

The Effect of Carotenoid Produced by Rhodotorula mucilaginosa UIMC35 on Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, and Mucor hiemalis

Bahareh Mohammadi¹, Mahboobeh Madani^{1*}, Ali Mohammad Ahadi²

¹Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

²Department of Genetics, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

***Corresponding Author:**
Mahboobeh Madani,
Department of Microbiology,
Falavarjan Branch, Islamic
Azad University, Isfahan,
Iran.

Email:
mmadani66@gmail.com

Received: 31 May, 2016

Accepted: 28 Aug, 2016

Abstract

Background and Objectives: Carotenoids are an important group of natural pigments with specific applications as colorants, food supplements, and additives; they are also used in medicine, cosmetics, and biotechnological purposes. In this study, carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* UIMC35 and its antifungal effect on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Mucor hiemalis*, were investigated.

Methods: In this semi-experimental research, yeast was isolated from different natural sources and identified by macroscopic, microscopic, and biochemical tests. Then, yeast strain was identified using PCR technique. Carotenoids were extracted from the yeast strain by Davis method. After 48 hours, antifungal activity of the carotenoid, was determined against mold fungi according to growth inhibition percentage. The results were analyzed using estimated Kruskal-Wallis test.

Results: In this study, the isolated yeast strain was *Rhodotorula mucilaginosa* UIMC35. Growth inhibition percentage of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Mucor hiemalis*, by *Rhodotorula mucilaginosa* UIMC35 carotenoids was determined to be 76.19, 66.67, and 21.05, respectively.

Conclusion: According to the results of this study, *Rhodotorula mucilaginosa* UIMC35 isolated from soil in Isfahan, could produce high potency carotenoids and the extracted pigment had a significant inhibitory effect against the studied mold fungi. Therefore, further researches can provide the possibility of using *Rhodotorula* yeast in various fields, such as pharmacy, food Industry, and cosmetics.

Keywords: *Rhodotorula*; *Rhodotorula mucilaginosa*; Carotenoids, Polymerase chain reaction; Antifungal activity.

تأثیر کاروتنوئید تولیدشده، به وسیله رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 بر آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس

بهاره محمدی^۱، محبوبه مدنی^{۱*}، علی محمد احدی^۲

چکیده

زمینه و هدف: کاروتنوئیدها یک گروه مهم از رنگدانه‌های طبیعی با برنامه‌های کاربردی ویژه به عنوان رنگ، مکمل‌های غذایی و مواد افزودنی هستند، همچنین از آنها در پزشکی، لوازم آرایشی، بهداشتی و اهداف بیوتکنولوژی استفاده می‌شود. در این مطالعه تولید کاروتنوئید به وسیله رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 و اثر ضدقارچی آن بر آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس بررسی گردید.

روش بررسی: در این پژوهش نیمه تجربی، مخمر از منابع طبیعی مختلف، جداسازی و با آزمون‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی شناسایی شد. سپس سویه مخمر با استفاده از روش PCR مشخص گردید. استخراج کاروتنوئید از سویه مخمر به روش دیویس انجام شد. پس از ۴۸ ساعت، فعالیت ضدقارچی کاروتنوئید به دست آمده در برابر قارچ‌های کپکی براساس درصد مهار رشد قارچ تعیین گردید. نتایج با آزمون کراسکال والیس تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه سویه مخمری جداسازی شده، مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 بود. درصد مهار رشد قارچ‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس به وسیله رنگدانه به دست آمده از رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 به ترتیب: ۷۶/۱۹، ۶۶/۶۷ و ۲۱/۰۵ تعیین شد.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه، رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 جداسازی شده از خاک اصفهان، توانایی تولید کاروتنوئید با پتانسیل بالا را داشت و رنگدانه استخراج شده نیز دارای اثر مهارتی قابل ملاحظه‌ای نسبت به قارچ‌های کپکی مورد بررسی بود. بنابراین، انجام تحقیقات بیشتر می‌تواند امکان استفاده از مخمر رودوتورولا در زمینه‌های مختلف مانند داروسازی، صنایع غذایی و لوازم آرایشی را فراهم کند.

کلید واژه‌ها: رودوتورولا؛ رودوتورولا موسیلاژینوزا؛ کاروتنوئیدها؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، فعالیت ضدقارچی.

