Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

ارزیابی قدرت عفونت زایی گونه های ریزوپوس(Rhizopus) با استفاده از جنین تخم مرغ

سمیه دولت آبادی*[۱]، زهرا پورفریدون قصرالدشتی[۲]، محمدجواد نجف زاده[۳]، سیدابوالفضل حسینی[۴]

۱) دانشکده مهندسی، دانشگاه فناوری های نوین سبزوار، سبزوار، ایران

۲) گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۳) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲**

چکیده

مقدمه: اطلاعات اندکی در مورد بیماری زایی و قدرت عفونت زایی قارچ های گونه ریزوپوس که در صنعت غذایی مورد استفاده می باشند، وجود دارد. لذا قدرت عفونت زایی سویه های R. microsporus و R. Arrhizus که از منابع مختلف بالینی و محیطی جمع آوری شده اند، در مدل جنین تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: تعداد ۲۶ سویه، ۱۳ مورد از هر یک از دو گونه R. microsporus و R. arrhizus در جنین تخم مرغ با غلظت نهایی $۱۰^{۶}$ اسپور/میلی لیتر برای هر سویه آماده شدند. جنین های تخم مرغ در روز دهم جنینی و در ناحیه کریوآلانتوییک به میزان ۰/۱ میلی لیتر اسپور تلقیح شدند. نمونه های تلقیح شده در دمای ۳۷/۶ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۰ درصد به مدت ۷ روز انکوبه شدند.

یافته های پژوهش: میزان کشندگی قارچ R. microsporus در جنین تخم مرغ بالاتر از گونه های R. arrhizus بوده است. میزان مرگ و میر ارتباطی با منبع جداسازی نمونه ها نداشتند و در میان سویه های مربوط به یک گونه متغیر بودند. تولید سم باکتری همزیست در گونه R. microsporus، بر میزان مرگ و میر این گونه ها تاثیری نداشت.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به بروز مرگ و میر در نمونه های جداسازی شده از منبع غذایی، چنین استنباط می گردد که این گروه از قارچ ها ماهیت فرصت طلب داشته، در شرایط مساعد قادر به ایجاد بیماری بوده و می توانند تهدیدی برای مصرف کنندگان این مواد غذایی باشند.

واژه های کلیدی: موکورال ها، ریزوپوس، غذاهای تخمیری، مرگ و میر، جنین تخم مرغ

* نویسنده مسئول: دانشکده مهندسی، دانشگاه فناوری های نوین سبزوار، سبزوار، ایران

Email: somayeh99@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

مقدمه

قارچ های موکورال جزو گروه پایه ای قارچ ها در شجره حیات بوده و از نظر تکاملی بنیادی تر از قارچ های آسکومیست و بازیدیومیست می باشند. این قارچ ها، ساپروفیت و دارای اکولوژی متنوع بوده و در محیط های مختلفی مانند خاک، مواد در حال فساد، میوه و سبزیجات دیده می شوند. این قارچ ها به عنوان تجزیه کننده مواد آلی در محیط پیرامون ما عمل می کنند و قادر به ایجاد فساد و تغییر طعم و مزه در محصولات غذایی و کشاورزی می باشند که منجر به خسارات وارده بالایی به بخش کشاورزی می گردند(۱).

این گروه از قارچ ها با دارا بودن سرعت رشد بالا، ساختار رشته ای، توانایی رشد در حرارت بالا و تولید طیف وسیعی از آنـــزیم ها و متابولیت های ثانویه، گزینه های مناسبی جهت تولید فرآورده های زیستی در صنعت می باشند. به کار بردن گونه های قارچی در تولید فرآورده های زیستی با صرفه جویی مالی بسیار همراه است(۲).

این گروه از قارچ ها قادر به تولید متابولیت های ثانویه ای مانند اسیدهای آلی(اسید مالیک، اسید لاکتیک)، کاروتن، آنـــزیم های مخـــتلف، الکل، سوخت های زیستی، مواد دارویی و صـــنعتی مختلف می باشند که هر کدام به نوبه خود می توانند کاربردهای صنعتی بالایی داشته باشند و بخش عظیمی از تقاضای روزافزون این محصـــولات در بـــازارهای تجاری و صنعت های وابسته را پوشش دهند(۳).

این گروه از قارچ ها از دیر باز در تولید غذاهای تخمیر شده در کشورهای آسیای دور و آفریقا به کـــار می رفته اند(۴). گونه های موکورال برای تخمیر غذاهایی بر پایه سویا، مانند tempe, ragi, sufu که در آسیا از قرن ها پیش استفاده می شده است، کاربرد دارند. موکورال ها قادر به تولید آنزیم های متنوعی از جمله لیپاز، آمیلاز، تیروزیناز، سلولاز، پکتیناز، زیـــــلاناز و ... می باشند(۵) که در فرآوری این محصولات غذایی تخمیر شده لازم می باشند. از دیدگاه کـــــلی، قـــارچ R. arrhizus به عنوان قارچ امن شناخته می شود و قادر به استفاده از منابع کربنی مختلفی مانند گالاکتوز، لاکتوز، ترهالوز، ریبوز و زیلوز می باشد(۳،۴). سویه های بسیاری از گونه ریزوپوس از مواد غذایی تخمیری ذکر شده جداسازی شده اند که در کلکسیون قارچـــی مرکز CBS-KNAW موجود می باشند(۶). در مطالعه انجام شده توسط گروه کره ای، نمونه های موکورال فراوانی از محصول غذایی meju جداسازی شده اند(۴).

