# ارزیابی آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی دانه کاروتنوئیدی گونه رودوتورولا گلوتینیس بر استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان گاو

سهیلا نیسی[۱]، منصور بیات*[۱]، تقی زهرایی صالحی[۲]، بهاره رحیمیان ظریف[۳]، رامک یحیی رعیت[۲]

## چکیده

ورم پستان به‌عنوان پرهزینه‌ترین بیماری گاوهای شیری، سالیانه خسارات زیادی را به صنعت دامپروری در جهان وارد می سازد. یکی از مهمترین باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان بالینی در گاوها، استافیلوکوکوس اورئوس است که به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دنیا مقاوم شده است. از این رو محققان در پی روش‌های نوین در درمان چنین عفونت‌های شده‌اند که رنگدانه‌های میکروارگانیسم‌ها نیز جزء این موضوعات قرار می‌گیرد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر رنگ دانه‌های کاروتنوئیدی تولید شده توسط مخمر رودوتورولا گلوتینیس روی جدایه‌های ورم پستانی استافیلوکوکوس اورئوس بود. برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس، از شیر ۱۰۰راس گاو مبتلا به ورم پستان نمونه برداری انجام شد و ژن femA برای تایید مولکولی در بین جدایه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس، با استفاده از روش PCR شناسایی گردید. همچنین جدایه رودوتورولا گلوتینیس بدست آمده از یکی از نمونه های ورم پستانی مورد بررسی بیشتر قرار گرفته و بعنوان نمونه مخمر تولید کننده پیگمان مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مطالعات نشان داد که اثرمهارکنندگی بر روی رشد استافیلوکوکوس با استفاده از رنگدانه استخراج شده از رودوتورولا گلوتینیس کاملا مشهود بوده و بیش از ۸۰ درصد نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به رنگدانه اخذ شده از رودوتورولا گلوتینیس با غلظت ۲۰۰ میکروگرم حساس گزارش شد. همچنین علاوه بر استافیلوکوکوس اورئوس بعنوان یکی از عوامل مسبب اورام پستان در دام‌های شیری، مخمر رودوتورولا گلوتینیس نیز میتواند خود بعنوان عامل ایجاد کننده ورم پستان باشد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که رنگدانه های جداسازی شده از رودوتورولا گلوتینیس مهار رشدی بسیار خوبی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بعنوان یکی از عوامل مسبب ورم پستان در گاو را داشته و با توجه به افزایش مقاومت میکروبی این عامل، می توان از این رنگدانه های طبیعی به جای آنتی بیوتیک‌های سنتتیک و کاهش مقاومت میکروبی استفاده نمود.

***واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، رودوتورولا گلوتینیس ، مخمر، مقاومت میکروبی، ورم پستان***

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۵

## مقدمه

بیش از ۲۰۰ ارگانیسم در مقاله‌های علمی به عنوان عوامل دخیل در ورم پستان ثبت شده است. با این‌همه تعداد خاصی از ارگانیسم‌ها به عنوان عوامل مهم و اصلی در ایجاد ورم پستان به حساب می‌آیند. عوامل میکروبی ایجاد کننده ورم پستان براساس مطالعات اپیدمیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی در سه دسته قرار می‌گیرند که شامل پاتوژن‌های اصلی، پاتوژن‌های غیر اصلی و پاتوژن‌های غیر معمول می‌باشد.(۱-۲) پاتوژن‌های اصلی عواملی هستند که منجر به ایجاد ورم پستان بالینی می گردند و خود به دو دسته شامل عوامل مسری و غیرمسری تقسیم می‌شوند . (۳-٤) در نوع مسری مخزن اصلی این عوامل کارتیه های آلوده می‌باشند و عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها در حین شیردوشی و از طریق وسایل شیردوشی، دست‌های فرد شیردوش و حوله‌هایی که به صورت مشترک برای خشک کردن سرپستانک به کار می روند از کارتیه‌های آلوده به کارتیه‌های سالم و از دامی به دام دیگر انتقال می‌یابد. از جمله پاتوژن‌های این گروه می‌توان استافیلوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، کورینه باکتریوم بویس و مایکوپلاسما را نام برد (۵).

*۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
m.bayat@srbiau.ac.ir
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

ورم پستان در دوران شیرواری و هم در دوران خشکی، پستان دام‌ها را مبتلا می کند و به‌عنوان پرهزینه‌ترین بیماری گاوهای شیری در سراسر جهان مطرح است، به‌طوریکه سالیانه خسارات زیادی را به صنعت دامپروری در جهان وارد می سازد. از مهمترین باکتریهای ایجاد کننده ورم پستان بالینی در گاوها، استافیلوکوکوس اورئوس است که به اکثر داروهای رایج در درمان این بیماری مقاوم شده است (٦). از این رو محققان در پی روش‌های نوین مانند ترکیبات باکتری کش(bioside) میکروارگانیسم‌ها، ترکیبات گیاهان دارویی، فتودینامیک تراپی و ....در درمان چنین عفونت‌های شده اند که رنگدانه‌های میکروارگانیسم‌ها نیز جزء این موضوعات قرار می‌گیرد (٧).

رودوتورولا گلوتینیس از قارچ‌های پر اهمیت و کاربردی در تولید انواع رنگدانه‌ها به حساب می‌آید. این مخمر به طور صنعتی در تولید رنگدانه‌های کاروتنوئید و به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک برای بیماری‌های فساد میوه ها بعد از برداشت استفاده شده است. کارتنوئیدها متعلق به گروه شیمیایی پلی‌ان‌های ایزوپرنوئیدی و محلول در چربی است. این رنگدانه به عنوان یک کروموفور جاذب نور عمل می‌کند و سبب ایجاد رنگ‌های زرد، قرمز و نارنجی می‌شوند. کارتنوئیدها از نظر عملکرد مسئول محافظت گیاه در برابر حساس‌سازی نوری، پیش ساز ویتامین A و رنگیزه کمکی در فتوسنتز می‌باشد. (٨) این رنگدانه همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تقویت ایمنی، جلوگیری از جهش‌زایی و ممانعت از ترادیسی (*transformation*) دارد. از اثرات درمانی کارتنوئید می‌توان به استفاده از آن در درمان سرطان، درمان آب مروارید و درمان بیماری‌های قلبی- عروقی اشاره کرد.(٩) با این همه در مورد خواص ضد باکتریایی این رنگدانه مطالعات اندکی به صورت پراکنده در جهان انجام یافته است. (٨) لیکن در این تحقیق سعی شده است با انجام بررسی‌های لازم بر روی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی تولیدی گونه‌هایی از رودوتورولا ، به ارزیابی و اثربخشی آن در کنترل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به چند دارو به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده ورم پستان در گاو پرداخته شود تا درصورت کارایی خوب به عنوان یک نامزد دارویی مناسب برای تحقیقات بیشتر مد نظر قرار گیرد.

## مواد و روش‌کار

### جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

به منظور جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ١٠٠ نمونه شیر گاو مشکوک به ورم پستان از دامداری‌های صنعتی در یک بازه زمانی سه ماهه اخذ شد و برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. با استفاده از سواپ از قسمت رسوب نمونه‌های شیر بعد از سانتریفیوژ (در دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور rpm٨٠٠٠ به مدت ١٠ دقیقه) بر روی محیط بلادآگار کشت انجام گرفت. بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون، کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد مانند کاتالاز، نیترات، DNase و تست کوآگولاز شناسایی شدند و تا انجام سایر آزمایشات در فریزر ٧٠- درجه سانتیگراد به همراه گلیسرول نگهداری شدند. برای تأیید مولکولی، جستجوی ژن *femA* در بین جدایه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس با استفاده از روش PCR انجام گرفت. برای این کار ابتدا DNA باکتری‌ها با روش جوشاندن استخراج شد. سپس برای تکثیر ژن *femA*، از پرایمرهای طراحی شده توسط Mehrota و همکاران (٢٠٠٠) استفاده شد (جدول ١). واکنش PCR در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر شامل ١٢/٥ میکرولیتر مسترمیکس، ٠/٥ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها (١٠ پیکومول)، ٢/٥ میکرولیتر DNA الگو و ٩ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گرفت. همچنین مراحل انجام PCR به صورت خلاصه در جدول ٢ آورده شده است.(١٠)

**جداسازی رودوتورولا**

نمونه‌های لازم برای جداسازی مخمر رودوتورولا در این مطالعه از محیط‌های مختلف شامل گیاهان وگل‌ها (پارک‌ها و محوطه دانشگاه) و نمونه های بالینی از شیر از دام مبتلا به ورم پستان تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت بررسی خصوصیات کلنی روی محیط جامد، از محیط پتیتو دکستروز آگار (Agar *Dextrose* Potato) استفاده گردید. سپس کلنی‌ها از نظر اندازه، شکل، رنگ و حاشیه مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند. همچنین جهت مطالعه میکروسکوپی مخمرها، از کشت ٢٤ ساعته آن برای رنگ آمیزی استفاده شد و اسمیرها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. جهت شناسایی گونه رودوتورلا چند آزمایش تکمیلی شامل تست اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته و توانایی تخمیر هیدرات‌های کربن انجام گرفت.