^۱گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

^۲گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محبوبه مدنی، گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

mmadani66@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Mohammadi B, Madani M, Ahadi AM. The effect of carotenoid produced by rhodotorula mucilaginosa UIMC35 on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Mucor hiemalis*. Qom Univ Med Sci J 2017;11(8):46-56. [Full Text in Persian]

مقدمه

مخمرها از رده بازیدیومیست و آسکومیست بوده و روش تکثیر غیرجنسی آنها جوانه زدن است (۱). مخمر رودوتورولا متعلق به خانواده کریپتوکوکاسه، زیرخانواده رودوتورولوده و شاخه بازیدیومایکوتا می باشد (۲، ۳). گونه های رودوتورولا، میکروارگانیسم های منتقله از راه هوا هستند که در گذشته به عنوان ساپروفیت و آلاینده های آزمایشگاهی در نظر گرفته می شدند (۴، ۵). این مخمرها هوازی بوده و دارای ویژگی های متابولیکی خاص مانند ظرفیت تولید گلیکوژن در فاز رشد، تولید مقدار زیادی چربی و رنگدانه کاروتنوئید در مرحله رشد ثابت می باشند (۶). مخمر رودوتورولا با توجه به تک سلولی بودن، نرخ رشد نسبتاً بالا، همچنین استفاده از محیط کشت های تخمیری ارزان قیمت؛ دارای مزیتی بالاتر از جلبک ها، قارچ ها و باکتری ها می باشد (۷). رودوتورولا، یک جنس آنامورفیک از مخمرهای هترو بازیدیومیستس بوده که توسط صفات متمایز کننده ای مانند فقدان بالیستوکنیدیا و فقدان توانایی تخمیر ترکیباتی مانند نشاسته و گزیزلوز در تمام سلول های هیدرولیز کننده مشخص می شود (۸). در بین رنگدانه ها، کاروتنوئیدها به طور گسترده ای در طبیعت توزیع شده و مقدار آنها در حال حاضر، بالغ بر ۶۰۰ مولکول است (۹). باوجود در دسترس بودن انواع کاروتنوئیدهای طبیعی و مصنوعی؛ اینک به دلیل مشکلات فصلی و تغییرپذیری جغرافیایی در منابع گیاهی، علاقه دو چندان نسبت به منابع میکروبی رنگدانه ها وجود دارد. رنگدانه هایی چون کاروتنوئیدها، آنتراکونینون و کلروفیل به وسیله مخمرها، قارچ ها، باکتری ها و جلبک ها تولید می شوند. علاوه بر این، در حال حاضر علاقه صنعتی به تدریج در حال تغییر از کاروتنوئیدهای زردمانند بتاکاروتن و لوتئین به سمت کتوکاروتنوئیدهای نارنجی- قرمز بوده که به طور قابل ملاحظه ای با ارزش تر از تورولا رودین و تورولن می باشند و هیچ گونه منبع گیاهی یا حیوانی قابل بهره برداری تجاری برای آنها وجود ندارد (۱۰). تولید کاروتنوئید، نوع و غلظت رنگدانه های مختلف که کاروتنوئیدها را تشکیل می دهند؛ به گونه، سویه، ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت و شرایط زیست محیطی بستگی دارد (۱۱). مطالعات نشان داده است رژیم غذایی کاروتنوئیدها باعث مبارزه با انواع مختلفی

از سرطان ها و سایر بیماری ها مانند بیماری های قلبی - عروقی، آب مروارید و دژنراسیون ماکولار وابسته به سن به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی و عملکرد پیش ساز ویتامین A می شود (۸، ۱۲). تولید رنگدانه کاروتنوئید توسط گونه های رودوتورولا، از سال ۱۹۶۳ شروع و بررسی گردید و در سالهای اخیر در برنامه های کاربردی گسترده ای به عنوان بیوکنترل، به منظور کاهش بیماری های گیاهی ناشی از پاتوژن های قارچی شناخته شده است (۱۳، ۱۴). کنترل بیولوژیک پاتوژن های گیاهی توسط میکروارگانیسم ها با روش های غیرشیمیایی، یک روش شناخته شده سازگار با محیط زیست و مؤثر در درمان بیماری ها می باشد. در حال حاضر با توجه به اثرات مخرب آفت کش های شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی؛ توجه به عوامل کنترل بیولوژیک، به سرعت در حال افزایش است. از آنجا که مخمرها می توانند بسیاری از مواد فعال زیستی مانند پروتئین ها، اسیدهای آمینه، ویتامین ها و غیره را تولید کنند مورد توجه زیادی قرار گرفته اند (۱۵). موفقیت های قابل توجهی نیز با استفاده از آنتاگونیست های میکروبی برای کنترل انواع بیماری میوه ها و سبزیها پس از برداشت به دست آمده است. رودوتورولا موسیلاژینوزا به طور مؤثری در آزمایشگاه برای کنترل کپک آبی رنگ و کپک خاکستری در میوه سیب گزارش شده است (۱۶، ۱۷).

این تحقیق با هدف یافتن مخمر بومی، مناسب با تولید قابل قبول کاروتنوئید و بررسی اثر ضدقارچی کاروتنوئید تولید شده بر علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور میمالیس انجام شد.

روش بررسی

تعداد ۱۵۰ نمونه مخمر از محیط های مختلف (شامل: خاک، لجن، گیاهان و گلها) در استان اصفهان، تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. هر نمونه به طور جداگانه به ارلن حاوی ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل، وارد و ارلن ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰ بر روی شیکر تکان داده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محتویات هر ارلن، به طور جداگانه به پلیت حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) انتقال داده شد و پلیت ها به مدت ۴۸

ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در ادامه، کلنی‌های جدا شده بر روی پلیت، براساس مورفولوژی متفاوت، خالص سازی شدند (۱۸).