بعضی از گونه های قارچی در این گروه به صورت انگلی و مهاجم زندگی می کنند. گونه های بیماری زا نیز در میان این گروه قـــــارچی به چـــشم می خورند و گزارش هایی از بروز بیماری ها و عفونت های قارچی در بیماران با نقص سیستم ایمنی به موجب قارچ های موکورال دیده می شود(۹-۷). در دهـــه های اخیر گزارش هـــای مـــوردی از بروز عـــفونت های موکورمایکوزیس رو به رشد بوده است. بیشترین موارد بیماری زایی از قارچ های گونه ریزوپوس و Lichtheimia و موکور گزارش شده است(۹). بروز عفونت موکورمایکوزیس نادر بوده ولیکن در سال های اخیر با افزایش عواملی مانند داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، پیوند اعضاء، دیابت، و بیمارانی با مشکلات خونی میزان بروز این عفونت رو به رشد بوده است(۸،۱۰،۱۱).

R.arrhizus به تنهایی عامل ۷۰ درصد از موارد موکورمایکوزیس و ۹۰ درصد از موارد عفونت رینوسربرال می باشد. گونه های Lichtheimia و موکور در مقام دوم قرار می گـــیرند. دیگر گـــــونه ریزوپـــــوس R. microsporus مقام سوم ایجاد عفونت در بیماران مستعد را دارا می باشد. وقوع این عفونت در افراد سالم نادر می باشد(۷،۸).

تهدید دیگر این گروه از قارچ ها، رابطه همزیستی با باکتری Bulkholderia می باشد. این باکتری از خانواده Burkholderiaceae قادر به تولـــید سم Rhizoxin می باشد که قادر به بیمار نمودن گیاه برنج می باشد(۱). Rhizoxin عـــامل antimicrotubule اســـت که با قرار گرفتن در cell line های سلول های کوچک سرطان ریه، می تواند در درمان بیماران سرطان موثر باشد(۳). باکتری آزاد شده از پیوند همزیستی توانایی رشد اندکی در محیط های کشت را داراست. بزور و تولید این سم در سویه CBS 111563 جداسازی شده از ماده غذایی tempe و sufu ردیابی شـــده است(۳،۱۲) که

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

می تواند هشداری برای استفاده از این قارچ در صنعت مواد غذایی باشد.

در گذشته تصور بر این بود که سویه های غذایی و محیطی مجزا و متفاوت از سویه های بالینی می باشند. ولیکن مطالعات مولکولی جدید در مورد گونه R. microsporus نشانگر تک نژادی بودن و تغییرپذیری کم این گونه در سطح مولکولی می باشد. در حال حاضر و بر اساس مطالعات انجام شده، در مورد گونه R. arrhizus تنها دو واریته delemar, arrhizus پذیرفته می باشند(۵،۱۳).

با توجه به مطالب ذکر شده، سوال مورد بررسی در این مطالعه قرابت مولکولی بین سویه های غذایی و سویه های بیماری زا از یک سو و از دیگر سو ماهیت دوگانه گونه های ریزوپوس در محیط پیرامون ما، کاربرد در تهیه مواد غذایی و نیز بیماری زایی شدید گونه های ریزوپوس بوده است(۶). در نتیجه توانایی بیماری زایی این گونه ها در مدل آزمایشگاهی جنین تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفته است. لذا در قالب این مطالعه، بیماری زایی دو گونه رایج از قارچ Rhizopus جهت ارزیابی شدت بیماری زایی و ارتباط آن با منبع جداسازی نمونه ها در مدل جنین تخم مرغ بررسی می گردد. دانش به دست آمده از این مطالعه بر میزان شناخت ما نسبت به عملکرد این گونه ها در بالین خواهد افزود.

مواد و روش ها

آزمایش ها در روز ۱۸ و قبل از تکمیل شدن تکامل جنین؛ با سرد کردن تخم های حاوی جنین به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه بر روی یخ خاتمه می یابند. کد اخلاق این مطالعه IR.MUMS.fm.REC.1396.457 می باشد.

آماده سازی نمونه های قارچی: تعداد کل ۲۶ نمونه قارچی مورد مطالعه قرار گرفتند. این سویه ها از مرکز CBS-KNAW (Utrecht, The Netherlands) تهیه شدند. از این میان، تعداد ۱۳ نمونه از گونه Rhizopus microsporus بودند که شامل دو نمونه محیطی، ۷ نمونه غذایی، و ۴ نمونه بالینی می باشد. تعداد ۱۳نمونه(جمعاً ۲۶ نمونه) از قارچ R. arrhizus نیز مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل ۵ نمونه محیطی، ۵ نمونه غذایی و ۳ نمونه بالینی می باشد. نمونه های زیر مجموعه قارچ R. arrhizus شامل دو واریته این گونه می باشد؛ واریته delemar (n=5), arrhizus (n=8). نمونه های استفاده شده در این مطالعه از مناطق جغرافیایی متنوعی به دست آمده اند(جدول شماره ۱).

