مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

بررسی آلاینده‌های میکروبی در اسپان قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) با استفاده از راهکار متاژنومیکس

نوع مقاله: پژوهشی

شهناز شاهی[۱]، کلثوم اینانلو راحتلو*[۲]، محمد علی آموزگار[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه زیست شناسی، پردیس بین المللی کیش دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲-استادیار گروه سلولی و ملکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، ایران

۳-استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، ایران

inanloo@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۴

صفحه ۷۸-۶۳

چکیده

تولید قارچ مدلی از اقتصاد چرخشی است. از محصولات جانبی کشاورزی مانند کلش گندم و کود مرغ برای تولید مواد غنی از پروتئین و مواد مغذی استفاده می‌شود. مهم‌ترین قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* است که عموماً به‌عنوان قارچ دکمه‌ای شناخته می‌شود. در طول فرآیند تولید *A. bisporus*، انواع باکتری‌ها و قارچ‌ها درگیر هستند. وجود آلودگی‌های باکتریایی و قارچی در اسپان قارچ می‌تواند منجر به تلفات اقتصادی قابل‌توجه و ایجاد بیماری‌های مضر در قارچ شود. پیشرفت‌های اخیر از جمله متاژنومیکس نقش مهمی در شناخت باکتری‌ها و قارچ‌های اصلی آلوده‌کنندهٔ اسپان قارچ، بهبود بهره‌وری و کاهش بیماری‌های قارچ دارد. در این مطالعه، آلودگی اسپان قارچ با استفاده از تکثیر ژن *16S rRNA* و توالی‌یابی نواحی (ITS) و همچنین آنالیز متاژنومیکس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها به واحدهای طبقه‌بندی عملیاتی (OTUs) دسته‌بندی شدند. شایع‌ترین آلودگی باکتریایی و قارچی به‌ترتیب توسط *باسیلوس* و *پنی‌سیلیوم* ایجاد شد. به‌دست‌آوردن درک جامعی از بیمارگرهای قارچ منجر به افزایش عملکرد و کیفیت قارچ می‌شود. این مطالعه، با استفاده از تکنیک‌های متاژنومیکس، جامعه قارچی و باکتریایی موجود در اسپان قارچ در طول کشت مشخص شد. همچنین روش‌های استریل‌سازی مؤثر برای حذف آلاینده‌های دانه‌های غلات مورد استفاده برای تولید اسپان بررسی و نتایج تحلیل شد.

واژه‌های کلیدی: اسپان، قارچ دکمه‌ای، متاژنومیکس، *16S rRNA*.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

مقدمه

قارچ دکمه‌ای سفید با نام علمی *Agaricus bisporus*، قارچی شناخته شده در میان مردم است که با داشتن خواص دارویی، درمانی و تغذیه‌ای در برنامه غذایی مردم جای گرفته است. این قارچ یکی از پرمصرف‌ترین قارچ‌های موجود در دنیا است، که ارزش تجاری آن، سالانه ۴/۷ بیلیون دلار است. مصرف سرانه قارچ در دنیا به‌طور میانگین حدود ۱/۲ کیلوگرم است و عمده‌ترین تولیدکنندگان قارچ‌های خوراکی در دنیا به ترتیب چین، آمریکا، هلند، اسپانیا و فرانسه هستند. ایران پس از این کشورها جایگاه ششم در تولید این محصول را دارد (Royse et al. 2017). در گذشته تولید قارچ دکمه‌ای به شیوه‌های سنتی و تجربی با بهره‌وری ۱۵-۵ درصد در مترمربع مرسوم بوده، ولی امروزه پیشرفت‌های علمی در این زمینه منجر به افزایش تولید و بهره‌وری دراین صنعت، به حد چشمگیری (۳۵ تا ۴۰ درصد در مترمربع) شده است (Zhang et al. 2018).