**تائید ملکولی *رودوتورولا گلوتینیس***

برای تأیید مولکولی نیز از روش PCR استفاده شد. به این صورت که بعد از استخراج DNA با استفاده از روش فنل- کلروفرم، توالی قطعه‌ای از ژنوم ریبوزومی (ITS) با استفاده از پرایمر اختصاصی مورد تکثیر و شناسایی قرار گرفت. توالی پرایمر و طول محصول PCR در جدول ١ آورده شده است. پرایمرها قبل از استفاده در واکنش PCR، در سایت NCBI بلاست شدند تا دقت پرایمرها و Tm آنها مشخص شود. واکنش PCR برای تکثیر این ژن‌ها در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر شامل ١٢/٥ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون، ٥ ،(٠/٢X میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها (١٠ پیکومول)، ٣ میکرولیتر DNA الگو و ٨/٥ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گرفت. در نهایت محصول PCR در ژل آگارز ١ درصد به مدت ٤٥ دقیقه الکتروفورز شد (٩). برای تأیید ژن‌های تکثیر یافته، تکثیر ژن‌های مربوط به جنس و گونه رودوتورلا در حجم ١٠٠ میکرولیتر انجام گرفت. محصولات PCR این ژن‌ها در ژل آگارز ١ درصد، الکتروفورز شد و با استفاده از کیت تخلیص DNA، باند مورد نظر خالص و به شرکت فزا پژوه ارسال گردید. بعد از توالی‌یابی ژن‌های مورد نظر، توالی آنها در سایت NCBI بلاست گردید و از نظر تشابه توالی‌ها با ژن‌های ثبت شده در بانک اطلاعات ژنی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

**استخراج مخمر *رودوتورولا گلوتینیس***

برای بررسی اثر ضد میکروبی رنگدانه رودوتورلا، استخراج و تخلیص آن به صورت زیر انجام گرفت. مقدار یک لوپ از کشت ٢٤ ساعته مخمر به ٥٠ میلی‌لیتر از محیط YM براث داخل یک ارلن ١٠٠ سی‌سی انتقال یافت و در انکوباتور شیکردار با دمای ٢٥ درجه سانتیگراد و با دور ٢٠٠ rpm قرار گرفت. در ادامه ٣ میلی لیتر از محیط کشت YM براث به ارلن ٥٠٠ میلی‌لیتری حاوی ١٠٠ میلی‌لیتر محیط کشت MMS منتقل شد و در انکوباتور شیکردار با دور ٢٠٠ rpm به مدت ٨٦ ساعت در دمای ٢٥ درجه سانتیگراد، نگهداری شد. در ادامه سلول های مخمری به مدت ٢٠ دقیقه با دور ٥٠٠٠ rpm سانتریفیوژ شده و سپس شستشو شدند. (٦) به بیومس بدست آمده اسید کلریدریک یک نرمال اضافه شد و در بن ماری ٧٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٩٠ دقیقه قرار داده شد. حذف اسید اضافی از طریق شستشو انجام شد، سپس سلول‌ها در محلول استون و متانول به نسبت (١:١) به مدت ٢٤ ساعت قرار گرفتند. عصاره استون و متانول بوسیله قیف جدا کننده به پترولیوم اترسبک ٤٠ تا ٦٠ درجه‌سانتی‌گراد منتقل و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. بعد از شناسایی مخمرهای جداسازی شده از محیط کشت، مخمرهایی که دارای کلنی با شدت رنگ تولیدی بیشتری بودند، انتخاب شدند و از این ایزوله‌ها برای استخراج پیگمان‌های مخمر، از حلال های غیرقطبی همچون پترولیوم اتر، ان- هگزان، اتانول و استن به نسبت (٢٥:٢٥:٥٠) و یا ان –هپتان استفاده گردید. (١١).

