

## شناسائی و جداسازی قارچ‌های شکمبه گاو سیستانی در زابل

الهام رخشانی<sup>۱</sup>، محمد رضا دهقانی<sup>۲\*</sup>، محمد چمنی<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۸

### چکیده

گاو سیستانی بومی منطقه سیستان است. این تحقیق با هدف ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ‌های شکمبه‌ای بی‌هوازی در گاو سیستانی انجام شد. نمونه محتویات جامد و مایع شکمبه از ۵۰ رأس گاو سیستانی بالغ در کشتارگاه زابل در مدت ده روز تهیه و به عنوان منبع قارچ جهت تلقیح به محیط کشت استفاده شدند در این آزمایش از محیط کشت نیمه‌تعریف شده و کاملاً بی‌هوازی برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ استفاده شد... از روش رول باتل برای خالص‌سازی قارچ‌های بی‌هوازی و از محلول آنتی‌بیوتیکی (آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و کلرامفنیکل) برای مهار رشد باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های خالص‌سازی پرگنهی قارچ به محیط کشت منتقل و بعد از رشد به روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی، جنس *Neocallimastix* و گونه‌های *Orpinomyces joyonni*, *Piromyces mae*, *Piromyces communis*, *Piromyces minutus*, *Piromyces rhizinflata* در شکمبه گاو سیستانی شناسایی شدند. با شناسایی این گونه‌های قارچ در شکمبه گاو سیستانی، آزمایش‌های مولکولی و استخراج آنزیم برای بررسی بیشتر خصوصیات این گونه‌ها در پژوهش‌های آینده توصیه می‌شود.

**کلمات کلیدی:** مورفولوژی، شکمبه، قارچ‌های بی‌هوازی، گاو سیستانی

\*نویسنده مسئول: محمد رضا دهقانی

آدرس: گروه علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران. تلفن: ۰۵۴۳۲۲۴۴۴۴۳

پست الکترونیک: mohrezadehghani@yahoo.com

مقدمه

توده میکروبی در شکمبه شامل انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها می باشد. قارچ‌های بی‌هوازی یک گروه مهم از میکروارگانیسم های شکمبه هستند که به طور خاص در هضم مواد گیاهی در سراسر دستگاه گوارش نقش دارند (۵ و ۱۴). تاکنون شش جنس از قارچ‌های بی‌هوازی شناخته شده‌اند: *Caecomyces* (۱۶ و ۳۳)، *Piromyces* (۳۴)، *Neocallimastix* (۳۳) که الگوهای رشد مونوسنتریک دارا بوده و *Anaeromyces* (۷)، *Orpinomyces* (۲) و *Ruminomyces* (۲۱) که الگوهای رشد پلی سنتریک دارند. قارچ‌های بی‌هوازی در چرخه زندگی دارای دو شکل متحرک زئوسپور و شکل غیر متحرک نباتی (تالوس) هستند (۳ و ۳۵). قارچ‌ها در دستگاه گوارش تمام مناطق جغرافیایی جهان یافت شده‌اند. قارچ *Neocallimastix frontalis* را از شکمبه گوسفند جدا شد و این قارچ به بافت‌های گیاهان حمله کرده و با رشد میسیلیوم توسعه می یابد (۳۲). یک سویه جدید از قارچ به شدت بی‌هوازی از شکمبه گوسفند جدا شده که این گونه توسط یک تالوس پلی سنتریک، یک ریزومیسیلیوم گسترده و پلی نوکلئاز و زئوسپور-های چند تاژک‌دار مشخص شده است که به گونه *Neocallimastix joyonni* نامگذاری شده است (۶). قارچ‌های بی‌هوازی تاکنون فقط از دستگاه گوارش پستانداران گیاهخوار استخراج شده‌اند و تلاش‌های صورت گرفته برای جداسازی آنها از دستگاه گوارش سایر جانوران خشکی‌زی و آبی بی‌نتیجه بوده است (۱۰ و ۲۱). ۱۲ گونه قارچ بی‌هوازی از نمونه‌های مدفوع گاو میش وحشی باتلاقی جدا شدند و بر اساس ویژگی مورفولوژی به عنوان گونه‌های *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces*,

