University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 10, No. 2, 2024, pages: 21-35
DOI: 10.22124/janb.2024.26738.1234

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Comparison of the fungal contamination in Rainbow trout feed in farms located in fields and mountains

Donya Nikaein[1], Aghil Sharifzadeh[1], Ahmad Erfanmanesh[2], Mohammad Sadegh Moradi[3], Mohammadreza Fatahpour[1]

1- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Department of Animal Biological Products, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran

Received 10 March 2024 Revised 11 June 2024 Accepted 14 June 2024

KEYWORDS

Fish feed

Rainbow trout

Fungal contamination

Aquaculture

ABSTRACT

Introduction: The consistent increase in aquatic consumption due to the limitation of marine resources has led to aquaculture development in the sea and on land. Mold contamination of feed decreases feed's nutritional and health quality by changing the composition of nutrients and producing mycotoxin. This study aimed to investigate the fungal contamination of rainbow trout in farm storage of six provinces including Kermanshah, Alborz, Qazvin, Lorestan, Tehran, and Mazandaran. The feed samples were contaminated with aflatoxigenic species at a rate of 78.57%, and the abundance of these species was 22.79%.

Materials and methods: After sampling the feed and preparing serial dilutions, surface culture was carried out in YGC medium and the total number of fungal colonies was counted. The genus and species of fungi were identified based on macroscopic and microscopic morphology and biochemical tests. The number of fungal colonies in all samples was lower than the standard level, and a total of 158 fungal isolates from 16 genera were obtained. The feed samples were discovered to be contaminated with the *Aspergillus* genus at a prevalence of 90.47% and an abundance of 70.25%.

Results: The fungal species *A. niger* and *A. fumigatus* were found to have the highest contamination levels of 80.95% and 66.66%, respectively in feed samples. These species also comprised 21.52% and 17.72% of the fungal

population in the feed. Contaminations of feed samples with *Fusarium* species and *Penicillium* species were 4.76% and 23.8%, and their abundance were 1.26% and 6.32%, respectively. Contamination with *A. fumigatus*, *Fusarium* species, and *Penicillium* species were higher in farms located in the plains.

Conclusion: Based on the research findings, it is revealed that despite the low number of fungal species in the feed samples, the highest abundance and percentage of contamination is related to the *Aspergillus* genus, especially species with the capability to produce both aflatoxin and ochratoxin.

*Corresponding author: dnikaein@ut.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال دهم، شماره دوم، تیر ۱۴۰۳، صفحات ۳۵-۲۱

DOI: 10.22124/janb.2024.26738.1234

"مقاله پژوهشی"

مقایسه آلودگی قارچی خوراک ماهی قزال آلای رنگین کمان در مزارع پرورشی مناطق دشت و کوهستان

دنیا نیک آئین[1*]، عقیل شریفی‌زاده[1]، احمد عرفان‌منش[2]، محمد صادق مرادی[3]، محمدرضا فتاح پور[1]

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

۲- گروه فراورده های بیولوژیک دامی، سازمان جهاد دانشگاهی تهران، تهران

۳- گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۵

چکیده

افزایش مداوم مصرف آبزیان به دلیل محدودیت منابع دریایی منجر به توسعه پرورش آبزیان در دریا و خشکی شده است. آلودگی قارچی خوراک با تغییر ترکیب مواد مغذی و تولید سموم قارچی باعث کاهش کیفیت غذایی و سلامتی خوراک می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی آلودگی قارچی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در انبار مزارع در شش استان کرمانشاه، البرز، قزوین، لرستان، تهران و مازندران انجام شد. بعد از نمونه‌برداری از خوراک و تهیه رقت‌های سریالی اقدام به کشت سطحی در محیط YGC و شمارش تعداد کلی پرگنه‌های قارچی شد. جنس و گونـه قارچها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی و آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. تعداد کلنی‌های قارچ در همه نمونه ها کمتر از حد استاندارد بود. در مجموع، ۱۵۸ جدایه قارچی از ۱۶ جنس قارچ از نمونه‌ها به دست آمد. آلودگی نمونه‌های خوراک به جنس آسپرژیلوس ۹۰/۴۷٪ و فراوانی این جنس ۷۰/۲۵٪ بود. آلودگی نمونه‌های خوراک به گونه‌های مولد آفلاتوکسین ۷۸/۵۷٪ و فراوانی این گونه‌ها ۲۲/۷۹٪ بود. آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۸۰/۹۵٪ و ۶۶/۶۶٪ آلودگی نمونه‌های خوراک و فراوانی ۲۱/۵۲٪ و ۱۷/۷۲٪ بیشترین آلودگی بین گونه‌های قارچی در خوراک را داشتند. آلودگی نمونه‌های خوراک به گونه‌های جنس فوزاریوم و جنس پنی‌سیلیوم ۴/۷۶٪ و فراوانی آنها در جمعیت قارچی ۱/۲۶٪ و ۶/۳۲٪ بود. آلودگی خوراک به گونه‌های آفلاتوکسین‌زا آسپرژیلوس و آسپرژیلوس نایجر در مزرعه‌های واقع در کوهستان بیشتر بود و آلودگی به گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس و جنس فوزاریوم و پنی‌سیلیوم در مزرعه‌های واقع در دشت بیشتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد با وجود پایین بودن تعداد کلی پرگنه‌های قارچی در نمونه‌ها خوراک بیشترین فراوانی و درصد آلودگی مربوط به جنس آسپرژیلوس و به‌خصوص گونه‌هایی با توانایی تولید سموم قارچی آفلاتوکسین و اکراتوکسین مربوط بود.

