جداسازی گونه‌های *اسینتوباکتر* از غذاهای یخزده و تاثیر آن بر برخی از قارچ‌های بیماری زا

صدیقه کریمی نژاد[1]، فاطمه شهدادی[2*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت، جیرفت، ایران.

۲. بخش صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

***نویسنده مسئول:** *fatemeh.shahdadi@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۴

چکیده

در سال‌های اخیر تولید داروهای ضد قارچی جدید، به دلیل مقاومت سموم قارچی و بیماری‌زا بودن آنها مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق اثر مهاری *اسینتوباکتر* جدا شده از غذاهای یخ زده بر علیه قارچ‌های بیماری‌زای *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی شد. تعداد ۱۵ نمونه غذای یخزده از فروشگاه‌های شهرستان جیرفت جمع‌آوری و جهت جداسازی و شناسایی *اسینتوباکترهای* احتمالی موجود در آنها مورد آزمایش قرار گرفت. درمجموع ۲۸ ایزوله باکتریایی به‌دست آمد که از این تعداد، دو ایزوله با استفاده از روش-های بیوشیمیایی *اسینتوباکتر* شناسایی شدند. این دو ایزوله از همبرگر گوشت و سبزیجات منجمد جداسازی گردید. قارچ‌های بیماری‌زای *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شدند. سپس اثر آنتاگونیستی دو ایزوله *اسینتوباکتر* بر روی قارچ‌ها بررسی شد. نتایج نشان از عدم مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* توسط دو ایزوله *اسینتوباکتر* جدا شده از همبرگر گوشت و سبزی منجمد داشت، اما ایزوله *اسینتوباکتر* جدا شده از سبزی منجمد بر قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* اثر مهاری نشان داد و قطر هاله عدم رشد آن ۱۱ میلی‌متر بود. در نهایت باکتری دارای اثر مهاری برای شناسایی مولکولی انتخاب شد. بر اساس نتایج بلاست توالی و رسم درخت فیلوژنی، جدایه مورد مطالعه، *اسینتوباکتر بومانی* بود.

کلید واژه ها: *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *اسینتوباکتر*، غذاهای منجمد.

مقدمه

سرما واکنش‌های شیمیایی و فعالیت آنزیمی موادغذایی را به تأخیر انداخته و همچنین سبب توقف یا کاهش رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. انجماد یکی از روش‌های نگهداری مواد غذایی برای مدت طولانی است. در این روش ماده غذایی دچار فعل و انفعالاتی می‌شود که در صورت رعایت اصول انجماد این تغییرات را می‌توان به حداقل رساند (فاطمی، ۱۳۹۳).

با این حال بسیاری از میکروارگانیسم‌های سرمادوست قادر به زنده ماندن و حتی رشد در شرایط سرما و انجماد هستند. برای مثال برخی گونه‌های *سودوموناس* در شرایط انجماد گوشت و فرآورده‌های گوشتی قادر به رشد و تکثیر و ایجاد فساد هستند (طباطبایی، ۱۳۸۴). *اسینتوباکترها* باکتری‌هایی گرم منفی، هوازی اجباری و معمولا کپسول‌دار هستند که بر رو ی محیط‌های معمـولی آزمایشگاهی به آسانی رشد می‌کنند. *اسینتوباکترها* ارگانیسم‌هایی با ویرولانس کم هستند ولی قادرنـد در محیط‌های بیمارستانی عفونت‌های شدید گوناگونی را ایجاد کنند و از محیط‌های مختلف مانند شیرهای پاستوریزه، غذاهای منجمد شـده، هـوای بیمارسـتان‌هـا و بـسیاری از وسایل مورد استفاده در بیمارستان جدا شوند. این باکتری‌ها در روی سطوح خشک تا مدت‌ها زنده می‌مانند. این باکتری‌ها مقاومت بـالایی نسبت به شرایط محیطی دارند (Cusato et al., 2013).

قارچ‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و بیماری به شمار می‌روند. از بین قارچ‌های متعدد، قارچ-هایی چون *کاندیدا آلبیکانس* و *آسپرژیلوس نایجر* از جمله عوامل عفونی بیماری‌زا در انسان هستند. افزایش عفونت‌های قارچی در افراد مبتلا به بیماری‌های وخیم و بیمارانی که به علت بیماری‌های زمینه‌ای از جمله لوسمی یا سندروم نقص ایمنی اکتسابی یا افرادی که به جهت شیمی درمانی یا پیوند اعضا دچار نقص ایمنی هستند به عنوان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر به شمار می‌رود . برخی از آنها بر کیفیت غذا تاثیر منفی

دارند، جنس‌های قارچی مانند *آسپرژیلوس*، *پنیسیلیوم*، *آلترناریا* و *فوزاریوم* توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه را دارند که می‌توانند بر روی انسان و حیوانات اثر سمی داشته باشند و به همین دلیل مایکوتوکسین‌ها نامیده می‌شوند. علاوه بر این، مایکوتوکسین‌ها قادر به مقاومت در برابر مراحل مختلف فرآوری مواد غذایی می‌باشند بنابراین منجر به نگرانی‌های ایمنی مواد غذایی می‌شود (Kitinoja et al., 2011).