**ارزیابی اثر ضد باکتریایی رنگدانه *رودوتورولا گلوتینیس*** *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش انتشار بر روی فعالیت ضد میکروبی رنگدانه رودوتورلا بر روی جدایه‌های

جدول۱- پرایمرهای به کار رفته برای تکثیر ژن *femA* و قطعه ژن ریبوزومی ITS ( رودوتورلا گلوتنسیس)

| ژن | (۵′- ۳′) توالی الیگونوکلئوتیدی | اندازه محصول PCR (جفت باز) |
|---|---|---|
| femA- Forward | AAAAAAGCACATAACAAGCG | ۱۳۲ |
| femA- Reverse | GATAAAGAAGAAACCAGCAG | |
| ITS | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | ۵۵۰ |
| | TCCTCCGCTTATTGATATGC | |

جدول۲ - مراحل چرخه PCR برای تکثیر ژن *femA*

| چرخه‌های PCR | دما (درجه سانتیگراد) | زمان |
|---|---|---|
| واسرشت اولیه | ۹۵ | **۵ دقیقه** |
| مرحله واسرشت | ۹۵ | **٦۰ ثانیه** |
| مرحله اتصال | ۵۵ | **٦۰ ثانیه** |
| مرحله طویل شدن (۳۰ تکرار) | ۷۲ | **۹۰ ثانیه** |
| طویل شدن نهایی | ۷۲ | **۱۰ دقیقه** |

جدول ۳- پرایمرهای به کار رفته برای تکثیر

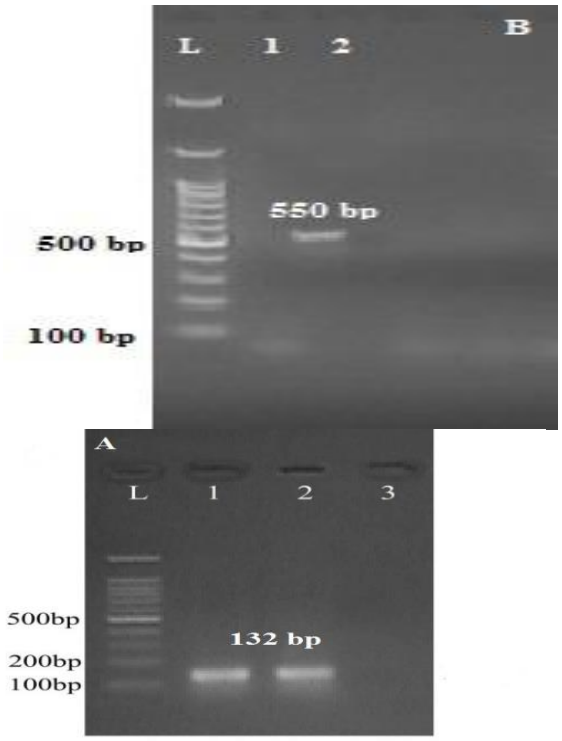
| ژن | (۵′- ۳′) توالی الیگونوکلئوتیدی | اندازه محصول PCR (جفت باز) | منبع |
|---|---|---|---|
| | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | | (۹) |
| | TCCTCCGCTTATTGATATGC | | |

آگار بررسی شد. برای این کار ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت آگار به صورت چمنی کشت داده شد و بعد از ایجاد چاهک، ۵۰ میکرولیتر کاروتنوئید استخراج شده در آن قرار داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۱±۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ تا ۷۲ ساعت قدرت مهاری عصاره کاروتنوئیدها با اندازه‌گیری قطر مهار رشد باکتری سنجیده شد. همچنین از دیسک پنیسیلین به عنوان کنترل مثبت و از بلانک دیسک به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. این روش دوبار برای هر عصاره کاروتنوئیدی به دست آمده از رودوتورلا بر روی ۲۵ جدایه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سویه استاندارد (ATCC ۲۵۹۲۳) انجام گرفت (۸) و نتایج به صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش گردید. همچنین کمترین غلظتی که باعث مهار رشد باکتری شده به عنوان MIC و کمترین غلظتی که باعث

مرگ باکتری شده است به عنوان MBC در نظر گرفته شد. از تست میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده رنگدانه مورد استفاده گردید.

## نتایج

در مجموع از ۱۰۰ نمونه شیر مشکوک به ورم پستان، ۲۵ مورد حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که در تست‌های استاندارد میکروبیولوژی به عنوان گونه *استافیلوکوس اورئوس* تأیید شدند. همچنین آزمون مولکولی (شناسایی ژن *femA*) نیز کاملاً با آزمون‌های بیوشیمیایی منطبق بود و در جستجوی ژن *femA* با استفاده از آزمون PCR همه جدایه‌ها از این نظر مثبت بودند و بعنوان گونه *استافیلوکوس اورئوس* شناخته شده و در الکتروفورز محصول PCR، باند ۱۳۲جفت باز را نشان دادند (تصویر ۱).