*Neocallimastix* تعیین شدند (۳۷). در پژوهش دیگری قارچ‌های بی‌هوازی از مایع شکمبه گوسفند و از مدفوع لاما و گاو کوهان‌دار جدا شدند که بر اساس شکل شناسی و خصوصیات رشد، ۵ سویه به عنوان گونه‌های *Neocallimastix* شناسایی شدند (۲۹). Barr و همکاران (۱۹۸۹) مراحل رشد و نمو و تنوع شکل شناسی سه گونه قارچ *Neocallimastix sp.*, *Piromyces communis* از شکمبه گاو هلشتاین را شرح دادند (۲). قارچ‌های بی‌هوازی از محتویات شکمبه و روده نشخوارکنندگان و غیرنشخوارکنندگان مختلف جدا شدند. *Piromyces communis* از پستانداران مختلفی استخراج شده است که از جمله می توان به استخراج آن از شکمبه گاو (۲)، شکمبه گوسفند (۳۴) و شکمبه بز (۳۶) اشاره کرد. گونه‌های *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caesomyces* بر اساس ویژگی شکل شناسی از گاو شیری، بوفالو، گوسفند، بز، گاو میش وحشی، فیل، گوزن، گورخر و گوساله‌ها شناسایی شدند (۳۱). گاو سیستانی یک نوع نژاد کوهان‌دار زبو (بوس/این‌دیکوس) است که زیستگاه آن در جنوب شرق ایران (زابل) است و می تواند آب و هوای گرم را تحمل کند. تاکنون پژوهشی در مورد ریخت شناسی قارچ‌های شکمبه گاو سیستانی انجام نشده است، لذا هدف از این تحقیق جداسازی، خالص سازی و شناسائی قارچ‌های شکمبه گاو سیستانی بوده است.

مواد و روش‌ها

برای رشد قارچ‌ها از محیط کشت نیمه تعریف شده استفاده شد. محیط کشت، مخلوطی از محلول نمکی A و B و مایع صاف شده شکمبه بود (۳۰). ترکیبات محلول نمکی A (۳ گرم دی پتاسیم هیدروژن



مایع شکمبه (محتویات جامد و مایع) از ۵۰ رأس گاو سیستمی به مدت ۱۰ روز پس از کشتار در کشتارگاه سیستم به طور تصادفی جمع‌آوری شد. به منظور حفظ دمای آن تا زمان انتقال به آزمایشگاه از فلاسک حاوی آب ۳۹ درجه استفاده شد و با پارچه چند لایه صاف شد. مایع شکمبه گاو سیستمی (۱ میلی لیتر) به هر بطری سرم تزریق شد و در انکوباتور (۳۹ درجه سانتی‌گراد) به مدت سه روز نگهداری شد. بطری‌هایی که قارچ رشد نموده بود (محیط کشت شفاف رنگ بوده و ذرات کاه به قسمت بالای بطری منتقل شده بود) جدا شدند. برای خالص‌سازی گونه‌های قارچ از روش رول باتل (Roll bottle) استفاده شد (۲۳). در این روش از محیط کشت دارای قارچ به لوله‌های شیشه‌ای حاوی محیط کشت آگار انتقال داده شد و با سرد کردن بر روی یخ به حالت چرخشی این لایه آگار در سطوح داخلی لوله‌ها تثبیت شد. کلونی‌هایی که در آگار رشد کردند به راحتی جدا شدند. نمونه قارچ روی یک اسلاید شیشه‌ای منتقل شد و در یک میکروسکوپ نوری ( Hunt wetzlar, Germany) متصل به رایانه مشاهده و از هر گونه عکس برداری شد.

### نتایج

قارچ‌های شکمبه‌ای جدا شده از گاو سیستمی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- جنس و گونه‌های جدا شده از شکمبه گاو سیستمی

| جنس گونه           |                      |                       |
|--------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Orpinomyces</i> | <i>Piromyces</i>     | <i>Neocallimastix</i> |
| <i>Orpinomyces</i> | <i>Piromyces</i>     | ---                   |
| <i>joyonii</i>     | <i>communis</i>      | ---                   |
|                    | <i>Piromyces</i>     | ---                   |
|                    | <i>minutus</i>       | ---                   |
|                    | <i>Piromyces</i>     | ---                   |
|                    | <i>rhizinflata</i>   | ---                   |
|                    | <i>Piromyces mae</i> | ---                   |

*Neocallimastix sp.*: این قارچ‌ها دارای تالوس مونوسپتريک و اسپورانژیوم‌های اندوزنوس یا اگزوزنوس می‌باشند (تصویر ۱A و ۱B).