سموم قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط مختلف حیاتی مقاوم هستند، به‌همین دلیل باید از حضور قارچ‌ها در مواد غذایی به‌شدت جلوگیری شود. در سال‌های اخیر، اکثر مطالعات صورت گرفته در درمان عفونت‌های قارچی بر یافتن ترکیبات جدید مهارکننده رشد عوامل قارچی استوار بوده و توجه محققین به بررسی تاثیر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها و متابولیت‌های تولید شده توسط آنها بر رشد قارچ متمرکز شده است. باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلفی از جمله زندگی انگلی، تولید ترکیبات ضدقارچ، رقابت برای آهن، غذا و محل زندگی بر رشد قارچ‌ها تاثیر می‌گذارند (Romero et al., 2007). نکته قابل توجه در ارتباط با *اسینتوباکتر* خاصیت آنتاگونیستی آن است. این باکتری توانایی تولید متابولیت‌هایی را دارد که قارند از رشد قارچ‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند و در صنعت و فرآوری مواد غذایی این نکته مهم و مثبتی از *اسینتوباکتر* است (Ana et al., 2016). هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی باکتری‌های *اسینتوباکتر* از غذاهای یخ زده و تاثیر آن بر برخی از قارچ‌های بیماری‌زا در مواد غذایی می‌باشد.

روش کار

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل محیط کشت‌های نوترینت آگار، نوترینت براث و بایل اسکولین آگار (های مدیا، هند)، تایوگلی کولات براث (مرک، آلمان)، سیمون سیترات، مک کانکی آگار، بلاد آگار، SIM و مولر هینتون اگار (مرک، آلمان)، کیت رنگ آمیزی گرم (پادتن طب، ایران)، آب اکسیژنه (پارس، ایران)، دیسک اکسیداز و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین و پنی‌سیلین (پادتن طب، ایران) بودند.

جمع‌آوری نمونه‌های غذایی منجمد

نمونه‌های غذایی منجمد شامل سینه مرغ، ناگت مرغ، سبزی، ماهی، همبرگر گوشت منجمد بسته‌بندی شده بومی به عنوان نمونه‌های آزمایشگاهی از سوپرمارکت‌های شهرستان جیرفت انتخاب و جمع‌آوری شدند. از هر نمونه غذایی ذکر شده سه عدد با سه برند مختلف انتخاب شد و تاریخ مصرف مواد غذایی نیز کنترل گردید. کدهای داده شده به نمونه‌های غذایی منجمد به همراه تاریخ جمع‌آوری آنها در جدول شماره یک آورده شده‌است که در بازه زمانی فروردین، اردیبهشت و خرداد ۹۷ نمونه‌های منجمد به طور تصادفی انتخاب و تهیه شدند.

جدول ۱- نام و کد مواد غذایی منجمد به همراه تاریخ جمع‌آوری آنها

ردیف	کد	نام ماده غذایی منجمد	تاریخ جمع‌آوری
۱	S1	سینه مرغ	فروردین ۹۷
۲	S2	سینه مرغ	اردیبهشت ۹۷
۳	S3	سینه مرغ	خرداد ۹۷
۴	N1	ناگت مرغ	فروردین ۹۷
۵	N2	ناگت مرغ	اردیبهشت ۹۷
۶	N3	ناگت مرغ	خرداد ۹۷
۷	Z1	سبزی	فروردین ۹۷
۸	Z2	سبزی	اردیبهشت ۹۷
۹	Z3	سبزی	خرداد ۹۷
۱۰	M1	ماهی	فروردین ۹۷
۱۱	M2	ماهی	اردیبهشت ۹۷
۱۲	M3	ماهی	خرداد ۹۷
۱۳	H1	همبرگر گوشت منجمد	فروردین ۹۷
۱۴	H2	همبرگر گوشت منجمد	اردیبهشت ۹۷
۱۵	H3	همبرگر گوشت منجمد	خرداد ۹۷

جداسازی باکتری‌های نمونه‌های یخزده

میزان یک گرم از هر ماده غذایی منجمد، در محیط تایو گلی کولات براث تلقیح شد. بعد از انکوباسیون ۲۴