کلمات کلیدی

خوراک ماهی

آلودگی قارچی

قزل آلای رنگین کمان

آبزی‌پروری

نویسنده مسئول: dnikaein@ut.ac.ir

مقدمه

آبزیان به عنوان یکی از منابع تأمین کننده پروتئین جوامع انسانی حائز اهمیت است. بر اساس گزارش FAO مصرف آبزیان با رشد سالانه ۳٪ در بین سال‌های ۱۹۶۱ تا ۲۰۱۹ از ۹ کیلوگرم به ۲۰/۵ کیلوگرم رسیده است (Fisheries F.A.O., 2022). با وجود تداوم سالیانه افزایش تقاضا برای مصرف آبزیان میزان صید آنها از دهه ۹۰ میلادی به علت محدود شدن ذخایر دریایی ثابت مانده است (Marijani et al. 2019; Fisheries F.A.O, 2022). به جهت پاسخ به افزایش تقاضا برای آبزیان، آبزی‌پروری در دریا و خشکی توسعه پیدا کرده است، به شکلی که بر اساس اطلاعات موجود در سال ۲۰۲۰، ۴۹٪ تولید آبزیان در دنیا از راه پرورش آبزیان تأمین شده است (Oliveira and Vasconcelos, 2020; Fisheries F.A.O., 2022). در ایران پروش گونه قزل آلای رنگین کمان در دهه ۶۰ میلادی آغاز و امروز گونه غالب پرورش ماهیان سردآبی را به خود اختصاص داده است. تولید این ماهی در بین سال‌های ۱۹۹۳ تا ۲۰۱۰ با رشد سالیانه ۳۱/۸٪ از ۸۳۵ تن در سال به ۹۱۵۱۵ تن رسیده است (Adeli and Baghaei, 2013; Kalbassi et al. 2013).

خوراک با اختصاص دادن ۷۰-۵۰٪ هزینه‌های پرورش به خود نقش کلیدی در پرورش دارد (Bobadilla-Carrillo et al. 2020). در پرورش ماهیان قزل‌آلا خوراک نه تنها از لحاظ تغذیه‌ای و نیازهای ضروری باید کامل و متعادل باشد، بلکه از نظر بهداشتی نیز باید سالم و مطابق استاندارد باشد (Oliveira and Vasconcelos, 2020; Pietsch et al. 2020). مواد اولیه مورد استفاده در خوراک ماهی قزل‌آلا یکی از اصلی‌ترین راه‌های آلوده شدن خوراک به قارچ‌ها و سموم تولیدی توسط آنهاست. این مواد به دو دسته مواد اولیه با منشاء حیوانی مانند پودر گوشت و پودر ماهی و مواد اولیه با منشاء گیاهی مانند ذرت، گندم، گلوتن و کنجاله سویا تقسیم می‌شود که در فرمولاسیون خوراک استفاده می‌شود. مواد اولیه با منشاء گیاهی به علت در دسترس بودن و کاهش هزینه تولید در خوراک استفاده قرار می‌شوند، اما استفاده از این مواد اولیه امکان آلودگی خوراک به انواع قارچ‌ها و سموم تولیدی توسط آنها را به‌وجود می‌آورد (Matejova et al. 2017; Koetsi et al. 2021; Fisheries, F.A.O., 2022; Bashorun et al. 2023). در صورت افزایش رطوبت خوراک، قارچ‌ها با مصرف مواد مغذی خوراک و تولید سموم قارچی سلامت و کیفیت خوراک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. خوراک می‌تواند به جنس‌های مختلفی از قارچ‌ها آلوده شود، اما سه جنس آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم مهم‌ترین جنس‌ها برای تولید سموم قارچی در مناطق گرمسیری مانند ایران هستند (Matejova et al. 2017; Bobadilla-Carrillo et al. 2020). سموم قارچی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گونه‌های جنس‌های مختلف قارچ‌ها تولید می‌شوند. تا امروز حدوداً بیش از ۴۰۰-۳۰۰ نوع سموم قارچی شناسایی شده است، اما مهمترین آنها شامل آفلاتوکسین‌ها، فومونیزین‌ها، اکراتوکسین و تریکوتسن‌ها هستند (Oliveira and Vasconcelos, 2020; Koletsi et al. 2021).

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جزء حساس‌ترین گونه‌ها نسبت به سموم قارچی است. این سموم می‌توانند به تنهایی و یا با اثرات هم‌افزایی روی یکدیگر منجر به کاهش وزن‌گیری، افزایش ضریب تبدیل، کم خونی، خون‌ریزی، آسیب کبدی، تضعیف ایمنی و افزایش حساسیت نسبت به دیگر بیماری‌ها و در نهایت تلفات شوند (Matejova et al. 2017; Fisheries, F.A.O., 2022; Bobadilla-carrillo et al. 2020). همچنین باقی‌مانده این سموم و متابولیت‌هایی که با مصرف خوراک در بدن ماهی باقی می‌مانند، می‌توانند با مصرف آبزیان به انسان منتقل شوند که یک خطر بالقوه برای جوامع انسانی است (Matejova et al. 2017; Bashorun et al. 2023).

شرایط تولید و انبارداری خوراک نقش کلیدی در جلوگیری از رشد و تولید سموم قارچی دارد (Bobadilla-Carrillo et al. 2020; Piestsch et al. 2020). در مطالعات متعدد، اثر شرایط انبارداری بررسی و مشخص شده است که دما و رطوبت نسبی نقش مؤثری بر فعالیت قارچ‌های خوراک دارد (Bobadilla- Carrillo et al. 2020; Piestsch et al. 2020; Fisheries, F.A.O., 2022). مطالعه حاضر برای ارزیابی فلور قارچی خوراک ماهی قزل آلای رنگین کمان در انبار مزارع پرورش در دو

ناحیه آب و هوایی در ۶ استان که بخش قابل توجهی از تولید این گونه را به خود اختصاص داده، طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب مزارع و نمونه‌گیری

برای نمونه‌گیری، مزارع به دو دسته مزارع مستقر در مناطق کوهستانی و مرتفع و مزارع مستقر در دشت تقسیم بندی شدند و در مجموع از ۴۲ مزرعه در شش استان کرمانشاه، البرز، قزوین، لرستان، تهران و مازندران که شامل ۲۸ مزرعه در کوهستان و ۱۴ مزرعه در دشت بود، نمونه‌گیری انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱ نام استان ها و تعداد نمونه ها از هر استان

Table 1 The name of provinces and number of sampled from each province

	Province	Climate condition	
		Mountain	Plains
1	Kermanshah	6	2
2	Alborz	4	5
3	Qazvin	-	1
4	Lorestan	6	1
5	Tehran	7	5
6	Mazandaran	5	-
Total		28	14

نمونه برداری مطابق با استاندار ۷۵۷۰ سازمان ملی استاندارد ایران انجام شد. نمونه‌ها (۲-۱ کیلوگرم) بعد از نمونه‌برداری در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار قرار داده شدند. اطلاعات نمونه روی کیسه ثبت و در کم‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال شد (INSO, 2019).