مخمرهای مولد کاروتنوئید بر روی محیط‌های کشت جامد، ایجاد کلنی‌های صورتی تا قرمز می‌کنند که بسته به میزان کاروتنوئید تولیدی؛ شدت رنگ کلنی متغیر است. جهت بررسی خصوصیات کلنی روی محیط جامد، از محیط پتیتو دکستروز آگار استفاده شد. تلقیح مخمرها روی سطح محیط در شرایط استریل، انجام و به مدت ۲ روز در ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس کلنی‌ها از نظر اندازه، شکل، رنگ و حاشیه مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند (۱۹).

جهت مطالعه میکروسکوپی مخمرها، از کشت ۲۴ ساعته برای رنگ آمیزی استفاده گردید و اسمیرها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند (۱۹).

خصوصیات بیوشیمیایی مخمرها، نقش مهمی در شناسایی آنها بازی می‌کند. با توجه به کلید شناسایی مورد استفاده، با چند تست تکمیلی (شامل: تست اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته و توانایی تخمیر هیدرات‌های کربن)؛ شناسایی گونه‌های جداسازی شده انجام گرفت (۱۸). سویه‌های مخمری مولد کاروتنوئید، به کمک تعیین توالی قطعه‌ای از ژنوم ریبوزومی شناسایی شدند. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش مربوط به نواحی بینایی درونی نسخه‌برداری شده (ITS) بود. به منظور استخراج DNA، ابتدا یک لوپ باکتریولوژی (حدود ۱۰ میلی‌متر مکعب) از کلنی تازه برداشته شد و به تیوب ۱/۵ میلی‌تری اپندرف منتقل، سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز تریس با pH=۸ (۱۰۰ میلی‌مولار)، EDTA با pH=۸ (۱۰ میلی‌مولار)، NaCl (۱۰۰ میلی‌مولار)، SDS (۱٪)، Triton X-100 (۲٪)، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل - کلروفرم (۱:۱) و ۳۰۰ میکرولیتر ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۹:۲۸:۱ و حدود ۳۰۰ میکرولیتر گلوله‌های شیشه‌ای به قطر یک میلی‌متر اضافه گردید، سپس عمل سانتریفوژ در ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ انجام شد و مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. در ادامه، پس از سانتریفوژ مجدد، مایع رویی را به تیوب جدید انتقال داده و هم حجم آن، ۲- پروپانول و ۱٪ حجم استات سدیم ۳ مولار pH=۵/۲، اضافه و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری،

در ۲۰- درجه سانتیگراد، به مدت ۱۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس بعد از شست‌وشوی رسوب حاصله با ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه، در نهایت در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. قطعه موردنظر با استفاده از پرایمرهای ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') به عنوان پرایمر رو به جلو و ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') به عنوان پرایمر برگشتی بررسی گردید.

واکنش PCR با شرایط دمایی ۳۰۰ ثانیه، واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، طولی سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت، طولی شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰۰ ثانیه انجام شد. درجه خلوص و اندازه نسبی محصول PCR بر روی ژل آگارز، ۱/۵٪ تعیین گردید. تعیین توالی توسط شرکت فراپژوه انجام گرفت. در نهایت، توالی به دست آمده در سایت NCBI جستجو شد تا جنس و گونه مورد نظر مشخص گردد (۲۰).

به منظور آماده سازی تلقیح، یک لوپ مخمر ۲۴ ساعته، از روی محیط کشت اسلنت YM آگار (عصاره مخمر ۰/۳ گرم برلیتر، عصاره مالت ۰/۳ گرم برلیتر، پیتون ۰/۵ گرم برلیتر، گلوکز ۱۰ گرم برلیتر و آگار ۲۰ گرم برلیتر) برداشته شد و به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت YM براث، منتقل گردید و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد و ۲۰۰rpm نگهداری شد. سپس ۳ میلی لیتر از محیط کشت YM براث به ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط MMS {گلوکز (۱۰ گرم برلیتر)، سولفات آمونیوم (۱ گرم برلیتر)، عصاره مخمر (۱ گرم برلیتر)، $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ (۲ گرم برلیتر) و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۱ گرم برلیتر)} منتقل و در ۲۵ درجه سانتیگراد، pH=۶ (بافر ۰/۱ مولار پتاسیم هیدروژن فسفات) به مدت ۷۲ ساعت در ۲۰۰rpm ($A_{600}=0.5-0.75$, 10^7 cells/ml) نگهداری شد (۲۱، ۲۳).