ساعته لوله‌های آزمایش کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از هر لوله کشت به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته شد و در داخل پلیت‌های ۱۰ سانتیمتری حاوی محیط‌های کشت مک کانکی آگار و بلاد آگار ریخته و نمونه‌های داخل پلیت با میله شیشه‌ای کشت سطحی داده‌شدند. پلیت‌های کشت داده شده، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس کلنی‌های باکتریایی رشد یافته بر روی سطح پلیت‌های کشت مورد بررسی قرار گرفتند. برای تهیه استوک از باکتری‌های جداسازی شده، محیط کشت نوترینت آگار در لوله‌های آزمایش در پیچدار به صورت شیب‌دار تهیه شد و جدایه‌های باکتریایی در آن کشت داده شدند. بعد از رشد ۲۴ ساعته جدایه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، جدایه‌ها در یخچال در دمای چهار درجه سانتی-گراد نگهداری شدند (Eze et al., 2011)

شناسایی بیوشیمیایی

شناسایی بیوشیمیایی با استفاده از تست‌های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، کشت در محیط‌های SIM، TSI و سیمون سیترات، هیدرولیز اسکولین در محیط کشت بایل اسکولین آگار، احیای نیترات، حساسیت به پلی‌میکسین و مقاومت به پنی‌سیلین B استفاده شد.

جهت بررسی تست حساسیت و مقاومت سویه‌های ایزوله شده در مقابل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پلی-میکسین و پنی‌سیلین B از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت، از نمونه-های باکتریایی نیم مک فارلند تهیه و از هر نمونه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر داخل پلیت حاوی محیط کشت مولرهینتون‌آگار ریخته شد. سپس با استفاده از سواب استریل، کشت سطحی برروی پلیت انجام شد. در مرحله نهایی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، با پنس استریل بر روی محیط کشت قرار داده شدند. پلیت‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از گذاشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری، مورد بررسی قرار گرفتند (سعادتیان و همکاران، ۱۳۸۴).

نحوه بررسی اثرات باکتری ایزوله شده بر قارچ‌های بیماری‌زا

اثر آنتاگونیستی *سویه‌های* ایزوله شده از نمونه‌های غذایی یخ زده، بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا بررسی گردید. قارچ‌های بیماریزای انتخاب شده در این پژوهش، شامل *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* بودند. این قارچ‌ها با کد PTCC: 5010 (*آسپرژیلوس نایجر*) و کد PTCC:5009 (*آسپرژیلوس فلاووس*) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران تهیه شدند.

جهت انجام آزمون، ابتدا نیم گرم از قارچ وزن شده و با پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. سپس به اندازه ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی(حاوی 10^4 اسپور بر میکرولیتر) با سمپلر برداشته و در محیط کشت SDA(سابارو دکستروز آگار) تلقیح و کشت سطحی داده‌شد. از ایزوله‌های باکتریایی *اسینتوباکتر* غلظت نیم مک فارلند تهیه و به صورت نقطه‌ای در پلیت کشت داده شده با قارچ تلقیح شد. پلیت‌های کشت داده شده، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۹۶ ساعت قرار داده شدند و از لحاظ تشکیل و یا عدم تشکیل هاله مورد بررسی قرار گرفتند (Tenorio-Salgado et al., 2013).

شناسایی باکتری‌های ایزوله شده با روش مولکولی

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش روش فنل-کلروفرم استفاده شد. ابتدا میکروتیوپ حاوی باکتری در دور ۱۰۰۰۰ به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب باکتری ۱۰۰ میکرولیتر محلول STES(۱۰میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک، ۰/۱درصد وزنی-حجمی SDS، ۱۰۰میلی مولار کلرید سدیم، ۱ میلی‌مولار EDTA) اضافه گردید و به میزان۲۰ میکرولیتر محلول TE با اسیدیته ۷/۶ به آن اضافه و به میکروتیوب چند ضربه زده‌شد تا رسوب در محلول حل شد. پس از آن سه میکرولیتر لیزوزوم اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۳۰ میکرولیتر پروتئیناز K به میکروتیوب افزوده و ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده شد. سپس

نصف حجم فنل و نصف کلروفرم اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز رویی جدا و به ویال دیگری انتقال داده شد. ۰/۱ حجم جدا شده استات‌سدیم و ۲/۵ برابر حجم جدا شده اتانول مطلق اضافه گردید. ویال‌ها چند بار به آرامی برعکس شد و بعد به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس محلول دور ریخته و ویال‌ها در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کاملا خشک شوند. در آخر به ویال‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول TE با اسیدیته ۸ اضافه شد (Nimnoi et al., 2010). کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ سنجش شد.

PCR

پرایمر

توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR که از شرکت تکاپوزیست تهیه شدند، در جدول شماره دو آورده شده‌است.