سویه های لیوفیلیزه شده بر روی محیط کشت مالت پپتون به مدت دو روز قرار گرفتند و سپس به محیط کشت مالت اکسترکت آگار منتقل شده و به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند(جدول شماره ۱).

پس از اسپورزایی کافی، اسپورها در بافر استریل PBS جمع آوری شده و غلظت 10^7 اسپور در یک میلی لیتر برای هر سویه قارچی و به ازای هر جنین تخم مرغ تهیه شد. از این میزان اسپور، مقدار ۰/۱ میلی لیتر با کمک سرنگ استریل به هر جنین تزریق می گردد تا غلظت نهایی 10^6 به دست آید. بافر PBS به عنوان کنترل منفی و سویه R. microsporus CBS 102277 با منشاء بالینی به عنوان سویه مثبت مورد استفاده قرار گرفتند(۱۴).

از میان سویه های گونه microsporus، سه سویه حاوی باکتری همزیست و سه سویه فاقد این باکتری نیز در مجموع نمونه ها در نظر گرفته شدند(جدول شماره ۱). حضور یا عدم حضور باکتری همزیست در این سویه ها در مطالعات قبلی با استفاده از روش کشت در محیط مناسب جهت رشد باکتری ها به اثبات رسیده بوده است(۳).

آماده سازی جنین تخم مرغ جهت تلقیح: در این مطالعه تخم های یک روزه جنین دار جهت استفاده تهیه شدند. این تخم ها در روز دهم با اسپورهای تهیه شده در مرحله قبلی، تلقیح شدند. نگهداری جنین های تلقیح شده در دمای ۳۷/۶ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۰ درصد به مدت ۷ روز صورت گرفت. از روز سوم به بعد تخم ها؛ چهار بار در روز جا به جا شده تا شرایط طبیعی رشد را داشته باشند. حیات جنین ها با استفاده از نور شمع قابل رویت و بررسی بود. به ازای هر سویه قارچی، بیست تخم مرغ جنین دار استفاده گردید(۱۴).

جهت تلقیح تخم مرغ ها در قسمت کریو آلانتوییک، سطح تخم ها با الکل ضد عفونی می شدند. سپس دو حفره در سطح تخم ها در قسمت صاف و در قسمت پهلوی تخم ها، با سوزن نوک تیز ایجاد می گردید و به

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

کمک یک سرنگ استریل جنین ها با غلظت نهایی 10^6 تلقیح گردیدند. سپس حفره ایجاد شده به وسیله پارافین پوشیده می شد. این مراحل در کنار نور شمع اجرا شده تا لایه های درونی تخم مرغ قابل رویت باشد و از ایجاد آسیب های جانبی به جنین جلوگیری شود(۱۵).

آنالیز آماری نمونه ها: تمام اطلاعات آماری به وسیله نرم افزار Graphpad Prism نسخه ۷ انجام شد. داده های مربوط به بقاء نمونه ها با استفاده از نمودارهای Kaplen-Meyer رسم و با استفاده از تست log rank آنالیز شدند. میزان P کمتر از۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. میانگین زمانی زنده ماندن نمونه ها، به معنای زمانی که نیمی از جنین ها مرده اند، در ۳ سطح به شرح زیردسته بندی شدند:

۱-زمان کم: زمان زنده ماندن کم و نامشخص

۲-زمان متوسط: زمان زنده ماندن کمتر از ۳ روز

۳-زمان زیاد: زمان زنده ماندن بیشتر از ۳ روز

تست حرارت: تست حرارت برای تمامی سویه های قارچی که مورد مطالعه قرار گرفتند، انجام شد. سویه ها در دمای ۱۵ درجه تا ۳۶ درجه سانتی گراد با فواصل ۳ درجه به مدت ۳ روز انکوبه شدند. هم چنین سویه ها در دمای ۵۵، ۵۲، ۵۰، ۴۵، و ۴۰ درجه سانتی گراد نیز انکوبه شدند. سویه ها در پلیت های ۸ سانتی متری مالت اکسترکت آگار و در تاریکی قرار گرفتند(۵).

یافته های پژوهش

دمای رشد بهینه برای رشد سویه های R. microsporus دمای ۳۶ درجه سانتی گراد و دمای رشد بیشینه برای این سویه ها در محدوده ۵۲-۵۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. اکثر نمونه ها در بازه دمایی ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد قادر به رشد مطلوب بوده اند. دمای رشد بهینه برای رشد سویه های R. arrhizus دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دمای رشد بیشینه برای این سویه ها ۴۵ درجه سانتی گراد به دست آمد.