شکل ۱. نمونه‌ای از نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن femA (شکل A) و ژن ITS (شکل B) به منظور تائید تشخیص گونه استافیلوکوس اورئوس

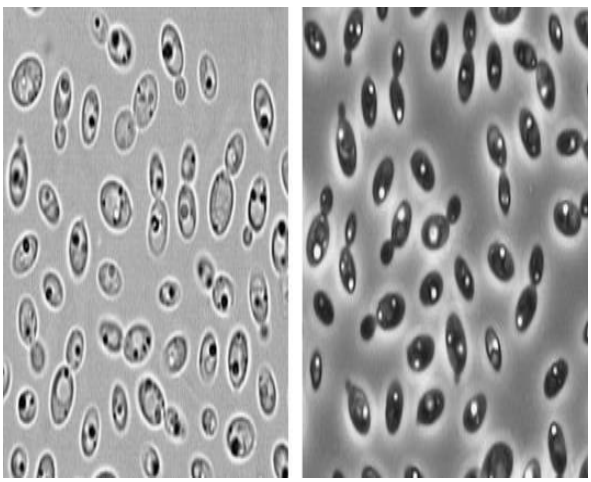
همچنین از ۱۰۰ نمونه شیر مشکوک به ورم پستان، یک مورد آلوده به مخمر رودوتورلا بود که با استفاده از تست-های استاندارد میکروبیولوژی به عنوان مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* تشخیص داده شد. جهت بررسی خصوصیات کلنی رودوتورلا، گونه مذکور در محیط پتیتو دکستروز آگار (Agar *Dextrose* Potato) کشت داده شد و به مدت ۲ روز در ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس کلنی‌ها از نظر اندازه، شکل، رنگ و حاشیه مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند. در این محیط، گونه رودوتورلا جدا شده دارای رنگدانه نارنجی بود که در تصویر ۲ نشان داده شده است.

شکل ۲- کلنی ٤٨ ساعته رودوتورلا گلوتینیس در محیط کشت پتیتو دکستروزآگار

در ادامه جدایه رودوتورلا جهت مطالعه میکروسکوپی مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت و اسمیر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی گردید (تصویر ۳). جهت شناسایی گونه رودوتورلا چند تست تکمیلی شامل تست اوره آز، هیدرولیز نشاسته و توانایی تخمیر گلوکز، فروکتوز، ساکارز انجام گرفت و نتایج نشان داد که جدایه مذکور اوره‌آز مثبت بوده و در مدت ۱۸ ساعت محیط کشت اوره را به رنگ زرد تبدیل کرد. همچنین این مخمر توانایی هیدرولیز نشاسته را نداشته اما قندهای ساکارز و گلوکز را مصرف کرده بود. همچنین در تأیید مولکولی، ژن ریبوزومی

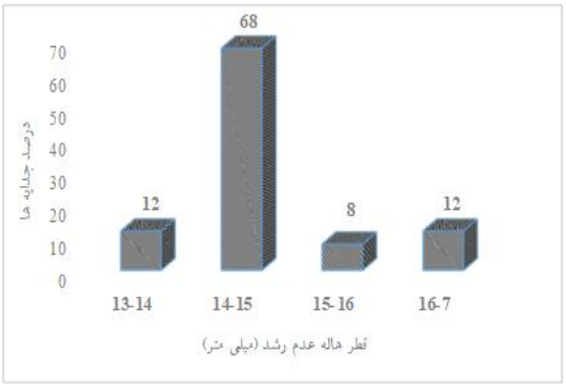
ITS با استفاده از آزمون PCR مورد جستجو و بررسی قرار گرفت که در الکتروفورز محصول PCR، باند مورد نظر ( bp ۵۵۰) دیده شد (تصویر ۱).

حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به رنگ دانه *رودوتورلا گلوتینیس* با استفاده از روش انتشار بر روی آگار مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت خلاصه در نمودار ۱ در چهار گروه بر اساس قطرهاله عدم رشد مشخص شده است. همچنان که مشاهده می‌شود همه جدایه‌ها نسبت به رنگدانه رودوتورلا دارای حساسیت نسبی بودند. طبق سیستم CLSI بر اساس اندازه قطر هاله عدم رشد، جدایه‌ها در دو گروه نیمه‌حساس و حساس تقسیم‌بندی شدند. در مجموع ۱۲ درصد جدایه‌ها به عنوان نیمه‌حساس (۱۲–۱۳ میلیمتر) و ۸۸ درصد جدایه‌ها حساس (بالای ۱۴ میلیمتر) به رنگ‌دانه در نظر گرفته شدند.