آماده‌سازی نمونه

در آزمایشگاه ابتدا نمونه‌ها آسیاب و همگن شدند. سپس از نمونه‌های آسیاب شده برای کشت‌های قارچی استفاده شد. دیگر مقادیر نمونه‌ها به منظور نگهداری طولانی مدت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شمارش تعداد کلی پرگنه‌های قارچی

برای شمارش تعداد کلی پرگنه‌های قارچی از روش کشت سطحی و تهیه رقت‌های سریالی استفاده شد. به این شکل که ۱۰ گرم از نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط شد. از مخلوط حاصل رقت‌های سریالی 10^{-1} تا 10^{-5} تهیه شد و از سوسپانسیون حاصله ۱۰۰ میکرولیتر در سطح محیط یست گلوکز کلرامفنیکل (YGC) کشت داده شد و در ادامه محیط‌ها در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز گرم‌خانه‌گذاری شدند. برای تعیین رشد، پرگنه‌های محیط‌ها به صورت روزانه بررسی شدند و در در نهایت غلظتی که شمارش پرگنه‌های آن بین ۳۰۰-۳۰ عدد بود، انتخاب شد و با ضرب کردن در ضریب رقت، تعداد کلی پرگنه‌های قارچی در هر گرم خوراک به دست آمد. لازم به ذکر است تمامی کشت‌ها در سه تکرار صورت پذیرفتند (INSO, 2013).

جداسازی و شناسایی قارچ ها

پرگنه‌های رشد کرده در محیط YGC به محیط سابورو دکستروز آگار حاوی ۰/۰۵ درصد کلرامفنیکل انتقال داده شد و سپس در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری شد تا کشت خالص از هر پرگنه به دست آمد. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی ماکروسکوپیک مانند رنگ، قوام و شکل ظاهری پرگنه‌ها و همچنین خصوصیات ریخت‌شناسی میکروسکوپی مانند نوع هایفه و

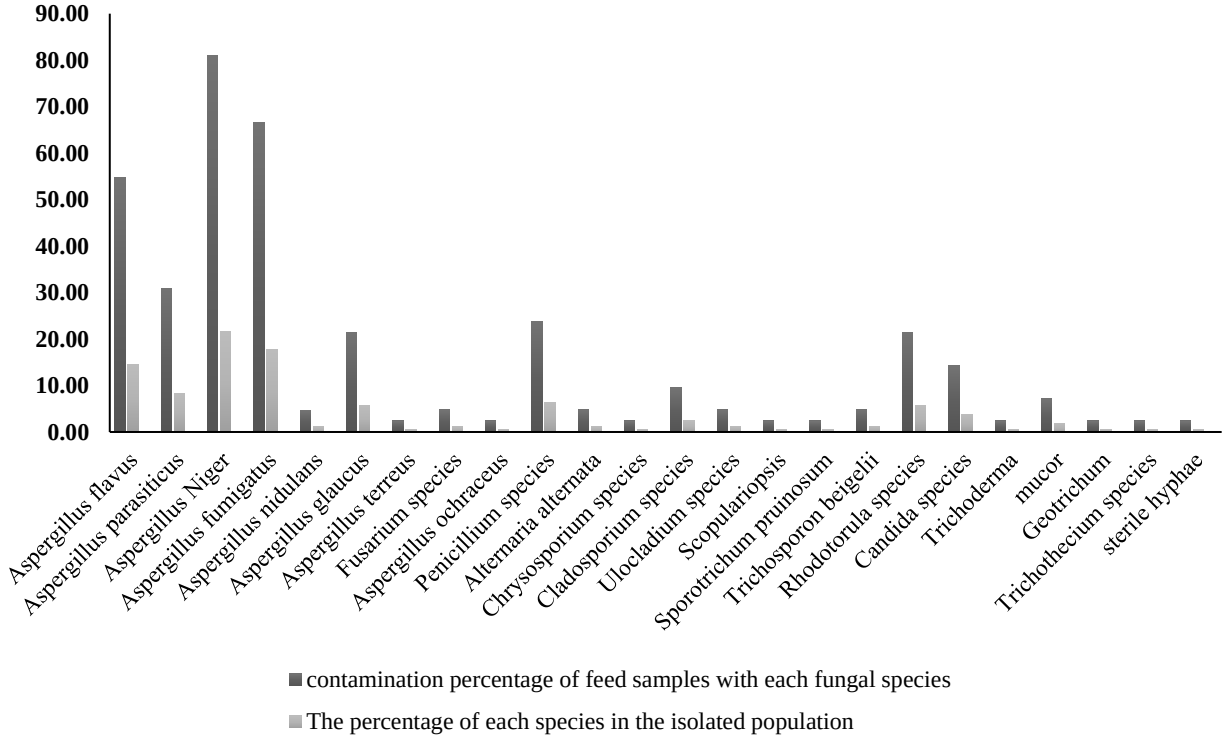
ساختار زایا و در ادامه انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی جنس و گونه قارچ‌ها شناسایی شد (INSO, 2003).

نتایج

در این مطالعه، تعداد کلی پرگنه‌های قارچی ۱۰-۳۵۰۰ CFU/g بود که در تمامی نمونه‌ها کمتر از حد مجاز 10^4 بود. اطلاعات مربوط به درصد آلودگی نمونه‌های خوراک به هر گونه قارچی و همچنین درصد فراوانی هر گونه قارچی در جمعیت گونه‌های خوراک در جداول ۲ و ۳ و شکل ۱ قابل مشاهده است. همچنین، درصد آلودگی خوراک و فراوانی‌های هر گونه برحسب موقعیت جغرافیایی مزارع در جداول ۴ و ۵ و شکل‌های ۲ و ۳ قابل مشاهده است. در این مطالعه در مجموع ۱۵۸ ایزوله قارچی از ۱۶ جنس آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، فوزاریوم، کاندیدا، موکور، آلترناریا، رودوترولا، کرایزوسپوریوم، کلادوسپوریوم، اوکلادیوم، اسکوپولاریوپسیس، اسپوروتریکوم، ترایکوسپورون، ژئوتریکوم و تریکوتیشیوم شناسایی شد.