در روز دهم از رشد و نمو، جنین ها تلقیح شدند چرا که بر اساس مطالعات قبلی، مناسب ترین زمان از نظر تکامل جنین می باشد. جنین تخم مرغ هایی که با سویه R. microsporus آلوده شده بودند روندی از مرگ و میر بین ۹۵-۶۰ درصد(GM 78.53% ±10.9) را در آخرین روز انکوبه گذاری نشان دادند. زمان بقاء نمونه ها بین ۱ تا ۵ روز متغیر بودند. مرگ و میر در جنین تخم مرغ هایی که با سویه های R. arrhizus آلوده شده بودند روندی از مرگ و میر بین ۱۰۰-۱۰ درصد(GM 51.16%±25.67) در آخرین روز آزمایش و با بازه زمانی زنده ماندن بین ۲-۰ روز بوده است. میزان مرگ و میر بین دو واریته R. arrhizus تفاوت معنی داری نشان ندادند. این ارقام بر حسب دو واریته به قرار زیر می باشد:

var. delemar (GM 46%±27.24) ۱۰۰-۷۵ درصد

var. arrhizus (GM 54.38 ± 25.97) ۲۵- ۱۰۰ درصد

R. arrhizus در روز دوم پس از تلقیح، ۳۲/۳ درصد مرگ و میر ایجاد نموده است. این میزان در روز هفتم (آخرین روز آزمایش)، ۱۸/۸۶ درصد افزایش داشته است. R. microsporus در روز دوم پس از تلقیح، ۵۹/۷۷ درصد مرگ و میر ایجاد نموده است. این میزان در روز هفتم(آخرین روز آزمایش)، ۱۸/۷۶ درصد افزایش داشته است(تصاویر شماره ۱ و ۲).

در مقایسه با نتایج به دست آمده مرگ و میر جنین تخم مرغ ناشی از آلودگی با سویه R. microsporus بیشتر از سویه های R. atrrhizus می باشد(جدول شماره ۲).

میزان مرگ و میر سویه های دارای باکتری همزیست که قادر به تولید سم می باشند، برابر با ۷۴-۶۰ درصد(GM 67%±7) داشتند. این میزان در سویه های فاقد باکتری همزیست برابر با ۹۰-۷۵ درصد(GM 86.25%±7.5) در روز آخر آزمایش بوده است. در مقایسه با منبع جداسازی نمونه ها بر اساس سه گروه نمونه های محیطی، غذایی، و بالینی، نتایج معناداری به دست نیامد. توان بیماری زایی در سویه ها با منبع مختلف مشهود بود. نتایج به دست آمده در میان سویه های مربوط به یک گونه متغیر بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

جدول شماره ۱. لیست نمونه های استفاده شده در این مطالعه، نام گونه، منبع و مکان جداسازی، وجود باکتری همزیست در برخی سویه ها

شماره نمونه	نام گونه	مکان	منبع	تولید سم
CBS 102277	R. microsporus		Human, rhinocerebral	
CBS 112586	R. microsporus	Indonesia	Tempe	No
CBS 112588	R. microsporus	Indonesia	Tempe	No
CBS 124669	R. microsporus	Greece	Human, soft palate	
CBS 130967	R. microsporus	Indonesia	Tempe	
CBS 130968	R. microsporus	Indonesia	Tempe	
CBS 130971	R. microsporus	Netherlands	Wood chip	
CBS 228.95	R. microsporus	Indonesia	Tempe	
CBS 264.60	R. microsporus	Norway	liver abscess in pig	
CBS 289.71	R. microsporus	Italy	Starch-containing material	
CBS 294.31	R. microsporus	France	Cow foetus	
CBS 337.62	R. microsporus	Indonesia	Tempe	
CBS 339.62	R. microsporus	Indonesia	Tempe	Yes
CBS 343.29	R. microsporus	USSR	Air	
CBS 346.49	R. microsporus		Eleusine coracana	
CBS 357.93	R. microsporus	Indonesia	Tempe	
CBS 359.92	R. microsporus	Australia	Liver, premature infant	
CBS 536.80	R. microsporus	South Africa	Sorghum malt	
CBS 537.80	R. microsporus	South Africa	Sorghum malt	No
CBS 631.82	R. microsporus	China	Bread	No
CBS 699.68	R. microsporus	Ukraine	Soil	Yes
CBS 700.68	R. microsporus	Georgia	Forest soil	Yes
CBS 136237	var. arrhizus	Netherlands	Soil	
CBS 136239	var. arrhizus	Iran	Soil	
CBS 136240	var. arrhizus	Iran	Soil	
CBS 136241	var. arrhizus	Iran	Soil	
CBS 136236	var. arrhizus	Netherlands	Soil	
CBS 118614	var. arrhizus	Turkey	Palate	
CBS 120589	var. arrhizus	France	Lung	
CBS 120591	var. arrhizus	France	Sinus	
CBS 120808	var. arrhizus	France	Sputum	
CBS 120809	var. arrhizus	France	Sputum	
CBS 131512	var. arrhizus	Iran	Oil contaminated soil	
CBS 260.28	var. arrhizus	China	Chinese yeast	
CBS 515.94	var. arrhizus	Singapore	Tempe	
CBS 539.80	var. arrhizus	South Africa	Sorghum malt	
CBS 136238	var. delemar	Netherlands	Soil	
CBS 131498	var. delemar	Netherlands	Tempe	
CBS 295.31	var. delemar	Germany	Pig	
CBS 324.35	var. delemar	Indonesia	Cocos cake	
CBS 137314	var. delemar	South Africa	Sorghum malt	