سلول‌های مخمری به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm، سانتریفوژ و ۳ بار عمل شست‌وشو انجام گرفت، سپس بیومس به دست آمده مطابق با روش دیویس ابتدا در ۷۰- درجه سانتیگراد به مدت

کشت داده شدند. نمونه مشابه از هریک از قارچ‌های کپکی، تهیه و در مرکز پلیت حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار بدون رنگدانه کشت شدند. جهت مقایسه نیز از محیط حاوی آمفوتریسین B به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نمونه‌های قارچ کپکی در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری شدند و قطر قارچ رشد کرده در هر دو پلیت برحسب میلی‌متر، اندازه‌گیری و نسبت مهار رنگدانه و آمفوتریسین B با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. آزمایشها ۳ بار تکرار شدند (۲۷).

$$\text{Inhibition Ratio (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: قطر کلنی قارچ در پلیت کنترل (میلی‌متر)؛

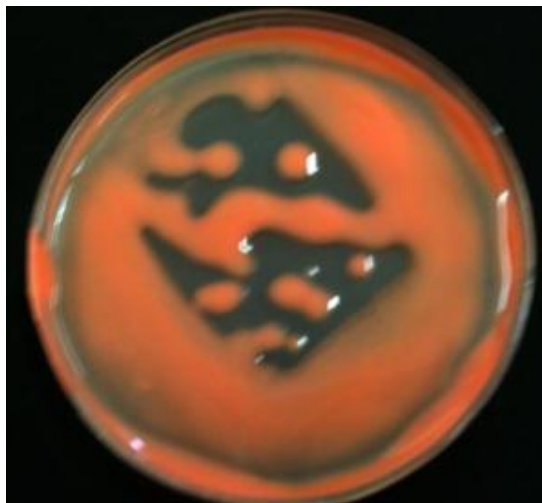
B: قطر کلنی قارچ در پلیت حاوی رنگدانه یا آمفوتریسین (میلی‌متر).

یافته‌ها

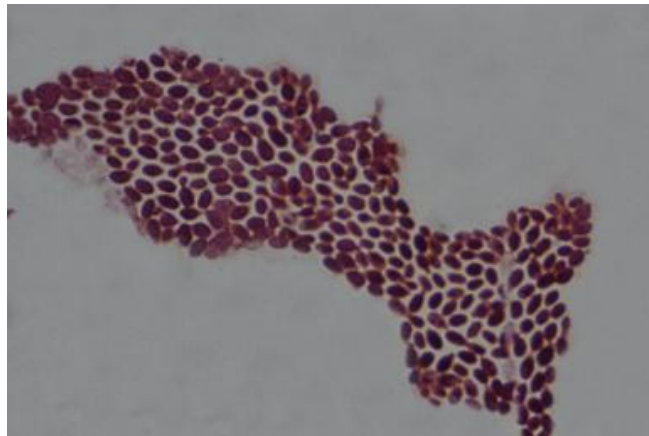
کلنی‌های مخمر رودوتورولا در محیط کشت پتیتو دکستروز آگار؛ نرم، صاف و مرطوب و معمولاً به صورت مرجانی، با قطری حدود ۵-۳ میلی‌متر بودند. رنگ کلنی از رنگ کرم تا نارنجی، قرمز، صورتی و زرد متفاوت بود (شکل شماره ۱) و به شکل بیضی، برخی با چند جوانه قطبی همراه با پسودوهایف مشاهده شدند (شکل شماره ۲). براساس تست‌های بیوشیمیایی، مخمر رودوتورولا از نظر اوره، گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز و دکستروز؛ مثبت و از نظر نشاسته، اینوزیتول، لاکتوز و رامنوز؛ منفی بود.

۲۴ ساعت و پس از آن در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در نهایت، سلول‌ها با دور ۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه ۳ بار با آب مقطر، شست‌وشو و سانتریفوژ شدند (۲۳). در ادامه، اسید کلریدریک یک نرمال اضافه و در بن‌ماری ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت. حذف اسید اضافی از طریق شست‌وشو انجام شد، سپس سلول‌ها در محلول استون و متانول (۱:۱) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. عصاره استون و متانول به وسیله قیف جداکننده به پترولیوم اتر سبک (۶۰-۴۰ درجه سانتیگراد)، منتقل و ۳ بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند (۲۴). مقدار جذب ماکزیمم و ضریب جذب در فاز پترولیوم به ترتیب $\lambda_{\max} = 485$ و $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2680$ گزارش گردید (۲۵، ۲۶).

سویه قارچ‌های کپکی (آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC 1022، آسپرژیلوس فلاووس PTCC 5004 و موکور هیمالیس PTCC 50292) مورد استفاده در این تحقیق، از بانک میکروبی آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، تهیه و استفاده شد. برای بررسی درصد مهار قارچ کپکی در محیط کشت حاوی رنگدانه کاروتنوئید به روش آگار دایلوژن، در ابتدا محیط کشت سابورو دکستروز آگار و رنگدانه به نسبت ۲ به ۱، تهیه شد، سپس با استفاده از پیت پاستور استریل، مقاطعی به قطر ۶ میلی‌متر از نمونه قارچ‌های کپکی ۴۸ ساعته (آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس) که بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار رشد کرده بودند، برداشته و در مرکز پلیت حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار و رنگدانه،