آلودگی نمونه‌های خوراک به گونه‌های جنس آسپرژیلوس ۹۰٪/۴۷ (۳۸ نمونه) بود و فراوانی این جنس ۷۰/۲۵٪ بود. آلودگی نمونه‌های خوراک به گونه‌ی آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس به ترتیب ۵۴/۷۶٪ و ۳۰/۹۵٪ بود و فراوانی این دو گونه در جمعیت قارچ‌های جدا شده به ترتیب ۱۴/۵۶٪ و ۸/۲۳٪ گزارش شد. میزان آلودگی خوراک به دو گونه ذکر شده آسپرژیلوس در مزرعه‌های پرورشی واقع در مناطق کوهستان ۸۵/۷۱٪ و در مزرعه‌های پرورشی واقع در دشت ۶۴.۲۸٪ بود (جداول ۲، ۳، ۴ و ۵ و شکل ۲) آسپرژیلوس نایجر با ۸۰/۹۵٪ آلودگی نمونه‌های خوراک و فراوانی ۲۱/۵۲٪ بیشترین آلودگی بین تمامی گونه‌های قارچی در خوراک را داشت. آلودگی به گونه آسپرژیلوس نایجر در مزرعه‌های پرورشی واقع در مناطق کوهستانی ۸۲٪/۱۴ و در مزرعه‌های پرورشی واقع در دشت ۷۸/۵۷٪ بود (شکل ۳). در جایگاه دوم گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۶۶/۶۶٪ آلودگی در نمونه‌های خوراک و ۱۷/۷۲٪ فراوانی گونه‌ای را شامل شد. همچنین آلودگی به این گونه در مزرعه‌های پرورشی واقع در مناطق کوهستانی ۶۴/۲۸٪ و در مزرعه‌های پرورشی واقع در دشت ۷۱/۴۳٪ بود.

آلودگی نمونه‌های خوراک به گونه‌های جنس فوزاریوم ۴/۷۶ ٪ و فراوانی آن در جمعیت قارچی ۱/۲۶٪ بود. آلودگی خوراک به گونه‌های فوزاریوم در مزرعه‌های پرورشی واقع در مناطق کوهستانی صفر بود، اما از خوراک ۱۴/۲۸٪ مزرعه‌های پرورشی واقع در دشت این جنس جدا شد. گونه‌های قارچ پنی‌سیلیوم از ۲۳/۸٪ نمونه‌های خوراک جدا شد که فراوانی ۶/۳۲٪ را بین گونه‌های جدا شده داشت. همچنین گونه‌های جنس پنی‌سیلیوم از ۱۷/۸۶٪ خوراک مزرعه‌های پرورشی واقع در مناطق کوهستانی و ۳۵/۷۱٪ مزرعه‌های پرورشی واقع در دشت جدا شد.



شکل ۱ درصد آلودگی خوراک و فراوانی هر ایزوله در خوراک‌های مورد مطالعه

Figure 1 The percentage of feed contamination and the abundance of each species in isolated strains

جدول ۲ درصد آلودگی به گونه‌های آسپرژیلوس در نمونه‌های خوراک ماهیان قزل آلا و درصد فراوانی هر گونه در جمعیت شناسایی شده قارچی نمونه‌ها

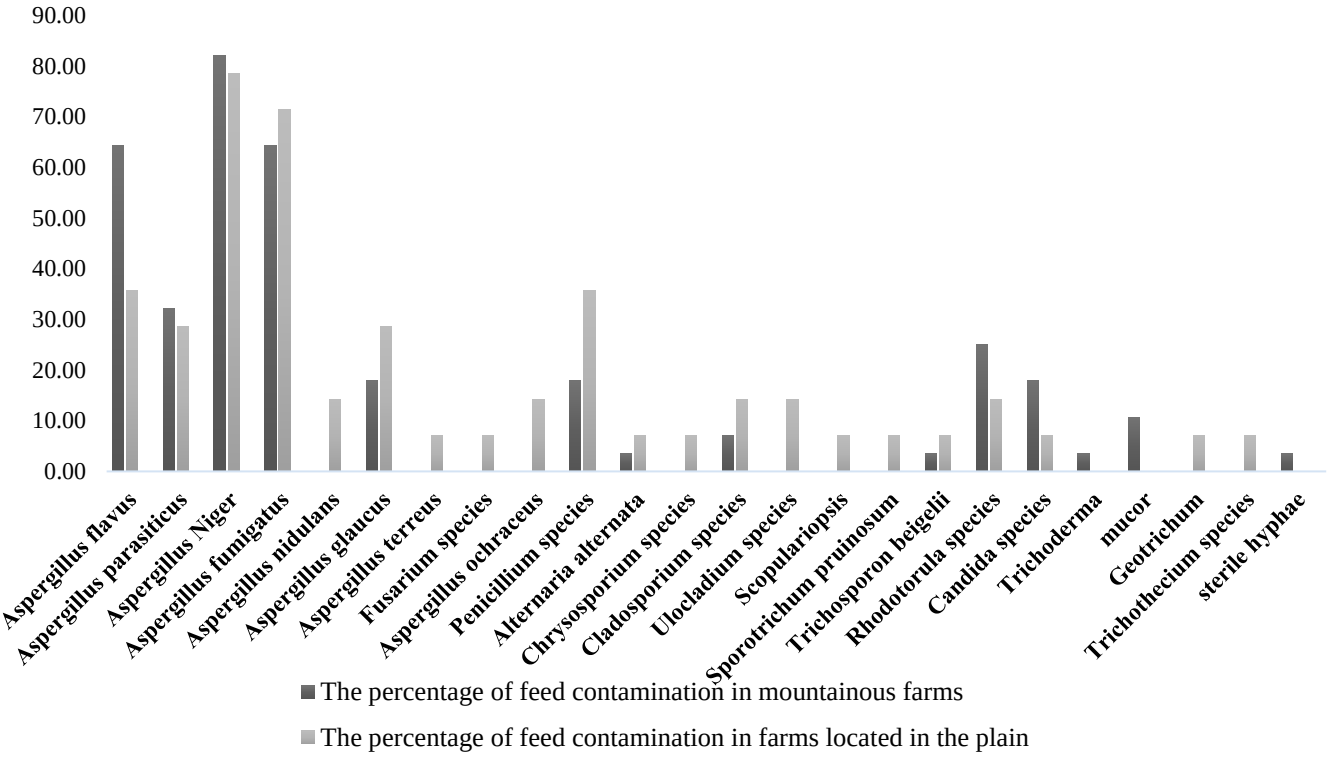
Table 2 The percentage of *Aspergillus* species contamination in trout feed samples and the abundance of each species in the identified fungal population of the samples