فسفات) و محلول نمکی B (۳ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۶ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۶ گرم سولفات منیزیم، ۶ گرم کلرید سدیم، ۰/۶ گرم کلرید کلسیم) بود. محیط کشت نهائی، مخلوطی از محلول نمکی A (۱۵۰ میلی لیتر)، محلول نمکی B (۱۵۰ میلی لیتر)، مایع صاف شده شکمبه (مایع شکمبه سانتریفیوژ شده به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰) (۱۵۰ میلی لیتر)، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون تریپتیکاز، ۶ گرم بی‌کربنات سدیم، ۱ گرم آل سیستین هیدروکلراید، ۷ گرم گلوکز بود که با آب مقطر به حجم یک لیتر تهیه شدند. از سیستمین هیدروکلراید به عنوان عامل احیا کننده استفاده شد. جهت حذف اکسیژن محیط کشت از گاز کربنیک خالص استفاده شد و از محلول ریزازورین جهت نشان دادن اکسیداسیون\_احیاء محیط کشت استفاده شد. ۵ میلی لیتر محیط کشت، به بطری‌های سرم (حجم ۹ میلی لیتر) تحت شرایط گاز کربنیک تزریق و بعد از گذاشتن درپوش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. برای جلوگیری از رشد باکتری ها از ۰/۲ میلی لیتر محلول آنتی-بیوتیکی که از مخلوط کردن ۵mg/ml پنی‌سیلین G، ۵mg/ml آمپی‌سیلین، ۵mg/ml اکسی‌تتراسایکلین، ۵mg/ml کلرامفنیکل، و ۵mg/ml استرپتومایسین سولفات) به مقدار ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد، به بطری‌های شیشه‌ای دارای محیط کشت افزوده شد. همچنین قطعات ریز کاه (۲-۴ سانتی متر) به بطری‌های سرم به عنوان نشانه رشد قارچ اضافه شد. به دلیل رشد قارچ، بطری‌های سرم به رنگ روشن و شفاف شده و ذرات کاه به علت تشکیل میسیلیوم قارچ به شکل به هم چسبیده در قسمت بالای بطری ها شناور شدند.

گونه تخم مرغی شکل و بدون ساقه است (تصویر ۶).

#### بحث

ژئوسپور قارچ‌ها به دو شکل اندوژنوس و اگزوژنوس وجود دارند. در حالت اندوژنوس ژئوسپور هسته را حفظ و اسپورانژیوم جدید تولید می‌کند در حالی که در حالت اگزوژنوس هسته از ژئوسپور خارج شده و اسپورانژیوم را تشکیل می‌دهد (۲۰ و ۲۴).

همچنین قارچ‌های بی‌هوازی از جهت تولید اندام تولید مثلی به دو شکل مونوستریک (تولید یک اندام تولید مثلی) و پلی‌ستریک (تولید چندین اندام تولید مثلی) هستند. مونوستریک یا پلی‌ستریک بودن از ویژگی‌های غیر قابل تغییر است. ژئوسپور تالوس را بسته به شرایط محیطی و جنس و گونه‌ی قارچ، به سه شکل مختلف تولید می‌نماید: ۱- اندوژنوس و مونوستریک ۲- اگزوژنوس و مونوستریک ۳- اگزوژنوس و پلی‌ستریک (۴). قارچ‌های مونوستریک سیستم ریزوئیدی، در حالی که قارچ‌های پلی‌ستریک، سیستم ریزومیسیلیومی تولید می‌کنند در هر دو نوع توسعه مونوستریک، هر اسپورانژیوم فقط یک تالوس تشکیل می‌دهد و فقط اسپورانژیوم هسته را شامل می‌شود (۲۰ و ۲۴). در قارچ پلی‌ستریک هسته به بیرون از کیست ژئوسپور مهاجرت می‌کند (توسعه اسپورانژیوم اگزوژنوس) و دستخوش تقسیمات میتوز در ریزومیسیلیوم می‌شود که متعاقباً تشکیل چندین اسپورانژیوم می‌دهد. بنابراین، در قارچ پلی‌ستریک، هم اسپورانژیوم و هم ریزومیسیلیوم هسته را شامل می‌شوند (۱۳ و ۲۲). قارچ‌ها این توانایی را دارند که با سیستم ریزوئیدی به بافت‌های گیاهی که برای دیگر میکروب‌ها قابل

*Orpinomyces joyonii*. در این جنس اسپورانژیوم اگزوژنوس و کروی یا بیضی شکل است. تصویر ۲A اسپورانژیوم‌های منشعب و تصویر ۲B اسپورانژیوم بیضی شکل را نشان می‌دهد.