پرورش قارچ یک فعالیت بازیافت زباله است. این فرآورده سودمند، در بستری از تخمیر ضایعات کشاورزی از جمله کلش و کود مرغی به همراه سایر مکمل‌های افزودنی رشد می‌کند. با توجه به اینکه کل فرآیند تولید قارچ دکمه‌ای مبتنی بر تخمیر است، نقش و اهمیت فوق‌العاده باکتری‌ها و قارچ‌ها طی روند تولید انکارناپذیر است، آنچه در مورد فلور میکروبی موجود در این بسترها حائز اهمیت است چگونگی حفظ و تکثیر میکروارگانیسم‌های مفید و از بین بردن و کاهش میکروب‌های رقیب و مضر است زیرا غلبه هر فلور میکروبی بر دیگری نتیجه فرآیند تولید را تغییر خواهد داد، به‌طوری‌که اگر جمعیت میکروب‌های مضر افزایش یافته و از تعداد میکروب‌های مفید کاسته شود، در بستر باکتری‌ها و کپک‌های بیماری‌زا به جای قارچ رشد خواهد کرد. چنانچه شرایط برای رشد میکروب‌های مفید و میسیلیوم قارچ مناسب باشد، قارچ سالم و با کیفیت تولید می‌شود (Suwannarach et al. 2022). بذر قارچ دکمه‌ای یکی از فاکتورهای حساس و مهم در تولید و پرورش قارچ است و تولید بذر قارچ همیشه با خطر آلودگی‌های باکتریایی و قارچی همراه بوده که این آلودگی‌ها همراه با بذر، قابلیت انتشار در بستر پرورش قارچ را نیز داشته و می‌تواند ضرر هنگفتی را برای تولیدکنندگان قارچ ایجاد کند (Netam et al. 2017). پایه‌های اصلی و علمی صنعت پرورش قارچ دکمه‌ای، مبتنی‌بر شناسائی انواع فلور میکروبی (مفید و مضر) در انواع بستر پرورش قارچ است. با شناخت دقیق فلورهای میکروبی می‌توان به تکثیر گونه‌های مفید، کنترل و کاهش گونه‌های مضر در بسترهای کشت دست یافت (Carrasco et al. 2020).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

با گسترش فناوری‌های توالی‌یابی، پژوهشگران روش جدیدی را برای شناسائی فلور میکروبی محیط‌های مختلف ارائه داده‌اند. یکی از این روش‌ها، متاژنومیکس (metagenomics) است که مبتنی‌بر بهره‌وری بالا (high- throughput) از جمله توالی‌یابی نسل جدید (NGS: next generation sequencing) است که در حال حاضر در مطالعات متعددی،کاربرد موفقیت‌آمیزی داشته است. متاژنومیکس به پژوهشگران این امکان را می‌دهد تا با جمع‌آوری ژنوم‌های گوناگون در محیط‌های مختلف (خاک، آب و ضایعات نفتی و غیره) اجتماعات میکروبی را در مقیاس بالا و به‌طور دقیق، تشخیص و بررسی کنند (Thomas et al. 2012).

تکنیک‌های NGS همراه با توالی‌یابی آمپلیکون *16S rRNA* برای بررسی تنوع باکتریایی، و توالی‌یابی آمپلیکون *18S rRNA* برای بررسی تنوع قارچی، به‌طور گسترده برای مطالعه جوامع ساختاری استفاده می‌شوند. بارکدگذاری دی.ان.ای قارچ‌ها از ناحیه رونویسی شده داخلی دی.ان.اِ ریبوزومی (ITS: internal transcribed spacer) هسته‌ای برای تعیین رده‌بندی در سطح جامعه استفاده می‌کند. با استفاده از دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از نمونه‌های کمپوست و پوشش، و همچنین آغازگرهای مناسب برای تقویت ناحیه ITS، می‌توان داده‌های لازم برای شناسایی و طبقه‌بندی جوامع قارچی موجود را تولید کرد (Brooks et al. 2015).