جدول۲- پرایمرهای اختصاصی 16SrRNA (Woodford et al., 2006)

Primers 27 F	(5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3)
Primers 1492 R	(5-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3)

واکنش PCR

جهت انجام واکنش PCR مواد مورد نیاز با حجم و غلظت‌های مشخص برای نمونه‌ها آماده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس(Ampliqon Inc, Denmark)، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۴۰۰ نانومولار، دو میکرولیتر DNA و ۲۱ میکرولیتر آب مقطر در نظر گرفته‌شد. برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در این پژوهش شامل، واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه، واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکرار مراحل واسرشت، اتصال و گسترش به تعداد ۴۰ سیکل بود (Woodford et al., 2006).

الکتروفورز ژل اگارز

پس از پایان یافتن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصول واکنش توسط ژل آگاروز(۲ درصد) با استفاده از محلول بافری تریس – استات – EDTA (1X TAE Buffer) در دمای اتاق الکتروفورز گردید(Nimnoi et al., 2010). پس از پایان مرحله الکتروفورز، ژل از بافر خارج و در دستگاه مستندسازی ژل داک[1]قرار داده و ضمن مشاهده باندها در مقایسه با Ladder، با دوربین مخصوص عکس گرفته و ذخیره‌سازی آن انجام شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی

بعد از انجام الکتروفورز و مشاهده باند مربوط به قطعه تکثیر شده، محصول PCR جهت تخلیص و تعیین توالی به همراه پرایمرهای پیشرو و برگشتی به شرکت Bioneer کره جنوبی با واسطه شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) ارسال‌گردید تا توالی‌های محصولات PCR ارسال شده مشخص و تأیید گردند.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی

توالی‌های بدست آمده با نرم افزارهای متعددی بررسی کیفیت و ویرایش و آنگاه توالی نهایی با سایر توالی‌های باکتریایی موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) مقایسه و درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. در تحقیق حاضر از نرم افزار(Codon Code Aligner (Ver 4.2.3 جهت بررسی کیفیت و ویرایش توالی‌های واصل شده استفاده گردید. نهایتاً توالی بدست آمده در مقابل داده‌های توالی نوکلئوتیدی باکتری‌های موجود در بانک ژن به شیوه Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) بررسی گردید. این شیوه قادر است شباهت توالی به دست آمده را با توالی‌های موجود مقایسه و میزان شباهت احتمالی جدایه‌ها را با سویه‌های مطالعه شده موجود به صورت درصد شباهت گزارش نماید.

نتایج

جداسازی ارگانیسم‌های باکتریایی از غذاهای منجمد شده

[1] Gel Documentation

جدول ۳- کد ایزوله‌های باکتریایی جداسازی شده از نمونه‌های غذایی منجمد

ردیف	نمونه غذایی	کد باکتری
۱	سینه مرغ	S2-2
۲	سینه مرغ	S2-3
۳	سینه مرغ	S3-1
۴	سینه مرغ	S2-4
۵	سینه مرغ	S2-5
۶	سینه مرغ	S2-6
۷	سینه مرغ	S3-2
۸	ناگت مرغ	N1-1
۹	ناگت مرغ	N2-1
۱۰	ناگت مرغ	N2-2
۱۱	ناگت مرغ	N3-1
۱۲	ناگت مرغ	N1-2
۱۳	ناگت مرغ	N2-3
۱۴	ناگت مرغ	N2-4
۱۵	ناگت مرغ	N2-5
۱۶	ناگت مرغ	N3-1
۱۷	ناگت مرغ	N3-2
۱۸	سبزی	Z2-1
۱۹	سبزی	Z3-1
۲۰	ماهی	M3-1
۲۱	ماهی	M1-1
۲۲	ماهی	M3-2
۲۳	همبرگرگوشت منجمد	H2-1
۲۴	همبرگرگوشت منجمد	H2-2
۲۵	همبرگرگوشت منجمد	H3-1
۲۶	همبرگرگوشت منجمد	H1-1
۲۷	همبرگرگوشت منجمد	H2-3
۲۸	همبرگرگوشت منجمد	H3-2

بعد از کشت نمونه‌های غذایی منجمد شده در محیط های کشت مورد نظر و بررسی خصوصیات کلنی‌های تشکیل شده بر روی آنها، در مجموع از سینه مرغ منجمد شده، هفت باکتری، از ناگت مرغ ۱۰ باکتری، سبزی دو باکتری، ماهی سه باکتری و همبرگر گوشت شش باکتری به‌دست آمد که مجموع باکتری‌های ایزوله شده به ۲۸ عدد رسید. در جدول شماره سه کد هر باکتری به همراه نام غذای منجمد شده که باکتری از آن استخراج گردید، آورده‌شده‌است.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

از بین ۲۸ ایزوله، کدهای S2-3، N3-1 و H3-2، گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند و نتیجه واکنش اندول در این باکتری‌ها منفی و همچنین توانایی تولید H_2S را نداشتند. باکتری‌های دیگر که فاقد این خصوصیات بودند در این مرحله حذف شدند.

آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های غربالگری شده

سه ایزوله غربالگری شده تا این مرحله در مقابل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین B و پنی‌سیلین قرار گرفتند. نتایج مربوط به این آزمون در جدول شماره چهار آورده شده است.

جدول ۴-نتایج آنتی بیوگرام ایزوله‌های غربالگری‌شده

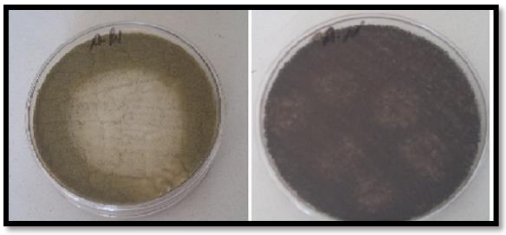
کد باکتری	پنی‌سیلین	پلی‌میکسین
کنترل مثبت	مقاوم	حساس
S2-3	مقاوم	حساس
N3-1	مقاوم	مقاوم
H3-2	مقاوم	حساس

ایزوله N3-1 به سبب مقاوم بودن به پلی‌میکسین حذف شد. ایزوله‌های S2-3 و H3-2 به سبب مقاومت نسبت به پنی‌سیلین و حساسیت به پلی‌میکسین در این مرحله از غربالگری انتخاب شدند و بر اساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی و تطابق نتایج آزمون‌ها با باکتری کنترل مثبت به عنوان *اسینتوباکتر* شناسایی شدند. کد S2-3 مربوط به سبزی منجمد و کد H3-2 مربوط به ماهی منجمد است.

بررسی اثر آنتاگونیستی *اسینتوباکترهای* ایزوله شده بر قارچ‌های بیماریزا

بعد از کشت و بررسی اثر *اسینتوباکترهای* ایزوله شده بر قارچ‌های بیماریزا، *آسپرژیلوس* نایجر و *آسپرژیلوس فلاووس*، سویه‌های *اسینتوباکترهای* ایزوله شده H3-2 اثر آنتاگونیستی بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* نداشتند و قارچ‌ها به مدت ۴۸ ساعت تمامی پلیت را دربرگرفتند. این آزمون سه بار تکرار شد و در هر سه بار نتیجه تست منفی بود(شکل شماره یک). اما ایزوله S2-3 بر قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* اثر مهاری نشان داد و قطر هاله عدم رشد آن ۱۱ میلی‌متر بود.

در نهایت باکتری دارای اثر مهاری یعنی کد S2-3 برای شناسایی مولکولی انتخاب شد.



شکل۱–نتیجه اثر آنتاگونیستی منفی ایزوله H3-2 بر *آسپرژیلوس نایجر* (سمت راست) و *آسپرژیلوس فلاووس* (سمت چپ)

شناسایی مولکولی

جذب نوری DNA استخراج شده

جذب نوری نمونه DNA استخراج شده در طول موج-های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ) خوانده شد و سپس عددهای حاصل بر یکدیگر تقسیم شدند. برای باکتری S2-3 عدد جذب نوری برابر با ۱/۹ بود. همچنین غلظت DNA استخراج شده نیز با همین دستگاه اندازه گیری شد که غلظت DNA ایزوله S2-3 برابر با ۷۵۰ نانوگرم در میکرولیتر بود.

تصویر ژل محصول PCR

شکل۲–تصویر ژل محصول

تصویر ژل محصول PCR در شکل شماره دو آورده شده است. با توجه به لدر، محصول PCR در ۱۵۰۰جفت باز تشکیل باند داده‌است.

نتایج شناسایی میکروارگانیسم به روش تعیین ترادف16S rDNA

تکثیر قطعه ژن 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای 27F و 1492R انجام شد و قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز با روش PCR تکثیر گردید. سپس قطعه مورد نظر جهت توالی‌یابی و خالص‌سازی ارسال گردید.

نتیجه تعیین توالی

توالی فرستاده شده توسط شرکت بیونیر در پایین آورده‌شده‌است.