*Piromyces sp.*: این قارچ‌ها دارای ژئوسپورهای تک‌تازکی و سیستم ریزوئیدی رشته‌ای بودند. اسپورانژیوم در این جنس بی‌قاعده (نامنظم)، تخم‌مرغی شکل و کشیده است. همچنین دارای برآمدگی‌های پاپیلا و غیر پاپیلا همراه با تارهای ریزوئیدی می‌باشد. ژئوسپور در این جنس کروی تا گلابی شکل است و اغلب با یک تازک دیده می‌شود. این قارچ مونوستریک است (تصاویر ۶-۳).

*Piromyces minutus*: اسپورانژیوم در این گونه اندوژنوس و به شکل‌های کروی، گلابی شکل یا بیضوی وجود دارند. گونه پیرومایسس مینوتوس مونوستریک بوده و ریزوئیدها از یک و گاهی بیش از یک ریزوئید اصلی منشأ می‌گیرند (تصویر ۳).

*Piromyces rhizinflata*: اسپورانژیوم در این گونه اندوژنوس یا اگزوژنوس و دارای چند اسپورانژیوم می‌باشند. اسپورانژیوم‌های کوچک ممکن است طویل بوده درحالی که اسپورانژیوم‌های بزرگ‌تر گلابی شکل، تخم‌مرغی، بیضوی و یا تقریباً کروی با قطری ۷۰ تا ۱۰۰ میکرومتر هستند. تالوس در پیرومایسس ریزینفلاتا مونوستریک است (تصویر ۴).

*Piromyces communis*: در این گونه ریزوئیدها وجود دارند که پهنای ریزوئید اصلی حدود پنج تا پانزده میکرومتر است. ریزوئید اصلی کامل مستقیم و یکنواخت است (تصویر ۵).

*Piromyces mae*: در این جنس اسپورانژیوم شبیه به قلب است و اندوژنوس می‌باشد اسپورانژیوم در این

و ریزوئید اصلی یک حلقه در اسپورانژیوم اندوژنوس کروی بوجود می‌آورد (۲۶). وجود قارچ نئوکالیماستیکس در دستگاه گوارش علفخوارها با جداسازی *N. frontalis* از شکمبه گوسفند ثابت شد. این کار توسط Orpin در سال ۱۹۷۵ در انگلستان صورت گرفت (۳۲). این قارچ از شکمبه گاو، شکمبه گاو میش و شکمبه گوسفند (۲ و ۴) جدا شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

*Orpinomyces joyonni* اسپورانژیوم در ابتدا رشدی ندارد و تنها اسپورانژیوفور ابتدائی توسعه پیدا می‌کند. ریشه‌ها در این گونه‌ها خیلی نازک هستند. اسپورانژیوم آگزوژنوس روی اسپورانژیوفور ساده قرار دارد و سیستم ریزوئیدی با ساز و کار خاصی در بافت گیاهی نفوذ می‌کند. این گونه‌ها با تولید یک میسیلیوم چند هسته‌ای جوانه می‌زنند. اسپورانژیوم‌ها منشعب یا غیر منشعب هستند و اسپورانژیوم آگزوژنوس کروی تشکیل دادند. زئوسپورها کروی و طول تاژک آن‌ها حدود ۳۱-۴ میکرومتر است. زئوسپورها تشکیل سیست داده و سیست لوله زایا تولید که به میسیلیوم چند هسته‌ای توسعه پیدا می‌نماید (۱۸). در مقابل قارچ مونوستریک، سیست‌های این گونه‌ها به اسپورانژیوم‌های مضاعف (متعدد) جوانه تولید می‌کنند. کشت اولیه این گونه‌ها هیچ رشد اسپورانژیوم ندارد و تنها اسپورانژیوم‌های اولیه توسعه پیدا می‌کند. ریشه‌ها در این گونه خیلی نازک بودند. اسپورانژیوم آگزوژنوس روی اسپورانژیوفور ساده قرار دارد (تصویر ۲). در تصویر ۲A اسپورانژیوم این گونه که منشعب شده را نشان داده است. اسپرانژیوم در این گونه جدا شده بیضی شکل بود (تصویر ۲B). این با خصوصیات این قارچ‌های جدا شده مطابقت دارد. این گونه از شکمبه گاو در

دسترس نیست، نفوذ کنند (۲۵). گونه‌های *Orpinomyces* و *Piromyces* *Neocallimastix* توانایی زیادی برای تجزیه فیبر دارند. *Caecomyces* فاقد سیستم ریزوئیدی توسعه یافته بوده و نمی‌توانند فیبر را کامل تجزیه کنند (۳۸).