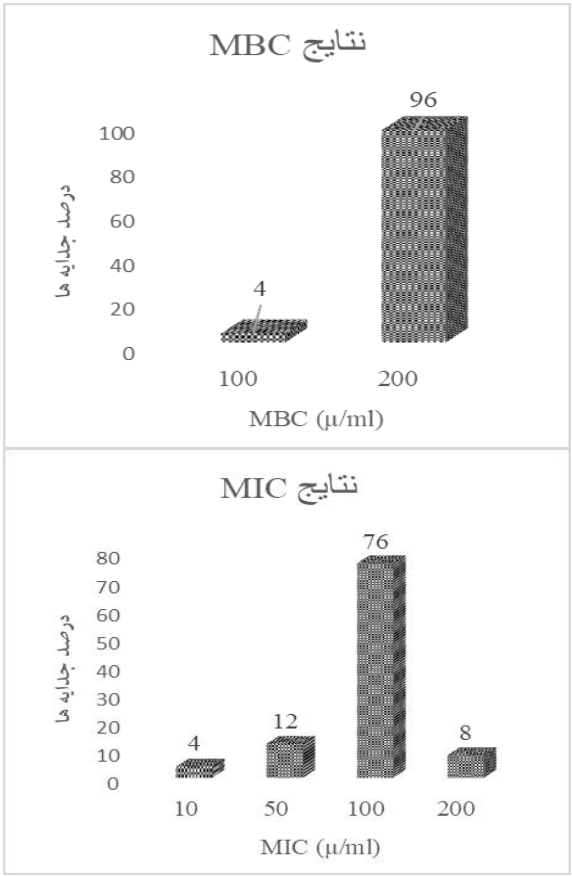


شکل ۳. تصویر میکروسکوپ نوری از *رودوتورلا گلوتینیس*

تست میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده رنگدانه مورد استفاده قرار گرفت و نتایج در نمودار ۲ آورده شده است. همانطوری که در این نمودار مشخص شده است، میزان MIC جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان بین ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر بود. نتایج تست میکرودایلوشن نشان داد که همه جدایه‌ها نسبت به رنگ‌دانه رودوتورلا حساس هستند. حداقل غلظت کشنده رنگدانه به جزء برای یک جدایه که ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود برای ۲۴ جدایه دیگر ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترگزارش گردید (نمودار ۲). به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از رنگدانه توانایی کشتن و از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان را دارا می‌باشد.




نمودار ۱– نتایج تست انتشار بر روی آگار




نمودار ۲– نتایج تست میکرودایلوشن براث برای تعیین میزان MIC و MBC

**بحث**

میکروارگانیسم‌ها از عوامل اصلی ایجاد کننده ورم پستان بالینی و تحت‌بالینی در گاوداری‌ها به حساب می‌آیند که در این میان *استافیلوکوکوس اورئوس* از متداولترین عامل میکروبی ایجاد کننده این بیماری می‌باشد. (۱۵) در مطالعه حاضر، جداسازی ۲۵ درصدی *استافیلوکوکس اورئوس* از موارد بالینی ورم پستان بالینی در گاوداری‌ها ، حاکی از اهمیت و نقش این باکتری در ایجاد ورم پستان را نشان می‌دهد. در مطالعه شکوهی و همکاران در سال ۲۰۱۷، مشخص شد که ۸ درصد از گاوهای مبتلا به ورم پستان آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده که نسبت به مطالعه ما از میزان پایین‌تری برخوردار بود.(۱۶) با این همه در بیشتر مطالعات شیوع بالایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین گاوهای مبتلا به ورم پستان در گاوداری‌های شهرهای ایران گزارش شده است. در این مورد Firozi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شهر شیراز، شیوع ۳۱ درصدی *استافیلوکوکوس اورئوس* ثبت گردید. (۸) و در مطالعه دیگری که توسط Moslemipour و همکاران در سال ۲۰۱۷ ارایه شده بود فراوانی ۹۱ درصدی *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین گاوهای مبتلا به ورم پستان گزارش شد. (۱۷) در مجموع نتایج حاکی از اهمیت این باکتری در ایجاد ورم پستان در گاوداری‌های صنعتی و سنتی در ایران می‌باشد که متاسفانه به دلیل افزایش مقاومت دارویی در بین جدایه‌های این باکتری منجر به متصویرات عدیده‌ای در دامپزشکی شده است. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها، موجب مقاومت روزافزون پاتوژن‌ها به این دسته از داروها شده است لذا محققان در جستجوی روش‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی جدید برای کنترل و کاهش مقاومت دارویی شده‌اند. یکی از ترکیبات ضد میکروبی جدید برای کنترل عفونت‌های باکتریایی استفاده از رنگ‌دانه‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها است که به دلیل نداشتن اثر مخرب بر سلول‌های یوکاریوتی توجه بیشتر محققان را به خود جلب کرده است که از آنها می‌توان به رنگدانه‌های کارتنوئیدی اشاره کرد.(۲) بر اساس مطالعات انجام گرفته، کاروتنوئیدها به علت خواص ضدعفونی‌کنندگی بالا بخش اساسی از تمام موجودات فتوسنتز کننده را تشکیل می‌دهند. با اینحال، وجود آنها به فتوسنتز کنندگانی همچون گیاهان، جلبک‌ها و سیانوباکترها محدود نمی‌شود، زیرا برخی از قارچ‌ها و باکتری‌های غیر فتوسنتزکننده نیز می‌توانند کاروتنوئیدها را تولید کنند. (۱۸) یکی از قارچ‌های تولید کننده رنگدانه کارتنوئید مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* است . (۱۹) جنس ردوتورلا در طبیعت فراوان است و می تواند از منابع مختلف از جمله هوا، خاک آب دریا، گیاهان، محصولات لبنی و محیط زیست خانگی (از جمله پرده های دوش، وان آب) جدا گردد.(۱٤) مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی جدا شده از رودوتورلا بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از ورم پستان بالینی گاو بود . در این پژوهش طبق نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری، رنگ استخراج شده از رودوتورلا بر رشد همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدارنده داشت و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، توانایی کشتن و از بین بردن این جدایه‌ها را داشت. مطالعات گسترده ای در زمینه اثر ضد میکروبی