هدف از این مطالعه شناخت و ارزیابی محتوای باکتریایی و قارچی محیط کشت اسپان *A. bisporus* با استفاده از توالی‌یابی متاژنومیکس به وسیله هدف قراردادن نواحی *16S rRNA* در باکتری‌ها و نواحی ITS در قارچ‌ها است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه

محیط‌های کشت قارچ از شرکت بذر قارچ پگاه ایران واقع در استان البرز، شهر کرج با تولید ۵۰ تن اسپان قارچ دکمه‌ای در ماه، فراهم شدند. محیط‌های کشت حاوی گندم پخته استریل تلقیح شده با اسپان بودند. نمونه‌برداری از محیط‌های کشت مربوطه در سه تیمار انجام شد. تیمار ۱: نمونه‌های سالم بدون هیچ‌گونه آلودگی (فقط حاوی گندم پخته شده استریل بدون اسپان). تیمار ۲: اسپان نمونه‌های آلوده به باکتری. تیمار ۳: اسپان نمونه‌های آلوده به قارچ (کپک‌ها). از هر تیمار، سه تکرار به ترتیب در روزهای ۳، ۸ و ۱۴ نمونه‌برداری انجام شد. در هر مرحله از نمونه‌برداری، با استفاده از پنس استریل از محیط‌های کشت در زیر هود لامینار حدود ۵۰ گرم اسپان به فالکون‌های استریل انتقال یافت. سپس نمونه‌های مربوطه هر روز با هم مخلوط

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

شده و فالکون‌های حاوی نمونه‌ها به یخچال ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند. در نهایت مراحل آماده‌سازی برای استخراج دی.ان.اِ انجام شد.

استخراج دی.ان.اِ

استخراج دی.ان.اِ از نمونه‌های مربوطه با استفاده از تغییراتی که در روش گونتیا و همکاران داده شد (Gontia et al. 2014) انجام شد. مقدار ۵ گرم از نمونه اسپان در لوله فالکون ریخته شد و سپس ۵ میلی‌لیتر NaCl (1M) به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد، سپس در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج شد، فاز پایین در بافر TEN (Trise- EDTA-NaCl) شسته شد و پس از چندین بار مخلوط کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد مایع رویی خارج و دوباره با بافر TEN شستشو شد. پس از ریختن مایع رویی، فاز پایینی در یک میلی‌لیتر بافر TEN حل شد و ۲۵۰ ماکرولیتر از آن در هر ویال ریخته شد.

در مرحله بعد، ۲۰۰ ماکرولیتر محلول NaCl (5M) و ۲۰۰ ماکرولیتر SDS ۱۰ درصد به این ویال‌ها اضافه و به‌طور کامل مخلوط شده و طی دو مرحله ابتدا سرد و سپس حرارت داده شد. ویال‌ها به مدت ۲ دقیقه در نیتروژن مایع و سپس ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و این کار سه بار تکرار شد. در مرحله آخر ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در این مرحله، ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار (pH: 5.5) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به ویال جدید انتقال داده شد و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد، بعد از چندین بار تکان آهسته در (۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس) سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک ویال جدید منتقل هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. در مرحله آخر سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد فاز رویی خارج و رسوب به دست آمده با اتانول ۷۰ درصد شسته شد و سپس در ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج شد و پلت در هوای آزاد خشک شد و در نهایت در ۲۰ ماکرولیتر آب حل شد.

برای ارزیابی کمیت و کیفیت دی.ان.اِ از الکتروفورز ژل آگارز و همچنین نانودراپ با استفاده از دستگاه NanoDrop™, 2000c model, Thermo Scientific استفاده شد. دی.ان.ای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

استخراج شده تا زمان تعیین توالی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