*Neocallimastix* قارچ نئوکالیماستیکس، یک تالوس مونوستریک و اسپورانژیوم اندوژنوس یا آگزوژنوس دارد. اسپورانژیوم نئوکالیماستیکس روی اسپورانژیوفور کوتاه یا بلند قرار دارد. اسپورانژیوم آگزوژنوس مونوستریک از جنس نئوکالیماستیکس کروی، گلابی شکل، تخم‌مرغی و گاهی اوقات با شکل نامنظم هست و اسپورانژیوم اندوژنوس مونوستریک بیضی، گلابی یا تخم‌مرغی شکل با اندازه قطر متغیر بین ۱۰۰-۱۰ میکرومتر است. سیستم ریزوئیدی جنس نئوکالیماستیکس بسیار منشعب و شاخه‌دار است. زئوسپورها چند تاژکی هستند که شکل و اندازه‌شان مختلف است. اشکال زئوسپور گونه‌ها در این جنس بیضی شکل هستند. تصویر انشان می‌دهد که این قارچ دارای تالوس با اسپورانژیوم آگزوژنوس و اسپورانژیوفورهای نسبتاً کوتاه می‌باشد. اسپورانژیوم اندوژنوس و اسپورانژیوفور نسبتاً کوتاه دارای ریزوئیدهای فراوانی هست که این ریزوئیدها در هضم فیزیکی و شیمیایی مواد فیبری نقش بسزایی دارند. این جنس با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی ارابه شده (۱ و ۳۰) شناسائی که با این تحقیق مطابقت دارد. اسپورانژیوم آگزوژنوس کروی یا بی‌قاعده روی اسپورانژیوفور بیضی شکل و طویل قرار دارند. اسپورانژیوم آگزوژنوس بیضی روی اسپورانژیوفور کوتاه قرار دارد. یک اسپورانژیوم اندوژنوس کروی وجود دارد که سیستم ریزوئیدی از دو محور اصلی منشعب شده

اسپورانژیوم اندوزنوس کروی و باریک در ناحیه گردن وجود دارد. (تصویر ۴). سیستم ریزویدی انشعابات زیادی دارد (تصویر ۴). سیستم ریزویدی یک سیست زئوسپور که با اسپورانژیوم آگزوزنوس گلابی شکل که روی اسپورانژیوفور کوچک واقع شده تولید می کند و در تالوس های بزرگ به حدود یک میلی متر می رسد. *پیرومایسس ریزینفلاتا* نخستین بار توسط Breton و همکاران در سال ۱۹۹۱ در تونس از مدفوع الاغ صحرایی استخراج شد (۹). *پیرومایسس ریزینفلاتا* از شکمبه گاو و گوسفند در مالزی (۲۱)، شکمبه گاو میش وحشی در کانادا (۱) و مدفوع الاغ در فرانسه (۸) جدا شد.

*Piromyces communis* شکل اسپورانژیوم در این گونه گلابی شکل هست. علامت تشخیص این گونه، گردن پهن بود (تصویر ۵). از ویژگی قابل توجه این جدایه این است که توسعه مونوستریک هم اندوزنوس و هم آگزوزنوس نشان دادند. اسپورانژیوم بیضوی یا گلابی شکل هست و آنهایی که از کیست زئوسپور توسعه پیدا کردند، کروی هستند. یک مشخصه مهم از *پیرومایسس کومونیس* این است که اسپورانژیا و اسپورانژیوفورها شکننده هستند و از سیستم ریزویدی شکسته شدند. زئوسپور تک تاژکی دارد. Chamani و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند زئوسپور در گونه *پیرومایسس کومونیس* تک تاژکی و در بیشتر موارد کروی شکل است. تحقیقات دیگر محققان نشان داد زئوسپور در گونه هایی که به تک تاژکی مشهورند، معمولاً یک تاژک داشته ولی در برخی موارد ممکن است زئوسپورهای ۲ تا ۴ تاژکی نیز در بین آنها دیده شود. زئوسپورهای فعال گونه های چند تاژکی همیشه بیش از ۴ تاژک دارند (۱۶). گردن باریک یکی از ویژگی های متمایز کننده

