of Mucor circinelloides occurring on yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco) from China. *FEMS microbiology letters*, **302**:144-50.
8) Zahran, E., Hafez, E. E., Mohd Altaf Hossain, F., Elhadidy, M., Shaheen, A. A. (2017). Saprolegniosis in Nile Tilapia: Identification, Molecular Characterization, and Phylogenetic Analysis of Two Novel Pathogenic Saprolegnia Strains. *Journal of Aquatic Animal Health*, **29**:43-9.
9) McDonough, S. J., Bhagwate, A., Sun, Z., Wang, C., Zschunke, M ,.Gorman, J. A., et al. (2019). Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. *PLoS One*, **14**:e0211400.
10) Mohamed, O. G., Khalil, Z. G., Capon, R. J. (2021). N-Amino-l-Proline Methyl Ester from an Australian Fish Gut-Derived Fungus: Challenging the Distinction between Natural Product and Artifact. *Marine drugs*, **19**:151.
11) Rupp, M., Pilo, P., Müller, B., Knüsel, R., von Siebenthal, B., Frey, J., et al. (2019). Systemic infection in European perch with thermoadapted virulent Aeromonas salmonicida (Perca fluviatilis). *Journal of fish diseases*, **42**:685-91.
12) Wang, M.-M., Shenoy, B. D., Li, W., Cai, L. (2017). Molecular phylogeny of Neodevriesia, with two new species and several new combinations. *Mycologia*, **109**:965-74.
13) Armwood, A. R., Cañete-Gibas, C. F., Dill-Okubo, J. A., Wiederhold, N. P., Camus, A. C. (2021). Retrospective study of phaeohyphomycosis in aquarium-housed fish, with first descriptions of Exophiala lecanii-corni and Neodevriesia cladophorae in fish. *Journal of fish diseases*, **44**:1563-77.
14) Siddique, M., Bashar, M., Hussain, M., Kibria, A. (2009). Fungal disease

of freshwater fishes in Natore district of Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, **7**:157-62.

15) LaDouceur, E. E., Leger, J .S., Mena, A., Mackenzie, A., Gregg, J., Purcell, M., et al. (2020). Ichthyophonus sp. Infection in Opaleye (Girella nigricans). *Veterinary Pathology*, **57**:316-20.
16) Abdallah, M. T., Khalaf, H. M., Muhsin, A. H., editors. Histopathological study of Cinnamomum zeylanicum equeous extract and Cladosporium sp. Extract on different albino male mice organs. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; 2020: IOP Publishing.
17) Rickerts, V., Khot, P. D., Myerson, D., Ko, D. L., Lambrecht, E., Fredricks, D. N. (2011). Comparison of quantitative real time PCR with sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC infectious diseases*, **11**:1-12.
18) Rickerts, V., Khot, P. D., Myerson, D., Ko, D. L., Lambrecht, E., Fredricks, D. N. (2011). Comparison of quantitative real time PCR with Sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in Formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Infectious Diseases*, **11**:2.۰۲
19) Emam, A. M., Soliman, A. W., Mohamed, M. A., Gadallah, A. O., Ahmed, N. H. E., Eldin, A. B. (2021). Survey of major fish pathogens and their prevalence in the fishing area of Shalateen, Red Sea, Egypt.
20) Abd-Elaah, G. A. (1998). The occurrence of fungi along the Red Sea coast and variability among isolates of Fusarium as revealed by isozyme analysis. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, **38**:303-11.
21) Parra-Laca, R., Hernández-Hernández, F., Lanz-Mendoza, H., Gil, G. (2015). Isolation and Identification of Saprolegnia Sp from Fresh Water Aquarium Fishes and the Hemolymph Immune Response of Dactylopus coccus Costa de 1835 (Homoptera: Coccoidea: Dactylopidae) against this Oomycete. *Entomology, Ornithology and Herpetology*, **4**:1.
22) Polglase, J. L. Cephalopod diseases caused by fungi and labyrinthulomycetes. Handbook of pathogens and diseases in cephalopods: Springer; 2019. p. 113-22.
23) Junaid, S ,.Olarubofin, F., Olabode, A. (2010). Mycotic contamination of stockfish sold in Jos, Nigeria. *Journal of Yeast and Fungal Research*, **1**:136-41.
24) Refai, M., Laila, A. M., Kenawy Amany, M., Shimaa, E.-S. (2008). The assessment of mycotic settlement of freshwater fishes in Egypt.
25) Shahbazian, N., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Soltani, M., Khosravi, A., Mirzargar, S., Sharifpour, I. (2010). Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae.
26) Fadaeifard, F., Bahrami, H., Rahimi, E., Najafipoor, A. (2011). Freshwater fungi isolated from eggs and broodstocks with an emphasis on Saprolegnia in rainbow trout farms in west Iran. *African Journal of Microbiology Research*, **5**:3647-51.
27) Iqbal, Z., Najam, U., Saleemi, S. (2014). Fungal infection in silver carp, Hypophthalmichthys molitrix (valenceinnes) reared in earthen pond. *Science International (Lahore)*, **26**:261-6.