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

جدول شماره ۲. لیست نمونه های استفاده شده در این مطالعه و میزان مرگ و میر در جنین تخم مرغ طی یک دوره هفت روزه

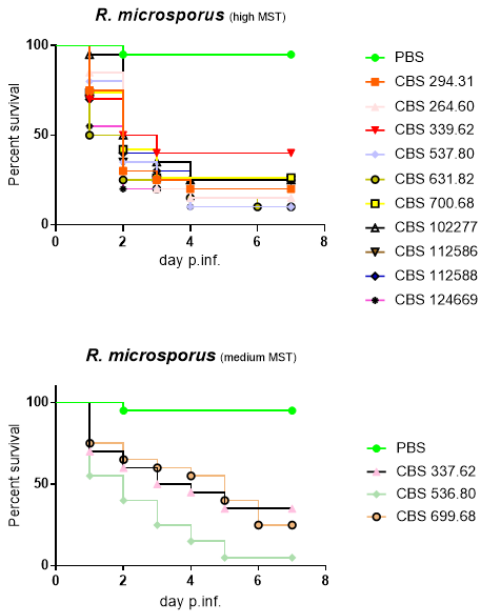
	day p. inf.	0	1	2	3	4	5	6	7
PBS control		100	95	95	95	95	95	95	95
R. microsporus	CBS 130971	100	65	45	30	30	30	30	30
R. microsporus	CBS 130968	100	70	55	40	40	35	30	30
R. microsporus	CBS 228.95	100	55	5	5	5	5	5	5
R. microsporus	CBS 289.71	100	70	55	40	30	30	30	25
R. microsporus	CBS 294.31	100	75	30	25	20	20	20	20
R. microsporus	CBS 337.62	100	70	60	50	45	35	35	35
R. microsporus	CBS 339.62	100	70	50	40	40	40	40	40
R. microsporus	CBS 343.29	100	70	35	20	10	5	0	0
R. microsporus	CBS 346.49	100	85	40	30	30	25	20	15
R. microsporus	CBS 357.93	100	50	30	25	10	10	10	10
R. microsporus	CBS 359.92	100	70	30	10	5	5	5	5
R. microsporus	CBS 536.80	100	55	40	25	15	5	5	5
R. microsporus	CBS 537.80	100	80	35	20	10	10	10	10
R. microsporus	CBS 631.82	100	50	25	20	15	15	10	10
R. microsporus	CBS 699.68	100	73	66	60	53	40	33	33
R. microsporus	CBS 700.68	100	73	42	26	26	26	26	26
R. microsporus	CBS 112586	100	70	35	25	25	25	25	25
R. microsporus	CBS 130967	100	50	50	40	40	40	30	30
R. microsporus	CBS 112588	100	70	40	30	25	25	25	25
R. microsporus	CBS 124669	100	55	20	20	10	10	10	10
R. microsporus	CBS 102277	100	95	50	35	25	25	25	25
R. microsporus	CBS 264.60	100	85	30	20	15	15	15	15
var. arrhizus	CBS 136236	100	80	60	30	30	30	30	30
var. arrhizus	CBS 136237	100	100	65	35	35	35	35	30
var. arrhizus	CBS 136239	100	80	35	25	5	5	0	0
var. arrhizus	CBS 136241	100	75	50	35	15	15	10	10
var. arrhizus	CBS 131512	100	55	40	35	30	24	15	15
var. arrhizus	CBS 515.94	100	85	65	60	45	45	45	45
var. arrhizus	CBS 539.80	100	95	85	75	60	60	60	60
var. arrhizus	CBS 136240	100	90	55	45	40	35	35	35
var. arrhizus	CBS 260.28	100	95	80	75	75	70	65	65
var. arrhizus	CBS 118614	100	65	40	35	30	20	20	20
var. arrhizus	CBS 120589	100	75	55	50	50	50	50	50
var. arrhizus	CBS 120591	100	85	75	75	75	75	75	75
var. arrhizus	CBS 120808	100	85	75	75	75	75	75	75
var. arrhizus	CBS 120809	100	85	85	80	70	70	70	70
var. delemar	CBS 131498	100	80	65	50	45	45	40	40
var. delemar	CBS 295.31	100	75	50	45	40	40	40	40
var. delemar	CBS 136238	100	100	100	95	90	90	90	90
var. delemar	CBS 324.35	100	65	35	30	25	25	25	25
var. delemar	CBS 137314	100	100	90	80	80	80	75	75

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

Fig 1: A



تصویر یک آ: نمودار مرگ و میر گونه **R. microsporus** در بازه زمانی هفت روزه. نتایج به دو دسته شدید و متوسط گروه بندی شده اند.