کانادا (۲۸) شکمبه گاو در آمریکا (۳۸)، شکمبه گوسفند در ایران (۱۱) شکمبه گوسفند در مالزی (۲۱) جدا شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

*Piromyces minutus* این گونه ها تالوس مونوستریک با اسپورانژیوم اندوزنوس دارد. اسپورانژیوم، بیضی، گلابی و کروی شکل هست. سیستم ریزویدی از محور اصلی منشعب شده و ریزوئید اصلی هیچ انشعابی ندارد و به سیستم ریزویدی با انشعابات کم ختم می شود. ریشه تنگ شده است و اسپورانژیوم کوچک این گونه ها، در مقایسه با گونه های دیگر، علامت تشخیص این گونه هست. این گونه دارای کوچکترین اسپورانژیوم در بین جنس *پیرومایسس* می باشد که با این نشانه می توان این گونه را شناسایی کرد و ریشه تالوس دارای تنگ شدگی ها و تورم می باشد (تصویر ۳). زئوسپورها از رأس اسپورانژیوم تخریب شده و از راه یک روزنه بزرگ آزاد می شوند. در اسپورانژیوم های بزرگ ممکن است دو روزنه ایجاد شود. دیواره اسپورانژیوم پس از رها شدن زئوسپورها سالم باقی می ماند. زئوسپورها کروی (پنج تا ده میکرومتر) و تک تاژکی می باشند. تنگ شدگی هایی ممکن است در ریزوئیدها دیده شوند. *پیرومایسس مینوتوس* نخستین بار توسط Ho و همکاران در سال ۱۹۹۳ از شکمبه گاو و گوسفند استخراج شد (۱۹). این گونه از شکمبه گوسفند و بز در مالزی جدا شده و با ویژگی های ریخت شناختی ارایه شده (۴ و ۲۱) همخوانی دارد.

*Piromyces rhizinflata* *پیرومایسس ریزینفلاتا* اسپورانژیوم اندوزنوس یا آگزوزنوس بوده و در این گونه اسپورانژیوم اندوزنوس گلابی شکل با استیگما (کلاله) در زیر اسپورانژیوم قرار دارد.



ویژگی‌های قارچ‌های شکمبه این نژاد در تحقیقات آینده توصیه می‌شود.

#### تشکر و قدردانی

لازم است از مدیریت گروه علوم دامی دانشگاه زابل، آزمایشگاه گروه علوم دامی و گیاهپزشکی سرکار خانم مهندس نخعی مقدم و همچنین مدیران کشتارگاه زابل جهت همکاری تشکر و قدردانی شود.

#### References

1. Barr D.J.S. (1995). Contributions on the morphology and taxonomy of some rumen fungi from Canada. *Mycotaxon LIV* 53: 203-214.
2. Barr D.J.S., Kudo H., Jackober K.D. Cheng K.J. (1989). Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp, *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis*, gen. nov., sp. nov. *Canadian Journal Chemistry* 67: 2815-2824.
3. Barrett S.P. (1997). Human intestinal spirochaetosis (Diseases Associated With Intestinal Spirochaetes). In: *Intestinal Spirochaetes In: Domestic Animals and Humans*. ed. D. J. Hampson and T. B. Stanton. CAB International (ISBN 0 85199 140 8). PP: 243-266.
4. Bauchop, T. (1979) Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Applied and Environment Microbiology* 38:148-158.
5. Bradshaw L.J. (1992). Metabolism of Microorganisms. In *Laboratory Microbiology*. 4th edn. ed. L. J. Bradshaw. Saunders College Publishing (ISBN 0 03 047442 6). PP: 137-213.
6. Breton A., Bernalier A., Bonnemoy F., Fonty G., Gaillard B. Gouet P. (1989). Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. *FEMS Microbiology Letters* 58: 309-314.
7. Breton A., Bernalier A. Dusser M. (1990). *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov.sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS Microbiology Letters* 70: 177-182.
8. Breton, A., Dusser, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., Millet, L.