	Fungal species	Number of samples infected with fungus	The percentage of contamination of each isolate in feed samples	Percentage abundance of each fungal isolate in the total population
1	*Aspergillus flavus*	23	54.76	14.56
2	*A. parasiticus*	13	30.95	8.23
3	*A. niger*	34	80.95	21.52
4	*A. fumigatus*	28	66.66	17.72
5	*A. nidulans*	2	4.72	1.26
6	*A. glaucus*	9	21.42	5.7
7	*A. terreus*	1	2.38	0.63
8	*A. ochraceus*	1	2.38	0.63

جدول ۳ درصد آلودگی قارچی در نمونه‌های خوراک ماهیان قزل آلا و درصد فراوانی هر گونه در جمعیت شناسایی شده قارچی نمونه‌ها

Table 3. The percentage of fungal contamination in trout feed samples and the abundance of each species in the identified fungal population of the samples

	Fungal species	Number of samples infected with fungus	The percentage of contamination of each isolate in feed samples	Percentage abundance of each fungal isolate in the total population
1	*Aspergillus* species	38	90.47	70.25
2	*Fusarium* species	2	4.76	1.26
3	*Penicillium* species	10	23.8	6.33
4	*Alternaria alternata*	2	4.76	1.26
5	*Chrysosporium* species	1	2.38	0.63
6	*Cladosporium* species	4	9.52	2.53
7	*Ulocladium* species	2	4.76	1.26
8	*Scopulariopsis*	1	2.38	0.63
9	*Sporotrichum pruinosum*	1	2.38	0.63
10	*Trichosporon beigelii*	2	4.76	1.26
11	*Rhodotorula* species	9	21.42	5.7
12	*Candida* species	6	14.28	3.8
13	*Trichoderma*	1	2.38	0.63
14	*Mucor* spp.	3	7.14	1.9
15	*Geotrichum*	1	2.38	0.63
16	*Trichothecium* species	1	2.38	0.63
17	Sterile hyphae	1	2.38	0.63



شکل ۲ درصد آلودگی قارچی خوراک در مزارع واقع در کوهستان و دشت

Figure 2 Percentage of fungal contamination of feed in farms located in mountains and plains

جدول ۴ مقایسه درصد آلودگی نمونه‌های خوراک و فراوانی گونه‌های آسپرژیلوس در مناطق آب و هوایی کوهستانی و دشت

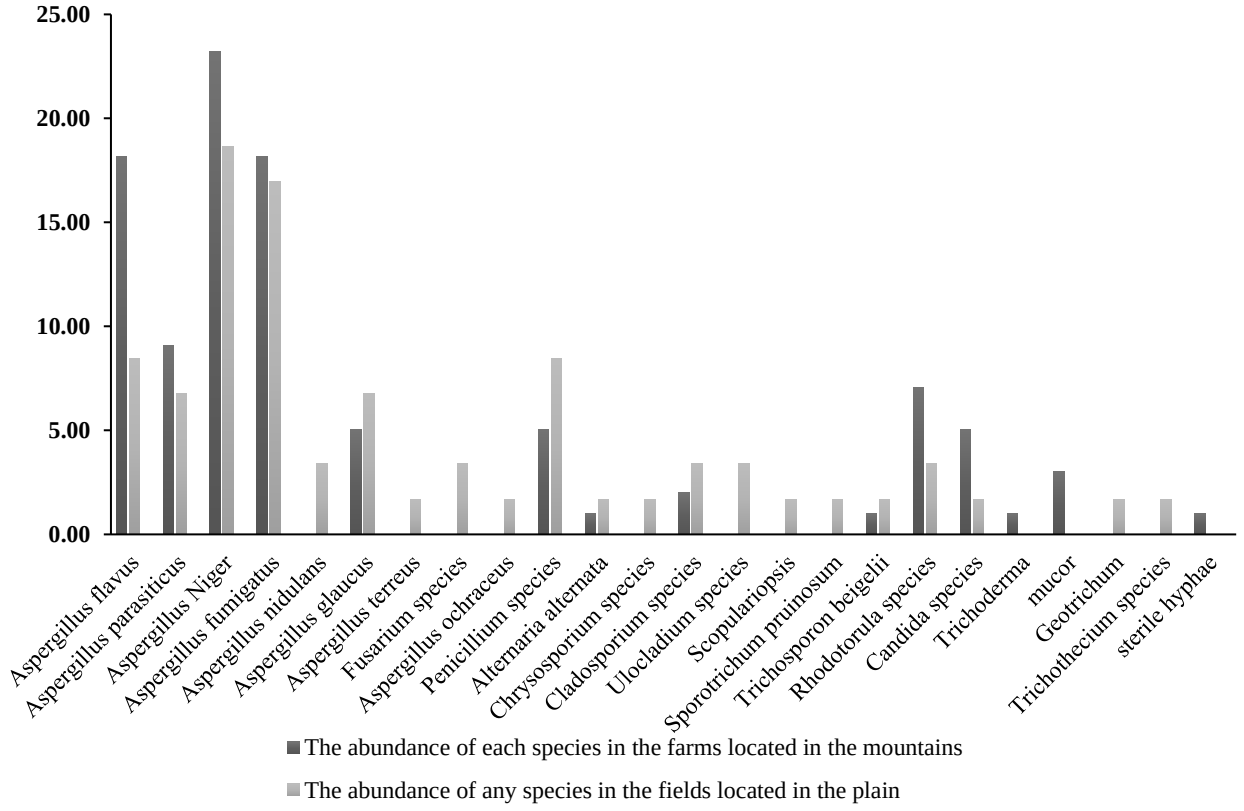
Table 4 Comparison of the contamination percentage of feed samples and the abundance of *Aspergillus* species in mountains and plains climatic regions

	Fungal species	Contamination of feed samples with fungal isolates in farms located in mountainous areas (%)	Abundance of fungal isolates in farms located in mountainous areas (%)	Contamination of feed samples with fungal isolates in farms located in the fields (%)	Abundance of fungal isolates in farms located in the fields (%)
1	*Aspergillus flavus*	64.28	18.18	35.71	8.47
2	*A. parasiticus*	32.14	9.09	28.57	6.78
3	*A. niger*	82.14	23.23	78.57	18.64
4	*A. fumigatus*	64.28	18.18	71.43	16.95
5	*A. nidulans*	0	0	14.28	3.39
6	*A. glaucus*	17.86	5.05	28.57	6.78
7	*A. terreus*	0	0	7.14	1.69
8	*A. ochraceus*	*0*	0	7.14	1.69