تجزیه وتحلیل بیوانفورماتیکی

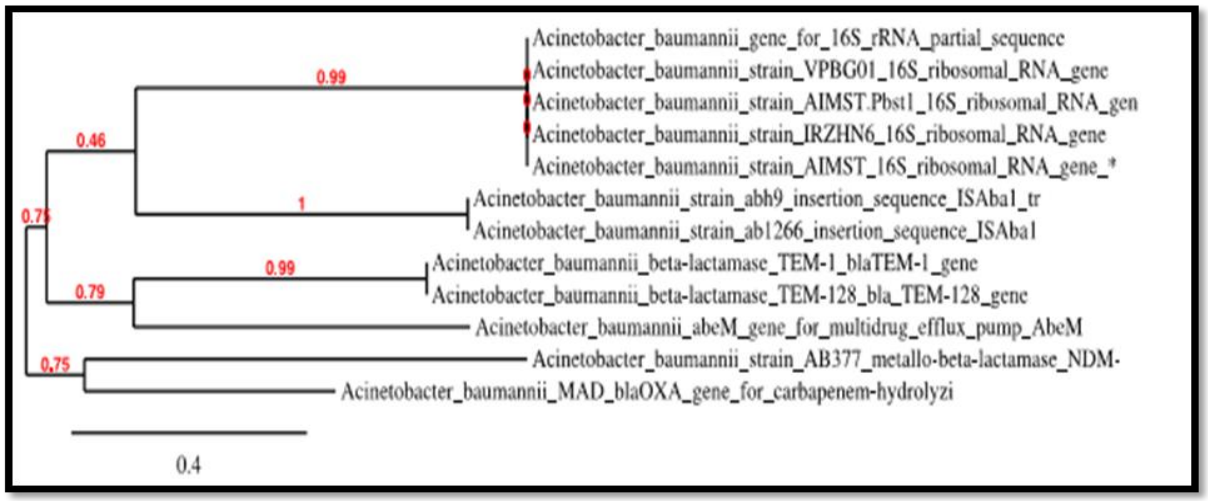
نتایج حاصل از تعیین ترادف، با فرمت الکتروگرام chromase، مورد بررسی قرار گرفت سپس توالی نهایی با سایر توالی‌های باکتریایی موجود در بانک جهانی ژن مورد مقایسه قرار گرفت. بعد از توالی‌یابی ایزوله S2-3 توسط شرکت بیونیر کره جنوبی که با واسطه شرکت ایرانی تکاپوزیست انجام شد، توالی به دست آمده را در سایت NCBI بلاست کرده و درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار فیلوژنی رسم شد. بر اساس نتایج بلاست توالی و رسم درخت فیلوژنی، جدایه S2-3 ، *اسینتوباکتر بومانی است* (شکل شماره سه).

۲۷-۱<F

GGGCATGCTGCAGCTTACACAGTGACAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGC
TAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCT
AAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGA
GGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAA
AGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAA
TAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTT
ACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTATTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGG
AATTGCATTCGATACTGGTGAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTG
AGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTC
TACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAGAAACTTTCCAGAGATGGA

TTGGTGCCTTCGGATCTAGATACAGTGCTGCATGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTGGGTAG
TCCCGCACGAGCGCAACCCTTTTCCTACTGCAGCATTTCGGATGGGAACTTTAGGATACTGCAGTG
ACAACTGGAGGAGGCGGGACGACGTCAGGTCATCATGGCCTTTACGGCAGGCCTACACACTGCTC
AATGGTCGGTACAAAGGTTGCTCCAGCGAGTTGGATGGCTTATCTTCAACCGAACTCTGATTCGGG
AGTGGAGATCTGTCACACTTGACGAG

شکل۳- درخت فیلوژنی



بحث

امروزه توجه محققان به یافتن ترکیبات مهارکننده‌ی رشد قارچها معطوف شده است که در این بین تأثیر میکروارگانیسم‌های مختلف به ویژه باکتری‌های خاکزی، هوازی و دریازی مانند *اکتینومایسس*ها، *استرپتومایسس*ها، *سودوموناس*ها، *باسیلوس*ها، *لاکتوباسیلوس*ها و اسینتو*باکتر*ها بر روی رشد قارچها و متابولیت‌های تولید کننده‌ی آنها با خواص ضد میکروبی‌شان، حائز اهمیت هستند(Strom et al., 2002).

در تحقیق حاضر به جداسازی و شناسایی باکتری *اسینتوباکتر* از غذاهای یخ زده مختلف پرداخته شد و از ۲۸ باکتری ایزوله شده از مواد غذایی یخ زده، دو باکتری *اسینتوباکتر* شناسایی شدند. بر اساس نتایج بلاست توالی و رسم درخت فیلوژنی نیز جدایه S2-3 ، *اسینتوباکتر بومانی* بود.

در پژوهشی برلا و همکاران، موفق به جداسازی ۳۰ ایزوله *اسینتوباکتر* از ۱۷۷ نمونه سبزیجات شدند (Berlau et al., 1999). دیک شورن سویه‌های *اسینتوباکتر* را از نمونه‌های شیر و مشتقات آن جداسازی نمود (Dijkshoorn, 2013). در مطالعه صادقی‌فرد و همکاران در سال ۱۳۸۵، ۴۶ ایزوله *اسینتوباکتر* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شد. همچنین تعیین حساسیت گونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی گردید. نتایج نشان داد ایزوله‌های بالینی *اسینتوباکتر* به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بوده، اما پلی‌میکسین بر روی آنها اثر گذاشت.