28) Iqbal, Z., Mumtaz, R. (2013). Some fungal pathogens of an ornamental fish, black moor (Carassius auratus l). *Eur J Vet Med*, **2**:1-10.
29) Abdel-Sater, M., Abdel-Hadi, A., Abdul-Raouf, U., Mohamed, F. A., Emamn, A. (2017). Mycobiota associated with some Red Sea fish, shellfish and their environment at Hurghada, Egypt. *J Basic Appl Mycol*,8-23:9.
30) Dzyuba, E. V., Kondratov, I. G., Maikova, O. O., Nebesnykh, I. A., Khanaev, I. V., Denikina, N. N. (2020). Water Molds of the Order Saprolegniales (Oomycota) in Association with Fish and Sponge Species from Lake Baikal. *Biology Bulletin*, **47**:51.4-21
31) Pietsch, C. (2020). Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. *Mycotoxin Res*, **36**:41-62.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 1,
Spring & Summer 2022

Investigation of the prevalence of fungal infections in the skin and gills of freshwater ornamental fish in Tehran city

Mehdi Ebrahimi Jafari[1], Mansour Bayat[2*], Adel Haghigi Khabani Asl[3], Seyed Jamal Hashemi[4]
1. Ph.D. student in Mycology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor of Mycology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor of Pathology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Professor of Mycology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Received: 9 July 2019 *Accepted: 1 October 2020*

Abstract
Background of the study: In the cultured and ornamental fish industry, fungal organisms threaten young and adult cultured populations and lead to the decay of eggs and larvae. Fungal Infections Secondary infections in fish are caused by primary parasitic, viral and bacterial organisms.
Objective: In this research, the number of fungal infections and their type of infection in ornamental fish should be determined.
Methods: This study was conducted on 92 ornamental fish with clinical symptoms. The samples were obtained from different places. After identifying the fungi, their abundance was checked by culture and PCR.
Results: Out of the total of 92 investigated cases, the skin and gills had lesions in 32 cases, and the result of mushroom culture was positive. In the PCR analysis of these 32 samples, the fungal species identified by gene sequence were 53% Cladosporium, 18.7% Candida, 12.5% Penicillium, and 3% Aureobasidium pullulans and 3% Rhodotorula yeast. Pathological lesions in the gills were dark and hyperemic; under the microscope, epithelial cells were shed, and leukocytes were present. It was seen in the skin as macroscopic and microscopic wounds.
Finally, these fungi are responsible for forming lesions seen under certain conditions, such as environmental instability and immunosuppressive factors.

Keywords: Ornamental fish, abundance, fungus, skin, gills

**Corresponding author: Mansour Bayat*
Address: Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
E. mail: m.bayat@srbiau.ac.ir