

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

سمیه دولت آبادی\*، زهرا پورفریدون قصرالدشتی<sup>۲</sup>، محمدجواد نجف زاده<sup>۳</sup>، سیدابوالفضل حسینی<sup>۴</sup>

(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 تکیم سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۱

### 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. microspor 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. arrhizus و R. microspor در جنین تخم مرغ با غلظت نهایی ۱۰<sup>۶</sup> اسپور/میلی لیتر برای هر سویه آماده شدند. جنین های تخم مرغ در روز دهم جنینی و در ناحیه کریوآلاتویک 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. microspor 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. microspor، 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.

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 آنزیم 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، آنزیم های مختلف، الکل، سوخت های زیستی، مواد دارویی و صنعتی مختلف می باشند که هر کدام به نوبه خود می توانند کاربردهای صنعتی بالایی داشته باشند و بخش عظیمی از تقاضای روزافزون این محصولات در بازارهای 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 کار 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، زیلاناز و ... می باشند (۵) که در فرآوری این محصولات غذایی تخمیر شده لازم می باشند. از دیدگاه کلی، قارچ *R. arrhizus* به عنوان قارچ امن شناخته می شود و قادر به استفاده از منابع کربنی مختلفی مانند گالاکتوز، لاکتوز، ترهالوز، ریروز و زیلوز می باشد (۳،۴). سویه های بسیاری

از گونه ریزوپوس از مواد غذایی تخمیری ذکر شده جداسازی شده اند که در کلکسیون قارچی 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 قارچی به چشم 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 (۷-۹). در دهه های اخیر گزارش های موردی از بروز عفونت 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 اعضا، دیابت، و بیماری های 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 گیرند. دیگر گونه ریزوپوس *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 *Burkholderia* می باشد. این باکتری از خانواده *Burkholderiaceae* قادر به تولید سم *Rhizoxin* می باشد که قادر به بیمار نمودن گیاه برنج می باشد (۱). *Rhizoxin* عامل antimicrotubule است 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 شده است (۳،۱۲) که

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 وارسته *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 ۱۳ نمونه (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 وارسته این گونه

می باشد؛ وارسته *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 پیتون 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 ۱۰<sup>۷</sup> 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 ۱۰<sup>۶</sup> 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 آلتوییک، 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

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) ۷۵-۱۰۰ درصد و  
var. arrhizus (GM 54.38 ± 25.97) ۲۵-۱۰۰ درصد در آخرین روز آزمایش بوده است.

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. arrhizus 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.

کمک یک سرنگ استریل جنین ها با غلظت نهایی ۱۰<sup>۶</sup> 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 Kaplan-Meyer رسم و با استفاده از تست log rank آنالیز شدند. میزان P کمتر از ۰/۰۵ 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 زیر دسته 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

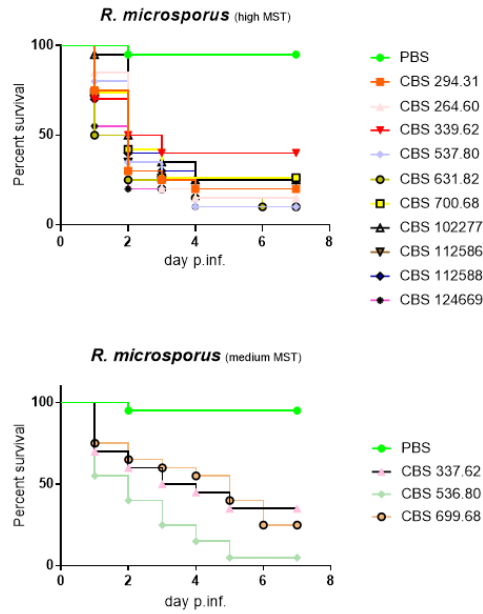
جدول شماره ۱. لیست نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه، نام گونه، منبع و مکان جداسازی، وجود باکتری همزیست در برخی سویه‌ها

| 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               |          |

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 |

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

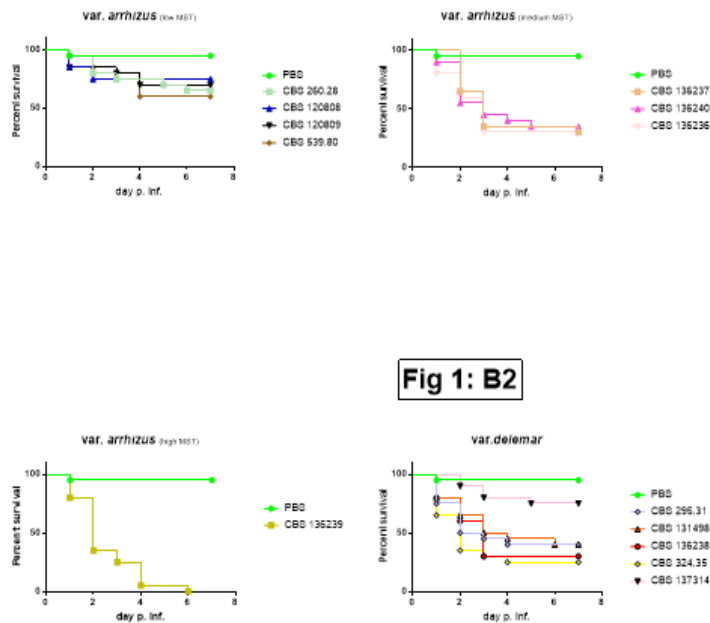


Fig 1: B2

تصویر شماره ۱ ب ۱. نمودار مرگ و میر گونه *R. arrhizus* 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. arrhizus* var. *delemar* در بازه زمانی هفت روزه.

## 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 اعضا 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 و سریع 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 اسپریژیلوس 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 (۲۱، ۲۲، ۱۴). در بین قارچ های گروه موکورال ها، این مدل آزمایشگاهی در مورد قارچ ریزوپوس و لیختمایا (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 کانگر 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... تاثیر 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، اسپریژیلوس و فوزاریوم قادر به ایجاد عفونت در



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 گونه ها در تهیه 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/خلاق: IR.MUMS.fm.REC.1396.457

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

### References

- Dolatabadi S. Mucorales between food and infection. PhD thesis Amsterdam Uni. 2015.
- Hesseltine CW. Microbiology of oriental fermented foods. *Annu Rev Microbiol* 1983; 37: 575-601. doi. 10.1146/annurev.mi.37.100183.003043
- 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
- 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
- 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
- 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
- Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of mucormycosis. *Clin Inf Dis* 2012;54: 16-22. doi. 10.1093/cid/cir865
- Rammaert B, Lanternier F, Zahar JR. Healthcare associated mucormycosis. *Clin Inf Dis* 2012;54: 44-54. doi. 10.1093/cid/cir867
- 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.
- 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
- 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
- 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
- Dolatabadi S, Hoog GS, Meis JF, Walther G. Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus*. *Mycoses* 2014b; 57: doi. 10.1111/myc.12228.
- 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*

- 2011;6: 19741. doi. 10.1371/journal.pone.0019741
15. Hartl A, Hillesheim HG, Kunkel W, Schrunner EJ. The *Candida* infected hens egg an alternative test system for systemic anticandida activity. *Arzne Im Sch*1995; 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 Inf*2011; 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

## Virulence Potential of Rhizopus Species in an Embryonated Chicken Egg Model

Dolatabadi S<sup>1\*</sup>, Pourfraidongahasrodashti Z<sup>2</sup>, Najafzadeh M<sup>3</sup>, Hosseini S<sup>4</sup>

(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<sup>6</sup> 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 (Burkholderia) 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