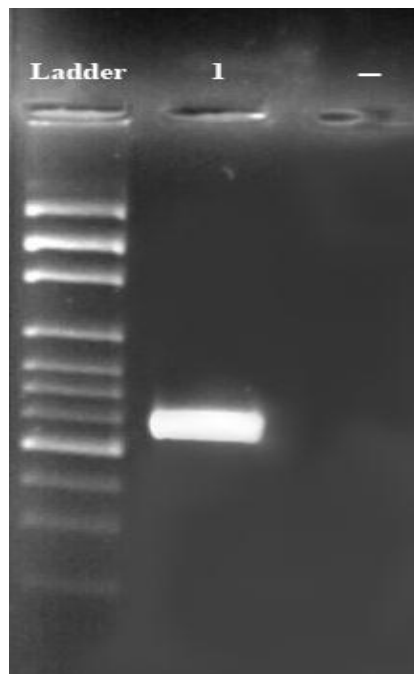
شکل شماره ۱: کلنی‌های مخمر رودوتورولا بر روی محیط کشت پتیتو دکستروز آگار.



شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپی مخمر رودوتورولا پس از رنگ آمیزی.

در این بررسی را نشان می‌دهد که طولی حدود ۷۰۰ جفت باز دارد. پس از تعیین توالی و مقایسه در سایت NCBI، ایزوله جداسازی شده به عنوان رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 مشخص گردید.

طول قطعات به دست آمده با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 در مخمرهای مختلف، متفاوت بود. در نتیجه از این پرایمرها می‌توان برای شناسایی مخمرها استفاده کرد. شکل شماره ۳ تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR مخمر جداسازی شده



شکل شماره ۳: تصویر حاصل از ژل الکتروفورز محصول PCR سویه جداسازی شده.

ستون Ladder مربوط به نشانگر مولکولی (۱۰۰bp)؛ ستون ۱ مربوط به رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 (۷۰۰bp) و ستون منفی، کنترل منفی است.

کاروتنوئید به عنوان گزینش اصلی جهت ادامه کار انتخاب شد. کاروتنوئید در بالاترین لایه، در فاز پترولیوم اتر به خوبی حل شد (شکل شماره ۴).

بعد از شناسایی مخمرهای جداسازی شده، مخمرهایی که دارای کلنی با شدت رنگ بیشتری بودند، انتخاب شدند و پس از سنجش تولید کاروتنوئید براساس بیشترین OD، مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 با بیشترین میزان تولید



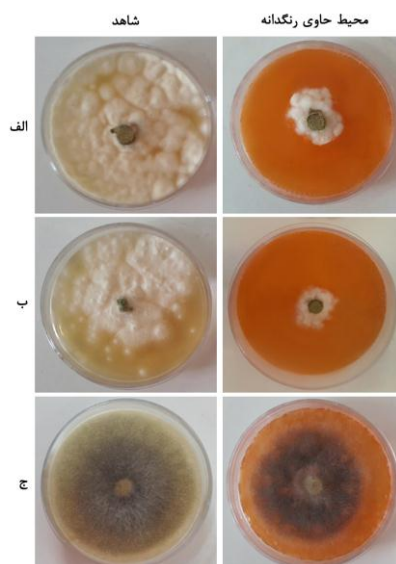
شکل شماره ۴: تصویر حاصل از انحلال کاروتنوئید در فاز پترولیوم اتر.

رنگدانه به دست آمده از مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا
UIMC35 در محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی رنگدانه
کاروتنوئید پس از ۴۸ ساعت، قادر به مهار قارچ‌های کپکی

جدول: نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر کلنی (میلی‌متر) قارچ‌ها بر روی محیط کشت حاوی رنگدانه، پس از ۴۸ ساعت

نسبت مهار آمفوتریسین B	نسبت مهار کاروتنوئید	آمفوتریسین B میانگین $\pm$ انحراف معیار	کاروتنوئید میانگین $\pm$ انحراف معیار	شاهد میانگین $\pm$ انحراف معیار	سویه قارچی
۸۵/۷۱	۷۶/۱۹	۶ $\pm$ ۱	۱۰ $\pm$ ۱/۷۳	۴۲ $\pm$ ۱	۱
۸۳/۳۳	۶۶/۶۷	۵ $\pm$ ۱	۱۰ $\pm$ ۱	۳۰ $\pm$ ۱	۲
۵۷/۸۹	۲۱/۰۵	۱۶ $\pm$ ۱	۳۰ $\pm$ ۲/۶۵	۳۸ $\pm$ ۱	۳

(۱) آسپرژیلوس فومیگاتوس، (۲) آسپرژیلوس فلاووس، (۳) موکور هیمالیس.



شکل شماره ۵: قطر کلنی (میلی‌متر) قارچ‌ها بر روی محیط کشت حاوی رنگدانه و شاهد پس از ۴۸ ساعت.
(الف) آسپرژیلوس فومیگاتوس، (ب) آسپرژیلوس فلاووس، (ج) موکور هیمالیس.