رنگ‌دانه‌های میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام یافته است و تحقیقات حاکی از اثر کشندگی و بازدارندگی این ترکیبات بر علیه پاتوژن‌ها می‌باشد با اینهمه بیشتر مطالعات نشان دادند که باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بالایی به رنگ‌دانه‌های میکروبی داشتند.(۲۰) دلیل احتمالی مقاومت بالای باکتری‌های گرم منفی نسبت به-باکتری‌های گرم مثبت در مقابل ترکیبات ضد میکروبی از جمله رنگ‌دانه‌های میکروبی، حضور لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی در آنها می‌باشد. لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی، میتوانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره یا اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری های گرم منفی شود.(۲۱) دراین مورد یولمه و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که باکتریهای گرم منفی حساسیت کمتری نسبت به انواع گرم مثبت در مقابل رنگدانه *رودوتورولا گلوتینیس* داشتند.(۲۰) این محقق طی یک مطالعه دیگری بیان کرد که رنگدانه کارتنوئیدی *میکروکوکوس روزئوس* اثر مخرب قوی‌تری علیه گرم مثبت‌ها در مقایسه با گرم منفی‌ها دارند.(۲۰) مجموع می‌توان گفت که نوع باکتری و حضور ژن‌های مقاومت از جمله افلاکس پمپ‌ها که به صورت کلی علیه بسیاری از عوامل ضد میکروبی مقاومت ایجاد می‌کنند در مقدار MIC رنگدانه‌ها می‌تواند اثر داشته باشد هرچند تابه حال ایجاد مقاومت اختصاصی بر علیه رنگ‌دانه‌ها گزارش نشده است.(۲۲)

نتیجه گیری کلی

بررسی ها و نتایج بدست آمده نشان داد که علاوه بر اینکه *استافیلوکوکوس اورئوس* بعنوان یکی از عوامل مسبب اورام پستان در دامهای شیری بوده، بلکه مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* نیز میتواند خود بعنوان عامل ایجاد کننده ورم پستان باشد. بررسی های جامع تر در آزمون‌های مهاری نشان داد که با استفاده از رنگدانه استخراج شده از رودوتورولای جدا شده از نمونه ورم پستانی (*رودوتورولا گلوتینیس*)، اثرمهارکنندگی بر روی رشد استافیلوکوکوس کاملا مشهود بود. نتایج بدست آمده نشان داد که بیش از۹۲ درصد نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نمونه‌های ورم پستانی در حداقل غلظت ۱۰۰ میکروگرم و یا کمتر از آن با توقف رشد مواجه شده و رشد و تکثیر آنها کاملا مهار می گردد. همچنین در صورت استفاده از غلظت ۲۰۰ میکروگرم از رنگدانه بدست آمده میتوان نسبت به ازبین بردن و کشتن تمامی موارد باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های ورم پستان اقدام نمود. البته استفاده از این محصول در مقیاس تجاری نیازمند بررسی و مطالعه بیشتری است.