Fig 1: B1

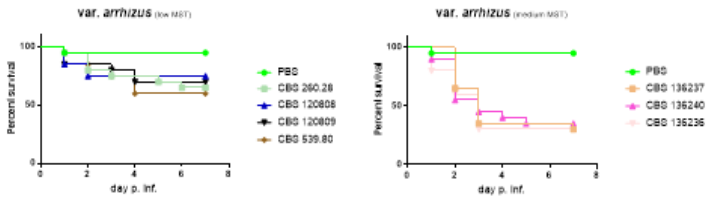
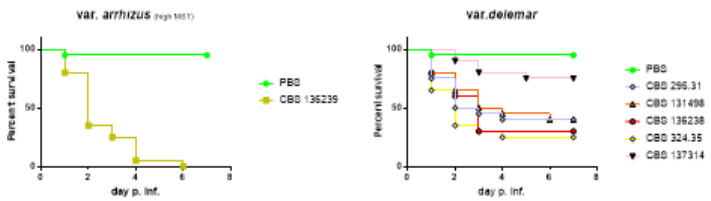


Fig 1: B2



تصویر شماره ۱ ب ۱. نمودار مرگ و میر گونه **R. arrhizau var. arrhizus** در بازه زمانی هفت روزه.
نتایج به دو دسته خفیف، شدید و متوسط گروه بندی شده اند.
تصویر شماره ۱ ب ۲. نمودار مرگ و میر گونه **R. arrhizau var. delemar** در بازه زمانی هفت روزه.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، با استفاده از مدل آزمایشگاهی جنین تخم مرغ، میزان بیماری زایی دو گونه رایج بیماری زای ریزوپوس ارزیابی گردید. گونه ریزوپوس اصلی ترین گونه بیماری زا در بین قارچ های موکورال می باشد که منجر به عفونت کشنده موکورمایکوزیس می گردد(۱۶). این گونه های قارچی از سالیان دور در تهیه غذاهای تخمیری در کشورهای شرق دور مانند اندونزی به وفور به کار می روند و فواید و مصارف غذایی گسترده ای برای آن ها بر شمرده می شود(۱،۲). اگر چه عفونت قارچی موکورمایکوزیس معمولاً در افراد با نقص سیستم ایمنی مانند بیماران مبتلا به دیابت و پیوند اعضاء رخ می دهد ولیکن با وجود استفاده رایج این گونه ها در تهیه مواد غذایی و امکان بروز موکورمایکوزیس در سیستم گوارشی، و با توجه به ماهیت فرصت طلب بودن برخی از گونه های قارچی، بایستی مکانیسم های بیماری زایی این گونه ها مدنظر قرار گیرد تا راه حل مقابله و پیشگیری از این عفونت شناسایی شوند(۱۷).

انجام آزمایشات در حیوانات آزمایشگاهی مانند پستانداران هزینه بر بوده و قوانین اخلاقی بسیاری را در بر می گیرد. با وجود این که موجودات پستانداری مانند موش به عنوان روش استاندارد در مطالعات بالینی در نظر گرفته می شوند اما استفاده از مدل پرندگان دارای مزیت هایی چون ارزان تر وسریع تر بودن و عدم نیاز به کد اخلاقی می باشد. این سیستم آزمایشگاهی، محیطی خونگرم را فراهم می نماید. در گذشته مدل آزمایشگاهی جنین پرندگان برای مطالعات در زمینه ویروس ها(۱۸)، باکتری هایی مانند سودوموناس(۱۹) و لیستریا(۲۰) و هم چنین قارچ هایی مانند کاندیدا و آسپرژیلوس مورد استفاده قرار گرفته است که نتایج قابل قبولی را در بر داشته است. بنا بر این در این مطالعه نیز مورد استفاده قرار گرفتند(۱۴،۲۱،۲۲). در بین قارچ های گروه موکورال ها، این مدل آزمایشگاهی در مورد قارچ ریزوپوس و لیختمیا(۲۳،۲۴) مورد استفاده بوده است. مکانیسم اتصال این قارچ ها به سلول های دیواره رگ های خونی به خوبی در مدل جنین تخم مرغ قابل شبیه سازی و اجرا می باشد(۲۵).

دمای مناسب برای انکوبه کردن جنین های تخم مرغ ۳۷/۶ درجه سانتی گراد است. این دما به دمای رشد گونه R. microsporus نزدیک تر می باشد در حالی که R. arrhizus در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد رشد بهینه را دارا می باشد. در نتیجه این احتمال هست که دمای رشد بر میزان مرگ و میر کمتر در R. arrhizus تاثیرگذار بوده است. در مورد R. microsporus دمای مناسب و مطلوب رشد ۴۵ درجه سانتی گراد بوده است.

با وجود مرگ و میر بالاتری که از گونه R. arrhizus در مطالعات بالینی گزارش شده است؛ میزان مرگ و میر در گونه R. microsporus در این مطالعه بالاتر بوده است. در مطالعه کائگر و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۲۳) گونه های گرمادوست توانایی بیشتری به بیماری زایی داشتند در حالی که دیگر عوامل مانند اندازه اسپور، مقاومت در برابر استرس ها، و.... تاثیری در این امر نداشتند.