جدول ۵ مقایسه درصد آلودگی نمونه‌های خوراک و فراوانی هر گونه قارچی در مناطق آب و هوایی کوهستانی و دشت

Table 5 Comparison of the contamination percentage of feed samples and the abundance of each fungal species in mountains and plains climatic regions

	Fungal species	Contamination of feed samples with fungal isolates in farms located in mountainous areas (%)	Abundance of fungal isolates in farms located in mountainous areas (%)	Contamination of feed samples with fungal isolates in farms located in the fields (%)	Abundance of fungal isolates in farms located in the fields (%)
8	*Aspergillus* species	89.28	73.73	92.85	64.39
9	*Fusarium* species	0	0	14.28	3.39
10	*Penicillium species*	17.86	5.05	35.71	8.47
11	*Alternaria alternata*	3.57	1.01	7.14	1.69
12	*Chrysosporium* species	0	0	7.14	1.69
13	*Cladosporium* species	7.14	2.02	14.28	3.39
14	*Ulocladium* species	0	0	14.28	3.39
15	*Scopulariopsis*	0	0	7.14	1.69
16	*Sporotrichum pruinosum*	0	0	7.14	1.69
17	*Trichosporon beigelii*	3.57	1.01	7.14	1.69
18	*Rhodotorula* species	25	7.07	14.28	3.39
19	*Candida* species	17.86	5.05	7.14	1.69
20	*Trichoderma*	3.57	1.01	0	0
21	*Mucor spp*	10.71	3.03	0	0
22	*Geotrichum*	0	0	7.14	1.69
23	*Trichothecium* species	0	0	7.14	1.69
24	Sterile hyphae	3.57	1.01	0	0



شکل ۳ درصد فراوانی هر گونه در مزارع واقع در کوهستان و دشت

Figure 3 Percentage of the abundance of each fungal isolate in the fields located in the mountains and plains

بحث

مواد اولیه به خصوص مواد اولیه با منشاء گیاهی مورد استفاده در تولید خوراک ماهی قزل آلا منبع اصلی آلودگی خوراک به قارچ و سموم قارچی هستند (Magnoli et al. 2019). آلودگی خوراک به سموم قارچی، گونه‌های قارچی تولید کننده این سموم و گونه‌های بیماری‌زای قارچی می‌تواند در مراحل مختلف چرخه تأمین خوراک رخ دهد، اما آلودگی مواد اولیه خوراک که معمولاً ناشی از کیفیت پایین مواد اولیه آن است و همچنین آلودگی خوراک در فرایند تولید از اصلی‌ترین نقاط آلودگی خوراک در چرخه تأمین خوراک است.

مطالعه حاضر آلودگی گونه‌های قارچی در خوراک نمونه برداری شده از انبار مزارع پرورش ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان واقع در مناطق کوهستانی و دشت را بررسی کرده است. این مطالعه در ۶ استان کشور که سهم بالایی از تولید ماهی قزل آلا در ایران را به خود اختصاص داده است، انجام شد. شمارش تعداد کلی پرگنه‌های قارچی در تمامی نمونه‌های مورد بررسی کمتر از تعداد مجاز 10^4 CFU/g تعیین شده توسط استاندارد ۳۷۷۴ سازمان ملی استاندارد ایران بود (Greco et al. 2015; INSO, 2021). کمترین میزان آلودگی در نمونه‌ها ۱۰ CFU/g و بیشترین تعداد ۳۵۰۰ CFU/g بود که نتایج تأیید کننده قابلیت مصرف تمامی نمونه‌های خوراک است. جنس آسپرژیلوس از ۹۰/۴۷٪ نمونه‌های خوراک جدا شد و این جنس ۷۰/۲۵٪ از جمعیت ایزوله‌های قارچی را به خود اختصاص داد که تأیید کننده غالب بودن جنس آسپرژیلوس در منطقه جغرافیایی ایران است. آلودگی نمونه‌های خوراک به گونه‌های مولد آفلاتوکسین ۷۸/۵۷٪ بود و میزان آلودگی

در نمونه‌های خوراک مزرعه‌های پرورشی واقع در کوهستان نسبت به مزرعه‌های پرورشی واقع در دشت به مراتب بالاتر بود. گونه آسپرژیلوس نایجر با ۸۰/۹۵٪ آلودگی در نمونه‌های خوراک و فراوانی ۲۱/۵۲٪ بیشترین آلودگی و فراوانی را بین گونه‌های قارچی شناسایی شده داشت و با توجه به توانایی این گونه در تولید سموم قارچی اکراتوکسین A به عنوان یک عامل خطر بالقوه در خوراک است.

آلودگی خوراک به قارچها به عنوان یک نشان‌گر وضعیت بهداشتی و کیفی خوراک عمل می‌کند. آلودگی بالای خوراک به قارچها نشان‌دهنده کیفیت پایین مواد اولیه و یا فرایند تولید و نگهداری خوراک در شرایط نامناسب است. رشد قارچها در خوراک و مواد اولیه آن تحت شرایط نامناسب محیطی منجر به تخریب مواد مغذی و همچنین تولید سموم قارچی می‌شود (Bobadilla-Carrillo et al. 2020, Pietsch et al. 2020). تحقیقات متعدد تأثیر انبارداری و شرایط انبارداری خوراک را در دوره‌های زمانی متفاوت مورد بررسی قرار داده‌اند و این اثرات را تأیید کرده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط Pietsch و همکاران در سال ۲۰۲۰ درباره تأثیر شرایط انبارداری روی قارچها و سموم تولیدی آنها در دوره انبارداری انجام شد، زمان دوره انبارداری خوراک ۴ هفته در نظر گرفته شد که به شرایط واقعی در مزارع نزدیک است. نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط انبارداری گرم و رطوبت نسبی بیش از ۶۰٪ بر اثر فعالیت قارچها درصد کربوهیدرات‌های خوراک کاهش پیدا کرده و همچنین سطوح سم قارچی اکراتوکسین A به شکل معنی‌دار افزایش یافت (Pietsch et al. 2020). در مطالعه مشابه که توسط Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، آلودگی نمونه‌های خوراک به جنس آسپرژیلوس ۶۳/۵٪ بود. در مطالعه‌های مشابهی که توسط Alinezhad و همکاران در سال ۲۰۱۱، Mirzaeepoor و همکاران در سال ۲۰۱۸، Alinezhad و همکاران در سال ۲۰۱۳، Victoria و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد، فراوانی جنس آسپرژیلوس به ترتیب ۵۷٪، ۴۶/۳٪، ۵۴/۸۸٪ و ۵۰٪ ثبت شد. در این مطالعه آلودگی به جنس آسپرژیلوس نسبت به دو مطالعه دیگر از هر دو نظر درصد آلودگی خوراک و فراوانی بسیار بالاتر بود (Fallah et al. 2014; Alinezhad et al. 2011; Mirzaeepoor et al. 2018; Alinezhad et al. 2013; Namulawa et al. 2020).