این گونه از سایر گونه‌های پیرومایسس است که این ویژگی مشابه گزارش Chamani و همکاران در سال ۲۰۰۴ می‌باشد (۱۱). پیرومایسس کومونیس نخستین بار توسط Orpin (۱۹۷۷) در انگلستان از شکمبه گوسفند استخراج شد (۳۴). تاکنون این گونه از پستانداران مختلف مناطق گوناگون استخراج شده است که از جمله می‌توان به استخراج آن از شکمبه گوسفند در فرانسه (۱۵ و ۱۷) و انگلستان (۳۴) اشاره کرد. این گونه نیز از دستگاه گوارش گوسفند و بز استخراج شده و از این لحاظ با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

*Piromyces mae* اسپورانژیوم اندوژنوس و گردن خیلی تنگ از ویژگی مورفولوژیکی این گونه بود. این گونه دارای ریزوئید منشعب و باریک که طول آن تا ۱۷۰ میکرومتر بوده و یک اسپورانژیوم تخم مرغی شکل است. ریزوئید اصلی طویل شده و به یک اسپورانژیوم متورم وصل می‌شود. اسپورانژیوم ساقه و پایه ندارد و ریزوئیدها به صورت منشعب در این گونه دیده می‌شود (تصویر ۶). زئوسپور در این گونه تخم مرغی شکل و یا کروی است که بدون تاژک و یا به ندرت دو تاژک دارند (۲۷). طول تاژک ۲۳ تا ۳۰ میکرومتر است. این گونه از شکمبه و مدفوع گاو (۱۲)، مدفوع گوسفند (۳۰) و سکوم اسب در کانادا (۲۷) جدا شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

#### نتیجه گیری

از قارچ‌های بی‌هوازی جنس‌های *Neocallimastix*, *Piromyces* و *Orpinomyces* در شکمبه گاو سیستانی در مرحله مراحل رشد مونوستریک و پلی‌ستریک شناخته شدند. انجام آزمون ملکولی و استخراج آنزیم برای بررسی بیشتر



- polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. *Journal of General Microbiology* **134**: 1123-1129.
18. **Ho Y.W. and Bauchop T.** (1991). Morphology of three polycentric rumen fungi and description of a procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in cultures. *Journal of General Microbiology* **137**: 213-217.
  19. **Ho Y.W., Barr D.J.S., Abdullah N., Jalaludin S. Kudo H.** (1993). A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. *Mycotaxon* **47**: 285-293.
  20. **Ho Y.W., Khoo I.Y.S. and Tan S.G.** (1994). Isozyme analysis of anaerobic rumen fungi and their relationship to aerobic chytrids. *Microbiology* **140**: 1495-1504.
  21. **Ho Y.W. and Barr D.J.S.** (1995). Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycology Research* **87**: 655-677.
  22. **Hungate, R.E.** (1966) The rumen bacteria. In: *The Rumen and Its Microbes*, ed. R. E. Hungate. Academic Press Inc. New York and London. pp. 8-90.
  23. **Joblin K.N.** (1981). Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied Environmental Microbiology* **42**: 1119-1122.
  24. **Karling J.S.** (1978). *Chytriomycetorum Iconographia: Illustrated and Descriptive Guide to the Chytridiomycetous Genera with a Supplement on the Hyphochytridiomycetes*. *J. Cramer: Monticello, NY- Lubrecht and Cramer*.
  25. **Kopecny J. and Hodrova B.** (1995). Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Letters Applied Microbiology* **20**: 312-316.
  26. **Kostyukovsky V.A., Okunev O.N. Tarakanov B.V.** (1991). Description of two anaerobic fungal strains from the bovine rumen and influence of diet on the fungal population *in vivo*. *Journal of Microbiology* **137**: 1759-1764.
  27. **Li J., Heath I.B. Bauchop T.** (1990). *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of monoflagellated anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant. **Prensier, G.** (1991) *Piromyces rhizinflata* a species of strictly anaerobic fungus from feces of the Saharan ass: a morphological, metabolic and ultrastructural study. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 1-8.
  9. **Breton A., Martinie G. Gerbi C.** (1995). Location by fluorescence microscopy of glycosidases and a xylanase in the anaerobic gut fungi *Caecomycetes communis*, *Neocallimastix frontalis*, and *Piromyces rhizinflata*. *Current Microbiology* **31**: 224-227.
  10. **Brookman J.L., Mennim G. Trinci A.P.J.** (2000). Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology* **146**: 393-403.
  11. **Chamani M., Rezaeian M., Ershad J. Jamei P.** (2005). The identification of anaerobic fungi in the rumen of sheep and goat and evaluation of morphological, biochemical and metabolic characteristics. *Agriculture Science Journal* **7**: 117-134.
  12. **Davies D.R., Theodorou M.K., Lawrence M.I. Trinci A.P.J.** (1993). Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology* **139**: 1395-400.
  13. **Dore J. and Stahl D.A.** (1991). Phylogeny of anaerobic rumen chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparison. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1964-1971.
  14. **Fonty G. and Gouet P.H.** (1994). Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. Pp. 97-112. In: *Microorganisms in Ruminant Nutrition* Prins, R.A. and Stewart, C.S. eds. Nottingham University Press, Nottingham.
  15. **Gaillard B. and Citron A.** (1989). Ultrastructural study of two rumen fungi: *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *Current Microbiology* **18**: 83-86.
  16. **Gold J.J., Heath I.B. Bauchop T.** (1988). Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe *Caecomycetes* equine assigned to the *Neocallimasticaceae*. *Biosystems* **21**: 403-415
  17. **Hebraud M. and Fevre M.** (1988). Characterization of Glycoside and