میزان مرگ و میر ارتباطی با حضور باکتری همزیست در برخی سویه ها نداشت. لذا استنباط می گردد که بیماری زایی این گونه ها و عفونت موکورکایکوزیس ارتباطی با وجود این باکتری نداشته باشد(۶).

استراتژی این مطالعه استفاده از نمونه هایی بوده است که دمای رشد و نمو آن ها برای زندگی، نزدیک به دمای بدن انسان است. پس با بررسی زمان مرگ و میر نمونه های آلوده با این گونه قارچی و به دست آوردن میزان درصد مرگ و میر آن ها می توان به یافته های مقایسه ای با شرایط ایجاد بیماری در بالین دست یافت.

میزان مرگ و میر ارتباطی با منبع جداسازی نمونه ها مانند محیط، بالین و مواد غذایی تخمیری نداشته است. این امر نشان دهنده توان ذاتی این نمونه ها در ایجاد عفونت در شرایط مساعد می باشد. این شرایط مساعد به عنوان مثال در بدن فرد مبتلا به نقص سیستم ایمنی فراهم می باشد.

این آزمون نشان داد هر دو گونه Rhizopus arrhizus و Rhizopus microsporus و هم چنین پاتوژن های مهم فرصت طلب مانند موکور،کاندیدا، آسپیرژیلوس و فوزاریوم قادر به ایجاد عفونت در

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

میزبان هایی با نقص سیستم ایمنی می باشند. پس با به دست آوردن زمان مرگ و میر نمونه ها و درصد آلودگی آن ها می توان به زمان لازم جهت بهبودی بیماران و درمان آن ها و نیز روند پیشروی بیماری پی برد.

سرعت ایجاد مرگ و میر در سویه های مورد مطالعه بالا و در همان روزهای اولیه پس از تلقیح بوده است. این امر مطابق با سرعت پیشروی عفونت در بالین و ایجاد مرگ و میر بالا در زمان کوتاه می باشد که مشخصه عفونت موکورمایکوزیس می باشد.

این مطالعه نتیجه گیری می کند که سویه های تست شده در این آزمایش، در میزان بیماری زایی متفاوت می باشند. درصد بیماری زایی بالا در نمونه های جداسازی شده از منابع غذایی نیز مشاهده شده است. لذا با توجه به گستردگی وسیع این گونه قارچی در طبیعت و کاربرد این گـــونه ها در تـــهیه مواد غذایی و نیز بیماری زایی آن ها در انسان، بررسی میزان بیماری زایی این گونه ها ضروری می باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه قدرت ذاتی در تولید بیماری و عفونت در گونه های مذکور وجود داشته و بنا بر این باید به عنوان یک ریسک و خطر در عرصه مواد غذایی با آن ها برخورد نمود.

کد اخلاق: IR.MUMS.fm.REC.1396.457

References

1. Dolatabadi S. Mucorales between food and infection. PhD thesis Amsterdam Uni. 2015.
2. Hesseltine CW. Microbiology of oriental fermented foods. Annu Rev Microbiol 1983; 37: 575–601. doi. 10.1146/annurev.mi.37.100183.003043
3. Jennessen J, Nielsen KF, Houbraken J, Lyhne EK, Schnurer J, Frisvad JC, et al. Secondary metabolite and mycotoxin production by the Rhizopus microsporus group. J Agr Food Chem 2005; 53: 1833–40. doi.10.1021/jf048147n
4. Hong SB, Kim DH, Lee M, Baek SY, Kwon SW, Houbraken J, et al. Zygomycota associated with traditional meju, a fermented soybean starting material for soy sauce and soybean paste. J Microbiol 2012; 50:386-93. doi.10.1007/s12275-012-1437-6
5. Dolatabadi S, Walther G, Gerrits AHG, Hoog GS. Diversity and delimitation of Rhizopus microsporus. Fung Div 2014; 64:145-63. doi.10.1007/s13225-013-0229-6
6. Walther G, Pawłowska J, Izquierdo A, Wrzosek M, Rodriguez JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A, et al. DNA barcoding in Mucorales an inventory of biodiversity. Persoonia 2013; 30:11-47. doi. 10.3767/003158513X665070
7. Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of mucormycosis. Clin Inf Dis 2012;54: 16-22. doi. 10.1093/cid/cir865
8. Rammaert B, Lanternier F, Zahar JR. Healthcare associated mucormycosis. Clin Inf Dis 2012;54: 44-54. doi. 10.1093/cid/cir867
9. Lanternier F, Sun HY, Ribaud P, Singh N, Kontoyiannis DP, Lortholary O. Mucormycosis in organ and stem cell transplant recipients. Clin Inf Dis 2012;54: 35-43.
10. Binder U, Maurer E, Lass C. Mucormycosis from the pathogens to the disease. Clin Microbiol Inf 2014; 20:6:60-6. doi.10.1093/cid/cis195
11. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients 2001-06 overview of the transplant associated infection surveillance network database. Clin Inf Dis 2010; 50:1091-100. doi. 10.1086/651263
12. Rohm B, Scherlach K, Mobius N, Partida LP, Hertweck C. Toxin production by bacterial endosymbionts of a Rhizopus microsporus strain used for tempe sufu processing. Int J Food Microbiol 2010; 136:368-71. doi. 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.010
13. Dolatabadi S, Hoog GS, Meis JF, Walther G. Species boundaries and nomenclature of Rhizopus arrhizus. Mycoses 2014b; 57: doi. 10.1111/myc.12228.
14. Jacobsen ID, Grobe k, Berndt A, Hube B. Pathogenesis of Candida albicans infections in the alternative chorio allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. PLos One