توالی‌یابی دی.ان.اِ

مقدار یک میکروگرم از دی.ان.اِ با کیفیت مناسب جهت توالی‌یابی به شرکت توالی‌یابی ماکروژن (Macrogen Sequencing Inc.) ارسال شد. توالی‌یابی و طبقه‌بندی باکتری‌ها با کدگذاری *16S rDNA* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از نواحی متغیر V3 و V4 مربوط به ژن *16S rRNA* انجام شد. در ادامه جهت شناسایی قارچ‌ها از ناحیه ITS از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. برای توالی‌یابی با توجه به بررسی فرآیند، نوع جامعه میکروبی غالب در نمونه و همچنین در نظر گرفتن هزینه توالی‌یابی در ابتدا *16S rDNA* و *18S rDNA* به‌عنوان روش اصلی و سپس زیر مجموعه‌های 16S/ITS انتخاب شد. جهت انجام فرآیند توالی‌یابی بعد از تهیه cDNA از نمونه‌های ارسالی، تهیه کتابخانه و اتصال آداپتور به انتهای قطعات، از پلتفورم ایلومنا (Illumina) استفاده شد و پس از اتمام فرآیند توالی‌یابی، داده‌ها جهت آنالیز در قالب FASTQ آماده شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌های متاژنومیکس

بعد از دریافت داده‌های خام در فرمت FASTQ جهت بررسی کیفیت داده‌ها از نرم‌افزار Prinseq در پایپ لاین QIIME2 استفاده شد (Bokulich et al. 2018). کلیه مراحل سرهم‌بندی، کلاسترینگ تاکسونومی و همچنین بررسی تنوع بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای با به کارگیری روش‌ها و دستورهای QIIME2 و Mothur انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌های توالی‌یابی *16S rRNA*

توالی‌های *16S rRNA* با استفاده از بسته Mothur V.1.47.0 آنالیز شدند (Schloss et al. 2009). به‌طور خلاصه، خوانش‌ها به کانتیگ‌ها متصل شده و توالی‌های منحصر به فرد حاصل با مرجع باکتریایی SILVA 138 هم‌ردیف شدند (Quast et al. 2012). توالی‌ها بر اساس طبقه‌بندی آن‌ها به گروه‌هایی تقسیم شدند و بیشتر در واحدهای طبقه‌بندی عملیاتی (OTUs) دسته‌بندی شدند.

طبقه‌بندی قارچ‌ها با استفاده از تقویت مناطق ITS

توالی‌های خام با استفاده از QIIME2 جهت طبقه‌بندی قارچ‌ها آنالیز شدند (Bolyen et al. 2019). برای محاسبه OTU، خوانش‌ها با شباهت ۹۷ درصد با استفاده از نرم‌افزار Usearch خوشه‌بندی شدند. برای طبقه‌بندی OTUهای به دست آمده از نرم‌افزار QIIME2 استفاده شد. شاخص‌های تنوع آلفا و تنوع بتا با استفاده از نرم‌افزار QIIME2 انجام شد. ترکیب جامعه در سطوح مختلف طبقه‌بندی (شاخه، طبقه، ردیف،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

خانواده، جنس و گونـه) بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار QIIME2 تعیین شد. جداول فراوانی برای سـطوح مختلف طبقه‌بندی با استفاده از نرم‌افزار QIIME2 تهیه شد (Kõljalg et al. 2020).