بحث

میکروارگانسیم‌های مولد کاروتنوئید به دلیل چرخه زندگی کوتاه، سرعت رشد بالا و توانایی استفاده از منابع غذایی مختلف؛ مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند. از طرفی، به دلیل اینکه شرایط محیط کشت و محیط پیرامون بر ویژگی‌های مورفولوژیک اثر می‌گذارد، تنها از طریق تفاوت در رنگ و شکل کلنی‌ها روی محیط کشت نمی‌توان شناسایی در حد گونه را انجام داد. بنابراین، تمایل زیادی به استفاده از تکنیک‌های مولکولی، به دلیل دقت و اعتبار بیشتر نسبت به روش‌های شناسایی قدیمی‌تر وجود دارد (۲۹). Margesin و همکاران با شناسایی گونه‌های مخمری جنس رودوتورولا جدا شده از محیط‌های کوهستانی با استفاده از روش PCR، نشان دادند رودوتورولا سیکروفیلا قادر به رشد در دمای بالاتر از ۱۵ درجه سانتیگراد نیست؛ در حالی که رودوتورولا سیکروفنولیکا و رودوتورولا گلاسیالیس در حضور فنل به‌عنوان تنها منبع کربن در ۱۰ درجه سانتیگراد قادر به رشد هستند (۳۰). در مطالعه Mokhtari و همکاران، گونه‌های مخمری جنس رودوتورولا جدا شده از میوه سیب با استفاده از روش PCR شناسایی شدند. از ۳۲ مخمر جدا شده از میوه سیب، ۴ جدایه متعلق به جنس رودوتورولا بود که سه گونه آن زودوتورولا موسیلاژینوزا و یک گونه رودوتورولا گلوتینیس گزارش شد (۱۸). در مطالعه حاضر، محصول PCR، و ایزوله جداسازی شده از خاک مورد تحقیق، به‌وسیله پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 با روش الکتروفورز بررسی گردید. نتایج تعیین توالی پس از بررسی و تصحیح کروماتوگرام در سرور BLAST سایت NCBI از نظر همولوژی، بررسی و گونه رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 شناسایی شد. در سالهای اخیر، مخمر رودوتورولا در برنامه‌های کاربردی گسترده‌ای به‌عنوان بیوکنترل و زمینه‌های دیگر مطرح شده است. مخمر زودوتورولا مدت طولانی است که به‌طور بالقوه به‌منظور کاهش بیماری‌های گیاهی ناشی از پاتوژن‌های قارچی شناخته شده است (۱۵،۶). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد به‌صورت تجاری، قارچ‌کش‌های موجود گرده‌افشانی را کاهش می‌دهند و باعث ناهنجاری در میوه و سبزی می‌شوند. استفاده از قارچ‌کش‌های مؤثر اغلب با توسعه گونه‌های مقاوم در برابر عوامل

بیماری‌زا، کاهش یافته‌اند. علاوه بر این، نگرانی‌های عمومی و محدودیت‌های قانونی در مورد حضور باقی‌مانده قارچ‌کش‌ها در محصولات کشاورزی، نیاز به یافتن روش‌های جایگزین برای کنترل بیماری را تأکید می‌کند. عوامل بیوکنترلی میکروبی، پتانسیل زیادی به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌ها برای کنترل پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ها و سبزیها دارند که یکی از این عوامل، استفاده از مخمر رودوتورولا است (۳۱). Dahui و همکاران با بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره SC-CO₂ به‌دست آمده از ریشه گیاه اکیناسه آنگوستیفولیا بر روی بوتریتیس سینرا به روش آگار دایلوژن، مهار رشد بوتریتیس سینرا را در محیط پتیتو دکستروز آگار حاوی SC-CO₂ نشان دادند (۲۷). Senhaji و همکاران در مطالعه خود بیان کردند عصاره استخراج شده از آستریکوس ایمبریکاتوس دارای فعالیت ضدقارچی بوده و ۱۰۰٪ قادر به مهار رشد بوتریتیس سینرا به روش آگار دایلوژن می‌باشد (۲۸). در پژوهش حاضر، رنگدانه کاروتنوئیدی به‌دست آمده از مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35، به دلیل داشتن وزن مولکولی زیاد، همچنین نامحلول بودن در آب؛ قادر به نشر در محیط کشت نبود. بنابراین، روش چاهک و دیسک قابل انجام نبود. همچنین در روش MIC به دلیل اینکه رنگدانه و محیط، دو فاز جدا تشکیل دادند و نمونه قارچ‌های مورد بررسی در تماس با رنگدانه نبود، این روش هم مناسب نبود. بنابراین، روش اندازه‌گیری قطر قارچ رشد کرده در محیط حاوی رنگدانه به روش آگار دایلوژن، بهترین روش برای بررسی فعالیت ضدقارچی رنگدانه استخراج شده بود.