## فهرست منابع


1. Alni, RH., Mohammadzadeh, A., Mahmoodi, P)2018(. Molecular typing of Staphylococcus aureus of different origins based on the polymorphism of the spa gene: characterization of a novel spa type. 3 Biotech. 8, 1-7. https://doi.org/10.1007/s13205-017-1061-6.
2. Ruegg., PL. ) 2017(. 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci. 100, 10381-10397.
3. Cheng, WN., Han, SG. ) 2020(. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies,

and alternative treatments A review. Asian Austral J Anim Sci. 33, 1699. https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156

4. Derakhshani, H., Fehr, KB., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, HW., et al)2018(Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. J Dairy Sci. 101, 10605-25. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860
5. Sanna, C., Marras, L., Desogus, A., Marras, B., Montero, N., Bertolino, G., et al. ) 2021(. Evaluation of Rhodotorula spp. contamination in hospital environments. Environ Monit Assess. 193, 1-6. https://doi.org/10.1007/s10661-021-08908-3
6. Enshaeieh, M., Madani, M., Abdoli, A., Nahvi, I., Asgari, F. ) 2016 (. Optimization of SCO and xylitol production in the oleaginous yeast Rhodotorula mucilaginosa. Appl Biol.29, 5-21. https://dx.doi.org/10.22051/jab.2021.4192.0
7. Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H. ) 2007(. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Vet Pathol. 29,, 18-31

   https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224
8. Tabaee, M. In vitro antibacterial effects of marbofloxacin on microorganisms causing mastitis in cows. J Vet Res.65, 51-55
9. Hernández-Almanza, A., Montanez, JC., Aguilar-Gonzalez, MA., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, CN)2014(. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. Food Biosci. 5, 64-72. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007
10. Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, WM. ) 2000(. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 38,1032-1035. https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1032.1035.2000
11. Khanipour, E., Keramat, J., Shokrani, R. Determination of Optimum Conditions for Carotenoid Extraction from Tomatoes. 11, 289-296
12. Molineri, AI., Camussone, C., Zbrun, MV., Archilla, GS., Cristiani, M., Neder, V., et al. ) 2021(. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. Prev Vet Med. 10, 105261. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105261
13. Moazamian, E., Emami, A. ) 2018(. Antimicrobial effect of Serratia marcescens Pigment on the Multi-Drug Resistance Klebsiella Pneumoniae Isolates from Burn Wounds. Armaghane danesh. 23,499-515.
14. Sharma, N., Singh, N., Bhadwal, M. )2011 (. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. Asian Austral J Anim Sci. 24, 429-38. https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233.
15. Moslemipur., F, Mostafaloo, Y., Khanahmadi, A. ) 2016(. Survey of conformity between organoleptic and microbial culture techniques to diagnose cows mastitis and antibiogram test in milk of industrial and traditional herds. Res J Anim Sci.1, 51-56.
16. Shokohi, M., AHMADIZADEH, C., Kaveh, A. ) 2018(. Evaluation of bacterial causes of subclinical mastitis in dairy cattle of negine sabze makoo agro-industrial and animal husbandry complex. Vet Clin Pathol. 44, 379-388. https://doi.org/10.30495/JVCP.2020.1873924.1242
17. Novoveská, L., Ross, ME., Stanley, MS., Pradelles, R., Wasiolek, V., Sassi, J-F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. Mar Drugs. 17, 640. https://doi.org/10.3390/md17110640.
18. Colasuonno, P., Marcotuli, I., Blanco, A., Maccaferri, M, Condorelli, GE., Tuberosa,

R., et al .(2019). Carotenoid pigment content in durum wheat ( Triticum turgidum L. var durum(: An overview of quantitative trait loci and candidate genes. Front Plant Sci. 10, 1347. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01347

19. Martínez, JM., Delso, C., Aguilar, DE., Álvarez, I., Raso, J. (2020). Organic-solvent-free extraction of carotenoids from yeast Rhodotorula glutinis by application of ultrasound under pressure. Ultrason Sonochem.61, 104833. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104833
20. Yolmeh, M., Hamedi, H., Khomeiri, M. )2016(. Antimicrobial Activity of Pigments Extracted from Rhodotorula glutinis Against Some Bacteria and Fungi. Zahedan J Res Med Sci. 18, e4954. https://doi.org/10.17795/ZJRMS-4954
21. McKeegan, KS., Borges-Walmsley, MI., Walmsley, AR. )2002(. Microbial and viral drug resistance mechanisms. TIM. 10, s8-s14. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02(02429-0.
22. Wang, W., Zhai, Y., Cao, L., Tan, H., Zhang, R. )2016(. Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice )Oryza sativa L.(. Microbiol Res. 1, 1-8.