در خصوص گونه‌های اصلی مولد آفلاتوکسین (آسپرژیلوس فلاوس و آ. پارازیتیکوس) درصد آلودگی خوراک ۸۵/۷۱٪ و فراوانی این دو گونه ۲۲/۷۹٪ بود. در مطالعه مشابه توسط Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۴، فراوانی گونه‌های مولد آفلاتوکسین (آسپرژیلوس فلاوس، آ. پارازیتیکوس، آ. نومیوس و آ. تاماری) ۶۵/۸٪ بود. در تحقیقی که توسط Alinezhad و همکاران در سال های ۲۰۱۱، ۲۰۱۳ و ۲۰۱۸ و Mirzaeepoor و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد، آسپرژیلوس فلاوس به ترتیب ۶۰/۶۶٪، ۵۰٪، ۳۳/۴۸ ٪ و ۴۸/۲٪ ایزوله‌های جنس آسپرژیلوس را تشکیل داد که با داده‌های این تحقیق هماهنگ است. در این مطالعه آلودگی به گونه‌های آفلاتوکسین‌زای آسپرژیلوس در مزرعه‌های پرورشی واقع در مناطق کوهستانی بالاتر بود و با توجه به تأمین عمده خوراک مزارع از دو کارخانه تولید خوراک شرایط محیطی به خصوص رطوبت نسبی می‌تواند در این نتایج تأثیرگذار باشد (Alinezhad et al. 2011; Alinezhad et al. 2013; Fallah et al. 2014; Alinezhad et al. 2018; Mirzaeepoor et al. 2018).

آسپرژیلوس نایجر یکی از گونه‌های اصلی تولید کننده سم قارچی اکراتوکسین است. آلودگی خوراک و فراوانی این گونه ۸۰٪/۹۵ و ۲۱/۵۲٪ بود که بیشترین آلودگی و فراوانی را در بین ایزوله‌های قارچی شناسایی در این تحقیق داشت. در مطالعه‌های مشابه که توسط Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۴، Alinezhad و همکاران در سال ۲۰۱۱، Alinezhad و همکاران در سال ۲۰۱۸، Mirzaeepoor و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد، فراوانی این گونه به ترتیب ۱۳/۹٪، ۱۹/۶۷٪، ۲۴/۱۴٪ و ۳۴٪ بود. همچنین آلودگی به این قارچ در مزارع واقع در مناطق کوهستانی بالاتر از مزارع واقع در دشت بود. نتایج این تحقیقات با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد و بیان کننده خطر بالقوه آلودگی خوراک به سم قارچی اکراتوکسین است (Alinezhad et al. 2011; Fallah et al. 2014; Mirzaeepoor et al. 2018; Alinezhad et al. 2018). آلودگی

نمونه‌های خوراک به گونه‌های قارچی مولد آفلاتوکسین و اکراتوکسین نشان‌دهنده احتمال آلودگی خوراک به این سموم است و همچنین، در صورتی که شرایط انبارداری خوراک مناسب نباشد، مانند دما و رطوبت نسبی بالا امکان تولید این سموم توسط این گونه‌های قارچی وجود دارد (Pietsch et al. 2020).

در خصوص گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس که یک گونه بیماری‌زای فرصت طلب محسوب می‌شود، آلودگی نمونه‌های خوراک و فراوانی آن به ترتیب ۶۶/۶۶٪ و ۱۷/۷۲٪ بود. همچنین، این گونه ۲۵/۲۲٪ فراوانی گونه‌های جنس آسپرژیلوس را تشکیل داد. در مطالعه‌های مشابه که توسط Alinezhad و همکاران (۲۰۱۱) و Mirzaeepoor و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد، فراوانی این گونه در جنس آسپرژیلوس به ترتیب ۳/۲۸٪ و ۵/۳٪ بود که در مقایسه با این مطالعه مقادیر آلورگی به شکل معنی‌دار کمتر بود و این نتایج نشان‌دهنده آلودگی بالاتر نمونه‌های خوراک مورد مطالعه در این تحقیق است.

آلودگی خوراک و فراونی گونه‌های جنس پنی‌سیلیوم به ترتیب ۲۳/۸٪ و ۶/۳۲٪ بود. در مطالعه‌های مشابه روی خوراک ماهی قزل‌آلا، فراوانی این جنس در هر دو مطالعه ۱۲٪/۸۴ بود (Alinezhad et al. 2011; Alinezhad et al. 2013). در مطالعه Mirzaeepoor و همکاران (۲۰۱۸) و Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز فراوانی این گونه ۹/۹٪ و ۴۱/۵٪ بود که نتایج این تحقیقات نشان‌دهنده آلودگی پایین‌تر خوراک به این گونه است (Fallah et al. 2014; Mirzaeepoor et al. 2018).

در مطالعه حاضر، آلودگی خوراک به گونه‌های جنس فوزاریوم و فراوانی این گونه‌ها ۴/۷۶٪ و ۱/۲۶٪ تشخیص داده شد. در مطالعات مشابه که توسط Fallah و همکاران (۲۰۱۴)، Mirzaeepoor و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد، فراوانی این جنس ۲۶/۶٪ و ۱۳/۳٪ گزارش شد که آلودگی به مراتب بالاتری را نسبت به نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد، اما در تحقیقات دیگر هیچ سویه‌ای از این جنس از خوراک جدا نشد که با نتایج این تحقیق هماهنگ است (Alinezhad et al. 2011; Fallah et al. 2014; Mirzaeepoor et al. 2018). نکته قابل توجه این است که تمام آلودگی مربوط به جنس فوزاریوم از مزارع واقع در دشت جدا شد و هیچ مورد آلوده‌ای از نمونه‌های خوراک مزارع واقع در مناطق کوهستانی یافت نشد. اقلیم ایران به واسطه دو رشته کوه البرز و زاگرس به دو اقلیم کوهستانی و دشت تقسیم شده است. مناطق کوهستانی بخش قابل ملاحظه‌ای از بارش سالانه باران را به خود اختصاص داده است (Kousari et al. 2011). در این مطالعه آلودگی نمونه‌های قارچی و جمعیت ایزوله‌های مولد آفلاتوکسین و اکراتوکسین در مزارع واقع در کوهستان بیشتر از مناطق دشت بود که می‌تواند ناشی از شرایط انبارداری و به‌خصوص رطوبت نسبی محیط باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که در تمامی نمونه‌های خوراک تعداد کلی پرگنه‌های قارچی کمتر از سطح استاندارد بود و در نمونه‌های مورد بررسی بیشترین فراوانی و درصد آلودگی مربوط به جنس آسپرژیلوس و به خصوص گونه‌هایی با توانایی بالقوه تولید سموم قارچی آفلاتوکسین و اکراتوکسین بود.