براساس نتایج جدول شماره ۱، میانگین قطر کلنی در هر سه قارچ مورد بررسی برای نمونه‌های گروه شاهد، بیشتر از کاروتنوئید و آمفوتریسین B بوده است. برای مقایسه مقدار قطر کلنی از آزمون کراسکال والیس استفاده شد و براساس نتایج این آزمون در هر سه قارچ، اختلاف معنی‌داری بین مقدار قطر کلنی بین سه گروه شاهد، کاروتنوئید و آمفوتریسین B مشاهده گردید ($p < 0.05$). براساس نتایج آزمون‌های تعقیبی در قارچ‌های آسپرژیلوس فومیگانیوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس؛ مقدار قطر کلنی در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از مقدار قطر کلنی

رشد قارچ‌های آسپرژیلوس فومیگانیوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس را نشان داد. با توجه به اثرات جانبی ناشی از مصرف آمفوتریسین B در بیماران و با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق؛ به نظر می‌رسد در آینده بتوان از کاروتنوئید تولید شده به وسیله مخمر بومی اصفهان، در درمان بیماری‌های ناشی از این قارچ‌ها استفاده کرد. همچنین از سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 جدا شده در این تحقیق و کاروتنوئید تولید شده به وسیله آن می‌توان در کنترل بیماری‌های گیاهی ناشی از قارچ‌های کپکی فوق‌الذکر استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد رنگدانه استخراج شده از سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35، دارای فعالیت ضدقارچی بر علیه قارچ‌های آسپرژیلوس فومیگانیوس، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس می‌باشد. لذا امکان استفاده از آن در درمان بیماری‌های قارچی ناشی از قارچ‌های کپکی مزبور باید مورد توجه قرار گیرد.

پیشنهاد می‌گردد با ایجاد جهش در مخمر جداسازی شده، میزان تولید رنگدانه افزایش یابد و اثر ضدقارچی و ضدباکتریایی رنگدانه به دست آمده بر روی سایر قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزا بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد (با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۲۱۰۱۰) می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان انجام شد. بدین وسیله از هیئت رئیسه دانشگاه، مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌شود.

در گروه‌های کاروتنوئید و آمفوتریسین B بود ($p < 0.05$). قطر کلنی در گروه کاروتنوئید نیز به طور معنی‌داری بیشتر از قطر کلنی در گروه آمفوتریسین B بود ($p < 0.05$).

Amal و همکاران با بررسی فعالیت ضد میکروبی رنگدانه ملانین تولید شده به وسیله استرپتومایسس گزارش کردند رنگدانه دارای فعالیت ضد میکروبی علیه آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، ماکرومینا فاسئولی، هلمین تسپوریوم تورسیکاس، فوزاریوم اکسیسپوریوم، دیپلودیا اوریزا و رودوتورولا مینوتا می‌باشد. همچنین بیشترین و کمترین مهار به ترتیب مربوط به هلمین تسپوریوم تورسیکاس با ۲۱ میلی‌متر و کمترین متعلق به آسپرژیلوس ترئوس و ماکرومینا فاسئولی با ۱۵ میلی‌متر بود (۳۲). Deepshikha و همکاران نیز با بررسی فعالیت ضدقارچی رنگدانه تولید شده به وسیله تریکودرما ویرنس، نشان دادند رنگدانه دارای فعالیت ضدقارچی علیه آلترناریا آلترناتا می‌باشد (۳۳).

همچنین Jiang و همکاران در بررسی فعالیت ضدقارچی باسیلوس سوبتیلیس گزارش کردند باسیلوس سوبتیلیس سبب مهار آلودگی اکراتوکسین A تولید شده به وسیله آسپرژیلوس کربوناریوس و سایر قارچ‌ها در پوسیدگی انگور می‌شود (۳۴). مولکول‌های کاروتنوئید عامل افزایش کیفیت مواد غذایی انسان و دام هستند. همچنین این مولکول‌ها در زمینه‌های مختلف نظیر پزشکی، نساجی و آرایشی کاربرد دارند. سرعت رشد بالای مخمرها، کاهش زمان تولید توسط آنها و نیاز به مواد اولیه کمتر؛ اهمیت ردیابی این ارگانیس‌ها را نشان می‌دهد. لذا یافتن مخمرهای بومی با تولید قابل ملاحظه کاروتنوئید و افزایش تولید آنها با استفاده از بیوتکنولوژی، حایز اهمیت است. در این پژوهش سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا UIMC35 جداسازی شده، قابلیت تولید کاروتنوئید را داشت و کاروتنوئید تولید شده نیز توانایی مهار

References:

1. Kutty S, Philip R. Marine yeasts - a review. *Yeast* 2008;25(7):465-83.
2. Silva BCM, Gambale W, Auler ME, Santos JI, Lagonegro ER, Paula CR. *Rhodotorula rubra* causing skin lesions in a HIV positive patient. *J Mycol Med* 2001;11(3):149-52.
3. Abu-Elteen KH, Hamad MA. Changing epidemiology of classical and emerging human fungal infections: A review. *Jordan J Biol Sci* 2012;5(4):215-30.
4. Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, Goldani LZ. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula fungemia* in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 2006;43(6):60-63.
5. Bhattacharyya S, Shivaprakash MR, Chakrabarti A, Sharma N. Foot bleb infection due to *Rhodotorula mucilaginosa* in a diabetic patient. *Biomed Res* 2012;23(4):577-9.
6. Almanza H, Montanez JC, Aguilar-González MA, Avila CM, Herrera R, Aguilar CN. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci* 2013;52:64-72.
7. Malisorn C, Suntornsuk W. Optimization of beta-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresour Technol* 2008;99(7):2281-7.
8. Naghavi FS, Hanachi P, Soudi MR, Saboor A. The capability of *Rhodotorula slooffiae* to produce carotenoid. *Zahedan J Res Med Sci* 2015;17(5):52-56.
9. Bnzatto D, Freitas LA, Mutton MJR. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2013;33(1):14-8.
10. Latha BV, Jeevaratnam K. Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source. *Global J Biotechnol Biochem* 2010;5(3):166-74.
11. El-Banna AA, El-Razek AM, El-Mahdy AR. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food Nutr Sci* 2012;3(1):64-71.
12. Chanchay N, Sirisansaneeyakul S, Chaiyasut C, Poosaran N. Conference Proceedings Optimal conditions for carotenoid production and antioxidation characteristics by *Rhodotorula rubra*. *World Academic Sci Eng Technol*; 2012. p. 68.
13. Joshi VK, Attri D, Bala A, Bhushan S. Microbial pigment. *Indian J Biotechnol* 2003;2:362-9.
14. Zhang H, Ma L, Turner M, Xu H, Dong Y, Jiang S. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chem* 2009;117(4):621-6.
15. Haggag WM. Antifungal compounds produced by *Rhodotorula glutinis* and applications as biocontrol. *Adv Environ Biol* 2013;7(1):156-8.
16. Alavi Fard F, Etebarian HR, Sahebani N. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Iran J Plant Pathol* 2012;48(1):17-26.
17. Seifi Z, Zarei Mahmoudabadi A, Hydrinia S. Isolation, identification and susceptibility profile of *Rhodotorula* species isolated from two educational hospitals in Ahvaz. *Jundishapur J Microbiol* 2013;6(6).
18. Mokhtari M, Etebarian HR, Razavi M, Heydari A, Mirhendi H. Identification of yeasts isolated from varieties of apples and citrus using PCR-fragment size polymorphism and sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region. *Food Biotechnol* 2012;26(3):252-65.
19. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogen bacteria. St. Paul, MN: Australian Plant Pathology; 2001.

20. Mokhtari M, Etebarian HR, Mirhendi SH, Razavi M. Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8s rDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Arch Biol Sci* 2011;63(1):79-88.
21. Maldonade IR, Scamparini ARP, Rodriguez-Amaya DB. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from campinas region, brazil. *Brazilian J Microbiol* 2007;38(1):65-70.
22. Maldonade IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini ARP. Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Brazilian J Microbiol* 2012;43(1):109-15.
23. Naghavi FS, Hanachi P, Soudi MR, Saboora A, Ghorbani A. Evaluation of the Relationship between the incubation time and carotenoid production in *rhodotorula slooffiae* and *R. Mucilaginosa* isolated from leather tanning wastewater. *Iran J Basic Med Sci* 2013;16(10):1114-8.
24. Latha BV, Jeevaratnam K, Murali HS, Manja KS. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian J Biotechnol* 2005;4:353-7.
25. Libkind D, Pérez P, Sommaruga R, Diéguez Mdel C, Ferraro M, Brizzio S, et al. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(3):281-6.
26. Moliné M, Flores MR, Libkind D, Diéguez Mdel C, Farías ME, van Broock M. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: The role of torularhodin. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9(8):1145-51.
27. Dahui L, Zaigui W, Yunhua Z. Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis of their constituents using gas chromatography-mas spectrometry (GC-MS). *J Med Plant Res* 2011;5(23):5605-5610.
28. Senhaji B, Hmamou D, Salghi R, Zarrouk A, Chebli B, Zarrok H, et al. *Asteriscus imbricatus* extracts: Antifungal activity and anticorrosion inhibition. *Int J Electrochem Sci* 2013;8(2013):6033-46.
29. Yamamoto N, Amemiya H, Yokomori Y, Shimizu K, Totsuka A. Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am J Enol Vitic* 1991;42(4):358-63.
30. Margesin R, Fonteyne PA, Schinner F, Sampaio JP. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57(pt 9):2179-84.
31. Zhang H, Wang L, Dong Y, Jiang S, Cao J, Meng R. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biol Control* 2007;40(2):287-92.
32. Amal AM, Abeer KA, Samia HM, Nadia AH, Ahmed KA, El-hennawi HM. Selection of pigment (melanin) production in *Streptomyces* and their application in printing and dyeing of wool fabrics. *Res J Chem Sci* 2011;1(5):22-8.
33. Sharma D, Charu G, Sunita A, Nitika N. Pigment extraction from fungus for textile dyeing. *Indian J Fibreand Textile Res* 2012;37(1):68-73.
34. Jiang C, Shi J, Liu Y, Zhu C. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control* 2014;35(1):41-48.