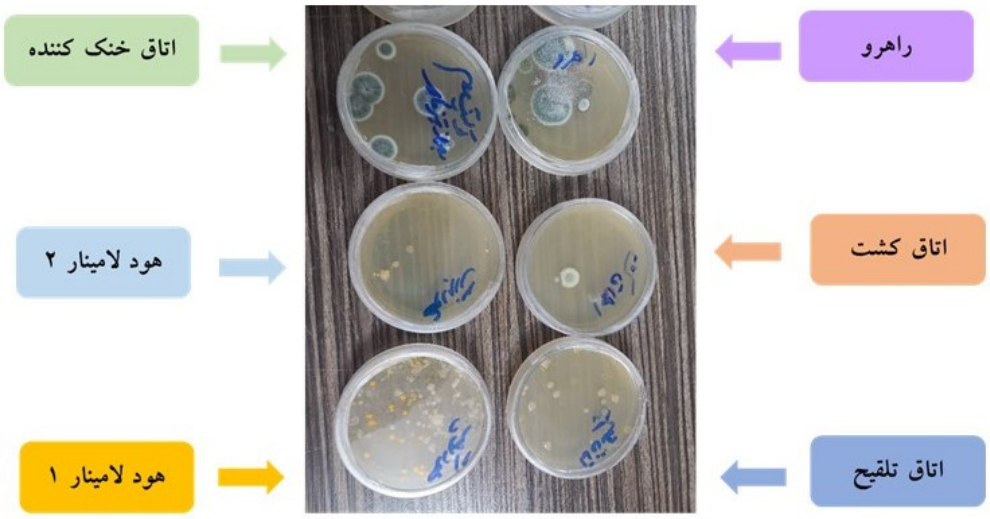
نتایج

مانیتورینگ اتوکلاو

اولین گام در حـل مشـکل آلـودگی و شناسـایی منبـع آن، ارزیـابی عملکـرد اتـوکلاو از طریـق آزمایش‌هـــای بیوشـــیمیایی و زیســـتی اســـت. آزمایش‌های بیوشـیمیایی بـا اسـتفاده از نوارهـای اتوکلاو (تغییر رنگ در دماهای خاص ۱۲۱ درجـه سلسیوس و ۱۳۰ درجـه سلسـیوس) جهـت تائیـد صحت کار اتوکلاو انجام شـد. پـایش زیسـتی بـا استفاده از ویال‌های حاوی باکتری *باسیلوس* مقاوم در برابر حرارت در مجاورت کیسـه‌های گنـدم در کلاس‌های مختلـف اتـوکلاو انجـام شـد. پـس از استریلیزاسیون، ویال‌های حاوی باکتری در دماهای مختلف انکوبه شده و برای هر گونه تغییـر رنـگ بررسـی شـدند. عـدم تغییـر رنـگ نشـان داد کـه اتوکلاو در از بـین بـردن باسـیل‌هـا مـؤثر بـوده و صحت عملکرد اتوکلاو تأیید شد.

نمونه‌گیری از گندم استریل شده قبـل از تلقـیح بذر مادری جهت سـنجش میـزان اسـتریل توسـط اتوکلاو، انجام شد. برای این کار ابتدا محیط کشت سـیب زمینـی دکسـتروز آگـار (PDA: potato dextrose agar) تهیه شد و زیـر هـود لامینـار بـر روی آن محیط کشـت‌هـای اسـتریل شـده توسـط اتوکلاو، قرار داده شد. این نمونه‌گیری به صـورت تصـادفی از کلیـه طبقـات انجـام شـد و پلیـت‌هـا هیچگونه آلودگی نشان ندادند کـه بـه ایـن معنـی است که کار دستگاه استریل به درستی انجام شده است. مرحله بعدی شامل بررسی احتمال آلـودگی از محـیط آزمایشـگاه بـود. پلیت‌هـای کنتـرل کـه حـاوی محـیط کشـت PDA بـود در قسـمت‌های مختلف آزمایشگاه از جمله زیر هود لامینار، اتـاق رشد، اتـاق خنک‌کننـده و اتـاق تلقـیح قـرار داده شدند. سپس درب هر کدام از پلیت‌هـا بـه مـدت یک ساعت باز مانـد و بعـد از یـک سـاعت درب پلیت‌ها بسته شد و دور هر یـک پـارافیلم پیچیـده شد با توجه به محیطی که در آن قرار داشـتند نـام گـــذاری شـــدند. پـــس از انکوباســـیون پلیت‌هـــا، کلنی‌های تشکیل شده برای شناسایی باکتری‌هـا و کپک‌ها مورد بررسی قـرار گرفتنـد و متعاقبـاً ایـن یافته‌ها با نتایج حاصل از آنالیز متـاژنوم مطابقـت داشت. همان‌طوری‌که در شـکل ۱ دیـده مـی‌شـود پلیت‌های واقع در اتاق خنک کننده، راهرو و اتاق تلقیح آلودگی نشان دادند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]



شکل ۱- پلیت‌های حاوی گندم استریل شده قبل از تلقیح بذر مادری، جهت سنجش کار دستگاه اتوکلاو