- Canadian Journal of Botany* **68**: 1021-1033.
28. **Li J. and Heath I.B.** (1991). The development and zoospore ultrastructure of a polycentric chytridiomycete gut fungus, *Orpinomyces joyonii*. comb. *Canadian Journal of Botany* **69**: 580-589.
29. **Lolke S. and Bwee T.** (1993). Degradation and utilization of grass cell walls by anaerobic fungi isolated from yak, llama and sheep. *Animal Feed Science and Technology* **44**: 221-236.
30. **Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J.** (1987) Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. *Journal of General Microbiology* **133**: 1829-1834.
31. **Nagpal R., Puniya A.K., Sehgal J.P. Singh K.** (2011). In vitro fibrolytic potential of anaerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores. *Mycoscience* **52**: 31-38.
32. **Orpin C.G.** (1975). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology* **91**: 249-269
33. **Orpin C.G.** (1976). Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology* **94**: 270-280.
34. **Orpin C.G.** (1977). The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life-history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology* **99**: 107-117.
35. **Orpin C.G. and Bauntiff L.** (1978). Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology* **104**: 113-122.
36. **Sakurada M., Morgavi D.P., Tomita Y. Onodera R.** (1995). Chitinolytic activity of the anaerobic rumen fungus *Piromyces communis* OTS1. *Current Microbiology* **31**: 206-209.
37. **Tripathi V.K., Sehgal J.P., Puniya A.K. Singh K.** (2007). Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphustragocamelus*). *Journal of Anaerobe* **13**: 36-39
38. **Wubah D.A., Fuller M.S. Akin D.E.** (1991). Isolation of monocentric and polycentric fungi from the rumen and feces of cows in Georgia. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1232-1236.

## Identification and Isolation of Rumen Fungi of Sistani cattle in Sistan

**Rakhshani, E.<sup>1</sup>, Dehghani, M.R.<sup>2\*</sup>, Chamani, M.<sup>3</sup>**

1. Graduated student of M.Sc. of Animal Science Department, University of Zabol, Zabol, Iran

2. Assistant professor of Animal Science Department, University of Zabol, Zabol, Iran

3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received Date: 9 November 2015

Accepted Date: 26 July 2017

---

### **Abstract**

The Sistani cattle are indigenous breed of Sistan region. The purpose of this research was the separation and studying the appearance morphology of anaerobic fungi in the Sistani cattle rumen in Sistan region. Sampling from the solid and liquid contents of 50 Sistani cattle was done randomly in Zabol slaughterhouse and these samples were used as the source of fungus to inoculation to culture. The semi-defined medium environment was used in this research to cultivation, separation and purification of anaerobic fungi. The roll bottle method was used for purification of rumen fungi and the antibiotic solution (ampicillin, penicillin, streptomycin, oxytetracycline and chloramphenicol) were used for inhibiting growth of bacteria. Samples of pure fungi were transferred to culture and were observed after growth in glass slide with light microscope. With regard of morphologic characteristics the genus of *Neocallimastix* and species of *Orpinomyces joyonni*, *Piromyces mae*, *Piromyces communis*, *Piromyces minutus*, *Piromyces rhizinflata* was isolated in rumen of Sistani cattle. With identification of these fungi species in rumen of Sistani cattle, it is recommended to perform molecular test and enzyme extraction for more survey characteristics in future research.

**Keywords: Morphology, Rumen, Anaerobic fungi, Sistani cattle**

---

\*Corresponding author: M.R. Dehghani

Address: Animal Science Department, University of Zabol, Zabol, Iran. Tel: 05132244443

Email: Mohrezadehghani@yahoo.com