References

Adeli, A., Baghaei, F. 2013. Production and supply of rainbow trout in Iran and the world. World Journal of Fish and Marine Sciences 5: 335-341. doi: 10.5829/idosi.wjfms.2013.05.03.72133.

Alinezhad, S., Irajian, G., Ghaemmaghami, S.S. 2018. Evaluation of fungal and aflatoxin contamination in factory-made feed in rainbow trout farms in Damghan City. Iranian Journal of Medical Microbiology 12: 33-42. (In Persian).

Alinezhad, S., Razzaghi-Abyaneh, M., Ghaemmagami, S.S., Egbal Khajehrahimi, A., Rahanandeh, M., Saberi, S.R. 2013. Fungal contamination

in handmade and factory-made feed of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Research & Biological Products 26: 35-46. (In Persian). doi: 10.22092/vj.2013.101022.

Alinezhad, S., Tolouee, M., Kamalzadeh, A., Motalebi, A.A., Nazeri, M., Yasemi, M., Shams, G.M., Tolouei, R., Razzaghi, A.M. 2011. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus* section Flavi. Iranian Journal of Fisheries Sciences 10: 363-374. doi: 10.22092/ijfs.2018.114144.

Bashorun, A., Hassan, Z.U., Al-Yafei, M.A.A., Jaoua, S. 2023. Fungal contamination and mycotoxins in aquafeed and tissues of aquaculture fishes and their biological control. Aquaculture 576: 739892. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739892.

Bobadilla-Carrillo, G.I., Magallón-Servín, P., López-Vela, M., Palomino-Hermosillo, Y.A., Ramírez-Ramírez, J.C., Gutiérrez-Leyva, R., Ibarra-Castro, L., Bautista-Rosales, P.U. 2020. Characterization and proliferation capacity of potentially pathogenic fungi in marine and freshwater fish commercial feeds. Archives of Microbiology 202: 2379-2390. doi: 10.1007/s00203-020-01954-4.

Fallah, A.A., Pirali-Kheirabadi, E., Rahnama, M., Saei-Dehkordi, S.S., Pirali-Kheirabadi, K. 2014. Mycoflora, aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in fish feed. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods 6: 419-424. doi: 10.3920/QAS2012.0186.

Fisheries, F.A.O. 2022. The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Rome.

Greco, M., Pardo, A., Pose, G. 2015. Mycotoxigenic fungi and natural co-occurrence of mycotoxins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. Toxins 7: 4595-4609. doi: 10.3390/toxins7114595.

Iranian National Standardization Organization (INSO). 2003. Method for identifying fungal contamination of molds and yeasts in food. 997: 1-8. (In Persian).

Iranian National Standardization Organization (INSO). 2013. microbiology of food and animal feed, enumeration of Coagular *Staphylococcus aureus* and other species. first edition, number 6806. (In Persian).

Iranian National Standardization Organization (INSO). 2019. Animal feeding stuffs Sampling, number 7570. (In Persian).

Iranian National Standardization Organization (INSO). 2021. Animal feed, poultry and aquatic animal feed concentrate characteristics. Standard number 3774. (In Persian).

Kalbassi, M.R., Abdollahzadeh, E., Salari-Joo, H. 2013. A review on aquaculture development in Iran. Ecopersia 1: 159-178.

Koletsi, P., Schrama, J.W., Graat, E.A., Wiegertjes, G.F., Lyons, P., Pietsch, C. 2021. The Occurrence of Mycotoxins in Raw Materials and Fish Feeds in Europe and the Potential Effects of deoxynivalenol (DON) on the health and growth of farmed fish species: A Review. Toxins 13: 403. doi: 10.3390/toxins13060403.

Kousari, M.R., Ekhtesasi, M.R., Tazeh, M., Saremi Naeini, M.A., Asadi Zarch, M.A. 2011. An investigation of the Iranian climatic changes by considering the precipitation, temperature, and relative humidity parameters. Theoretical and Applied Climatology 103: 321-335. doi: 10.1007/s00704-010-0304-9.

Magnoli, A.P., Poloni, V.L., Cavaglieri, L. 2019. Impact of mycotoxin contamination in the animal feed

industry. Current Opinion in Food Science 29: 99 108. doi: 10.1016/j.cofs.2019.08.009

Marijani, E., Kigadye, E., Okoth, S. 2019. Occurrence of fungi and mycotoxins in fish feeds and their impact on fish health. International Journal of Microbiology. doi: 10.1155/2019/6743065.

Matejova, I., Svobodova, Z., Vakula, J., Mares, J., Modra, H. 2017. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. Journal of the World Aquaculture Society 48: 186-200. doi: 10.1111/jwas.12371.

Mirzaeepoor, A., Shoaibi Omrani, B., Alinezhad, S. 2018. Determination of aflatoxin pollution and mycobiota in rainbow trout feed in Alborz province husbandry facilities. Journal of Animal Environment 10: 197-204. (In Persian).

Namulawa, V.T., Mutiga, S., Musimbi, F., Akello, S., Ngángá, F., Kago, L., Kyallo, M., Harvey, J., Ghimire, S. 2020. Assessment of fungal contamination in fish feed from the Lake Victoria Basin, Uganda. Toxins 12: 233. doi: 10.3390/toxins12040233.

Oliveira, M., Vasconcelos, V. 2020. Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. Toxins 12: 160. doi: 10.3390/toxins12030160.

Pietsch, C., Müller, G., Mourabit, S., Carnal, S., Bandara, K. 2020. Occurrence of fungi and fungal toxins in fish feed during storage. Toxins 12: 171. doi: 10.3390/toxins12030171.