آلودگی محیط زیست

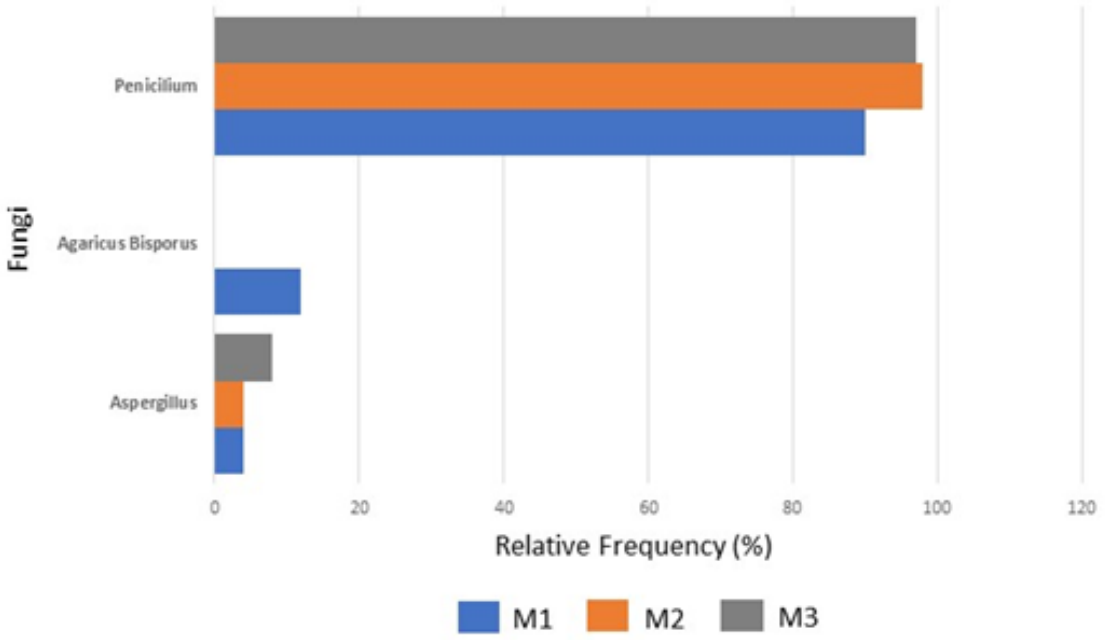
برای مقابله با آلودگی محیط‌زیست، اقدامات متعددی انجام شد. محل اسپان مادر که به‌عنوان بانک اصلی عمل می‌کرد، به یک محیط آزمایشگاهی بدون آلودگی تغییر یافت و کشت‌های جدید با منشأ غیرآلوده تولید شد. علاوه‌براین، کیسه‌های آلوده و اسپان‌های آلوده برداشته شدند، درحالی‌که اسپان‌های سالم به سردخانه منتقل شدند. لامپ‌های فرابنفش تاریخ مصرف گذشته و فیلترها تعویض شدند و پیش فیلترهای جدید یا فیلترهای هپا نصب شدند. محیط آزمایشگاه با استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده با پایه کلر و مواد اکسیدکننده به‌طور کامل تمیز شد و ماده ضدعفونی‌کننده به مدت دو روز باقی ماند. ورود و خروج به آزمایشگاه در این مدت محدود بود. ضدعفونی‌کننده‌های مختلف آزمایش شدند و مشخص شد که ضدعفونی‌کننده‌های کلردار در مقایسه با ضدعفونی‌کننده‌های با پایه آلدهید در ازبین‌بردن آلودگی باکتریایی مؤثرتر هستند. پس از اجرای این اقدامات، کار با کشت‌های مادر غیرآلوده و جدید در محیطی به‌طور کامل تمیز ازسرگرفته شد و در نتیجه آلودگی باکتریایی ایجاد نشد. با گذشت زمان، آلودگی باکتریایی از طریق رعایت دستورالعمل‌های بهداشتی، استفاده مداوم از مواد ضدعفونی‌کننده و شستشوی مداوم اتاق‌های تلقیح و خنک‌کننده به صفر درصد کاهش یافت. آلودگی کپک به دلیل اینکه به‌صورت طبیعی در محیط وجود دارد به‌طور کامل از بین نرفت، اما مقدار آن به میزان بسیار کمی و به زیر سه درصد کاهش