در این پژوهش دو ایزوله با کدهای S2-3 و H3-2 به عنوان *اسینتوباکتر* شناسایی شدند که S2-3 از سبزی یخ زده و کد H3-2 از همبرگر گوشت یخزده جداسازی شد. ایزوله جهت شناسایی مولکولی به طور تصادفی انتخاب و با توجه به توالی ژنتیکی آن مشخص شد این سویه با *اسینتوباکتر بومانی* قرابت ژنتیکی دارد.

در بررسی اثر آنتاگونیستی *اسینتوباکتر* جداسازی شده از نمونه سبزی و همبرگر گوشت یخ زده بر علیه قارچ-های بیماری‌زای *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* مشخص شد که *اسینتوباکتر* جدا شده از همبرگر گوشت یخ زده اثر آنتاگونیستی بر علیه این قارچها نداشت اما *اسینتوباکتر* جدا شده از سبزی منجمد بر علیه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* اثر مهاری نشان داد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که متابولیت-های جدا شده از باکتری‌های اندوفیت مانند

اسینتوباکتر بومانی فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی نشان داده‌اند (Selim et al., 2017؛ Akinsanya et al., 2015). در مطالعه مونوار و همکاران متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از عصاره اتیل اتری *اسینتوباکتر بومانی* شامل ترکیبات کتون‌ها، استرهای آروماتیک، فنول‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، فنول‌های هتروسیکلک آروماتیک و ... بودند که برخی از این ترکیبات دارای اثر ضد قارچی هستند (Monowar et al., 2019).

رنجبریان و همکاران (۱۳۸۹)، در جداسازی باکتری-های خاک، به غربالگری باکتری‌هایی با اثر مهاری رشد بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا پرداختند. نتایج آنها نشان داد از بین سویه‌های جداسازی شده، *اسینتوباکتر بومانی* توانایی اثر مهاری بسیار بالایی بر رشد بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* داشت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد.

در تحقیق نقدی‌فر و همکاران (۱۳۹۵) فعالیت مهاری باکتری *باسیلوس آتروفئوس* جدا شده از خاک نسبت به قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *موکور هیمالیس* پس از گذشت زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بررسی شد و نتایج نشان داد این باکتری قادر بود که قارچ‌های مذکور را در همه این فواصل مهار کند.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق از ۲۸ باکتری ایزوله‌شده از مواد غذایی یخ‌زده، دو باکتری به عنوان *اسینتوباکتر* شناسایی شدند و سویه‌های *اسینتوباکتر* جداسازی شده، دارای اثر آنتاگونیستی بر علیه قارچ‌های بیماری‌زای *آسپرژیلوس نایجر* نداشتند و تنها سویه جدا شده از سبزیجات منجمد بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* اثر مهاری نشان داد. در ارتباط با موضوع این تحقیق، تاکنون مطالعاتی انجام نگرفته و از این جهت بررسی کنترل بیولوژیک در این رابطه طرحی جدید است که در این رابطه نیازمند مطالعات و پژوهش‌های بیشتر می‌باشد.

منابع

۱. رنجبریان، علیرضا. (۱۳۸۹). جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های مهارکننده رشد برخی از قارچ های بیماری زا با استفاده از روش های مولکولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی.

۲. سعادتیان فریور، آرزو.، نوروزی، جمیله.، و امامی، مسعود. (۱۳۸۴). میزان فراوانی *اسینتوباکتر* در بخش مراقبت‌های ویژه جراحی مجتمع رسول اکرم سال (۱۳۸۳)، مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان سال چهارم، شماره ۴، صفحه ۳۴۷-۳۴۲.

۳. صادقی‌فر، نورخدا.، رنجبر، رضا.، قاسمی، امیر.، پاکزاد، ایرج.، زعیمی یزدی، جواد.، زاهری، احمد.، همتیان، علی. و غفوریان، سجاد. (۱۳۸۵). بررسی میزان مقاومت دارویی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* و سایر گونه‌های *اسینتوباکتر* جدا شده از سه بیمارستان شهرستان تهران، سال چهاردهم، شماره ۳، صفحه ۲۹-۳۴.

۴. فاطمی، سید حسن. (۱۳۹۳). اصول تکنولوژی نگهداری مواد غذایی. شرکت سهامی انتشار ، صفحه ۲۵.

۵. نقدی فر، شیرین.، مدنی، محبوبه. و احدی، علی محمد. (۱۳۹۵). جداسازی و شناسایی باکتری مهارکننده‌ی رشد قارچ‌های پاتوژن از اصفهان با استفاده از روش مولکولی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، سال هجدهم، شماره ۵، صفحه ۹۳-۸۳.