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

2011;6: 19741. doi. 10.1371/journal.pone.0019741
15. Hartl A, Hillesheim HG, Kunkel W, Schrinner EJ. The Candida infected hens egg an alternative test system for systemic anticandida activity. Arzne Im Sch1995; 45:926-8.
16. Skiada A, Pagano L, Groll A. Analysis of 230 cases accrued by the registry of the European confederation of medical mycology working group on Zygomycosis between 2005 and 2007. Clin Microbiol Inf2011; 17:1859-67. doi. 10.1111/j.1469-0691.2010. 03456.x
17. Alvarez E, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Stchigel A, Rinaldi MG, et al. Spectrum of zygomycete species identified from clinically significant specimens in the United States. J Clin Microbiol 2009; 47:1650–1656. doi. 10.1128/JCM.00036-09
18. Wanga JW, Zhoua JY, Yanga QW. An improved embryonated chicken egg model for the evaluation of antiviral drugs against influenza A virus. J Virol Meth 2008; 153:218-222. doi. 10.1016/j.jviromet.2008.06.022
19. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects. J Bacteriol 2000; 182:3843-5. doi. 10.1128/jb.182.13.3843-3845.2000
20. Anderson C, Gripenland J, Johansson J. Using the chicken embryo to assess virulence of Listeria monocytogenes and to model other microbial infections. Nat Prot 2015; 10:1155-64. doi. 10.1038/nprot.2015.073
21. Jacobsen ID, Grobe K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate Aspergillus fumigatus virulence. Inf Immun 2010; 28:2995-3006. doi. 10.1128/IAI.00268-10
22. Jacobsen ID, Grobe K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate Aspergillus fumigatus virulence. Inf Immun 2010; 78:2995-3006. doi. 10.1128/IAI.00268-10
23.Kaerger K, Schwartze VU, Dolatabadi S, Nyilasi I, Kovas SA, Binder U, et al. Adaptation to thermotolerance in Rhizopus coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny physiological and metabolic flexibility. Virulence 2015;6:395–403. doi. 10.1080/21505594.2015.1029219
24. Schwartze VU, Hoffmann K, Nyilasi I, Papp T, Vagvolgyi C, Hoog S, et al. Lichtheimia species exhibit differences in virulence potential. Plos One 2012;7: 40908. doi. 10.1371/journal.pone.0040908
25. Ibrahim AS, Gebremariam T, Liu M, Chamilos G, Kontoyiannis DP, Mink R, et al. Bacterial endosymbiosis is widely present among zygomycetes but does not contribute to the pathogenesis of mucormycosis. J Inf Dis 2008; 198:1083-90. doi: 10.1086/591461

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/sjimu.28.2.72]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:13 IRST on Tuesday September 22nd 2020

Virulence Potential of Rhizopus Species in an Embryonated Chicken Egg Model

Dolatabadi S[1], Pourfraidongahasrodashti Z[2], Najafzadeh M[3], Hosseini S[4]*

(Received: June 1, 2019 Accepted: February 1, 2020)

Abstract

Introduction: Little is known about the pathogenicity and virulence properties of the Rhizopus species used in food fermentation. This study aimed to investigate the virulence potential of Rhizopus arrhizus and R. microsporus strains obtained from a wide selection of clinical and environmental sources in an embryonated chicken egg model.

Materials & Methods: In total, 26 strains (13 strains from each species) were inoculated in embryonated eggs with final concentration of 10^6 spore/ml/egg. The eggs were inoculated (0.1 ml) through chorio-allantoic membrane in day 10 and incubated at 37.6 °C and 60% humidity and monitored for 7 days. *Ethics code:* IR.MUMS.fm.REC.1396.457

Findings: The mortality rate for R. microsporus was slightly higher than that of R. arrhizus. The ability of R. arrhizus and R. microsporus to cause infection was strain-specific but source-independent in the embryonated chicken eggs. The presence of endosymbiont bacteria (Burkhulderia) in some strains of R. microspores did not show any effect on their virulence.

Discussion & Conclusions: The occurrence of virulence in strains isolated from fermented food indicates the opportunistic nature of these fungi and possibility of a public health risk for consumers.

Keywords: Fermented food, Embryonated chicken egg model, Mucorales, Rhizopus, Rhizopus, Virulence

1. Faculty of engineering, Sabzevar University of New Technology, Sabzevar, Iran
2. Dept of Pathology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Dept of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Dept of Biology, Faculty of Life Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
**Corresponding author Email: somayeh99@gmail.com*

www.SID.ir