6. Akinsanya M.A. Goh J.K. Lim S.P. and Ting A. S. 2015. Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in Aloe vera. FEMS Microbiol Lett. 23: 35–46.

7. Ana C. Vania F. Silva J. and Teixeira P. 2016. Enrichment of *Acinetobacter* spp. from food samples. Food Microbiol. 55:123-127.

8. Berlau J. Aucken H. Malnick H. and Pitt T.1999. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans, Eur J Clin Microbiol Infect.18:179–183.

9. Cusato S. Gameiro A.H. Corassin C.H. Sant'ana A.S. Cruz A.G. Faria J.A. Oliveira C.A. 2013. Food safety systems in a small dairy factory: Implementation, major challenges, and assessment of systems' performances. Foodborne Pathog. 10: 6-12.

10. Dijkshoorn L.2013. *Acinetobacter baumannii*. In Filippis I and McKee ML Molecular Typing in Bacterial Infections, New York: Humana Press Inc. 433-456

11. Eze E.I. Echezona B.C. and Uzodinma E.C. 2011. Isolation and identification of pathogenic bacteria associated with frozen mackerel fsh *(Scombers combrus)* in a humid tropical environment. Afr J Agric Res. 6(7): 1918-1922.
12. Kitinoja L. Saran S. Roy S.K. and Kader A.A. 2011. Postharvest technology for developing countries: Challenges and opportunities in research, outreach and advocacy. J Sci Food Agric. 91: 597–603.
13. Monowar T. Rahman M.S. Bhore S.J. Raju G. and Sathasivam K.V. 2019. Secondary Metabolites Profiling of Acinetobacter baumannii Associated with Chili (*Capsicum annuum* L.) Leaves and Concentration Dependent Antioxidant and Prooxidant Properties. BioMed Res Int. 11(2):1-13.
14. Nimnoi P. Pongsilp N. and Lumyong S. 2010.Endophytic *Actinomycetes* isolated from *Aquilaria crassna*, *Pierreex lec* and screening of plant growth promoter's production. World J Microbiol Biot. 26(2): 193-203.
15. Romero D. Vicente A. Rakotoaly H.R. Dufour E.S. Veening J.W. Arrebola E. Cazorla F.M. Kuipers O.P. Paquot M. Perez-Garcia A. 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Phytopathol. 20:430-440.
16. Selim H.M.M. Gomaa N.M. and Essa A.M. M. 2017. Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. Biocontrol Sci Techn. 27(1): 81–95.
17. Strom K. Sjogren J. Broberg A. Schnurer J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl Environ Microbiol. 68(9): 4322-7.
18. Tenorio-Salgado S. Tinoco R. Vazquez-Duhalt R. Caballero-Mellado J. and Perez-Rueda E. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. Bioengineered. 4(4): 236-43.
19. Woodford N. Ellington M.J. Coelho J.M. Turton J.F. Ward M.E. and Brown S. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J antimicrob agents. 27(4): 351-354.

Isolation *Acinetobacteria* spp. from frozen food and study them effects on some pathogenic fungi

Karimi Nejad S[1], Shahdadi F[*2]

1. MSc Student of Microbiology, Jiroft Branch, Islamic Azad University, Jiroft, Iran.
2. Faculty of the Food Science department, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

***Corresponding author:** *fatemeh.shahdadi@gmail.com*

Received: 15 August 2019 Accepted: 15 November 2019

Abstract

In recent years, producing new antifungal drugs has been considered due to the resistance of fungal toxins and their pathogenicity. In this research, the effect of inhibitory growth of *Acinetobacter* isolated from frozen foods against pathogenic fungi of *Aspergillus niger* (*A.niger*) and *A. flavus* has been investigated. A total of 15 frozen food samples were collected from Jiroft city stores and tested for isolation and identification of potential *Acinetobacter*. A total of 28 bacterial isolates were obtained from frozen food that, from these, two isolates were identified *Acinetobacter* by biochemical methods. These bacteria were isolated from frozen hamburger and vegetables. The pathogenic fungi of *Aspergillus niger* and *A. flavus* were prepared from the center of the Iranian fungus and bacterial collection center. Then, the antagonistic effects of two isolates of *Acinetobacter* on these fungi were investigated. The results showed no inhibition of *A. niger* growth by two isolates of *Acinetobacter* isolated from frozen hamburger and vegetables, but isolates of frozen vegetables showed an inhibitory effect on *A. flavus,* and its inhibition zone was 11 mm. Finally, the inhibitory bacteria were selected for molecular identification. Based on the results of sequencing blast and phylogenetic tree drawing, the isolate studied was *Acinetobacter baumannii*.

Keywords*: Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Acinetobacter*, frozen foods.