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

یافت. پلیت‌گذاری هفتگی برای نظارت بر سطوح آلودگی انجام شد. آلودگی مشاهده شده در پلیت‌ها در مقایسه با زمانی که محیط آزمایشگاه به‌شدت با باکتری *باسیلوس* آلوده شده بود که در آن کلنی‌ها کل سطح صفحات را پوشانده بودند، به تعداد کمی که تنها یک تا دو کلنی بود کاهش یافت. با بررسی کلیه مراحل مشخص شد که آلودگی ایجاد شده در کیسه‌های اسپان ناشی از منابع محیطی است. این یافته‌ها با نتایج حاصل از آنالیزهای متاژنومی جهت شناسایی نوع آلودگی موجود، تأیید شد.

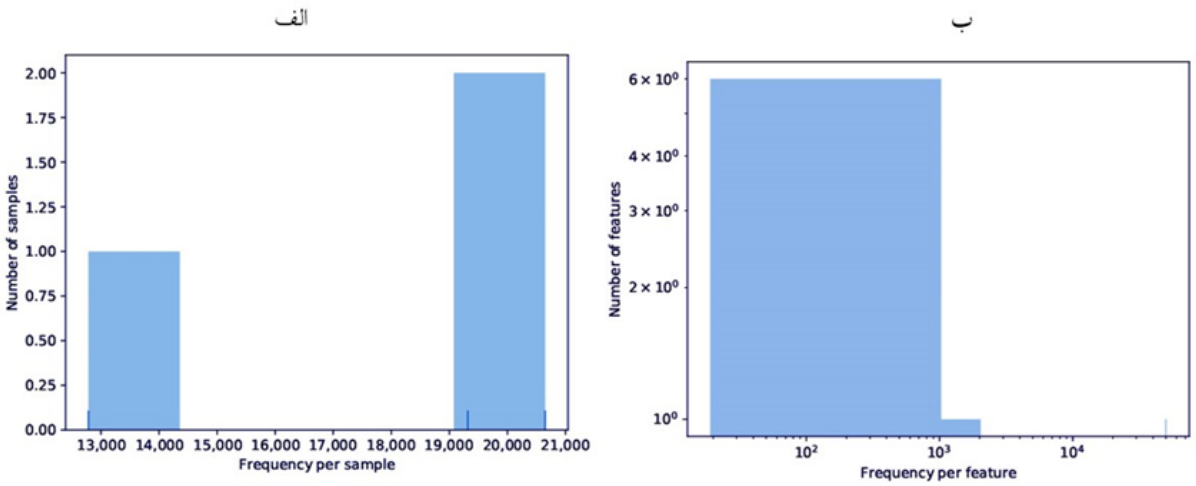
آلودگی قارچی

باتوجه به داده‌های حاصل از آنالیز متاژنوم، بیشترین جمعیت کیسه‌های آلوده به کپک، کپک پنی‌سیلیوم و به دنبال آن کپک *آسپرژیلوس* بود (شکل ۲). کلنی‌هایی از کپک‌های مختلف نیز در پلیت‌ها مشاهده شد، اما تمایز بین کلنی‌های *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* چالش‌برانگیز بود. با این‌حال، روش‌های توالی‌یابی متاژنوم به‌طور دقیق نوع کپک و جمعیت آن‌ها را شناسایی کرد (شکل ۳).



شکل ۲- فراوانی نسبی واحدهای طبقه‌بندی عملیاتی قارچ (OTUs) در سطح جنس نمونه‌های اسپان آلوده به قارچ (کپک‌ها) در روزهای ۳، ۸ و ۱۴ (M1: روز ۳، M2: روز ۸، M3: روز ۱۴). OTUها با استفاده از پایگاه داده UNITE طبقه‌بندی شدند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]



شکل ۳- میزان فراوانی در هر نمونه قارچی(الف) و میزان فراوانی بر اساس ویژگی (ب)

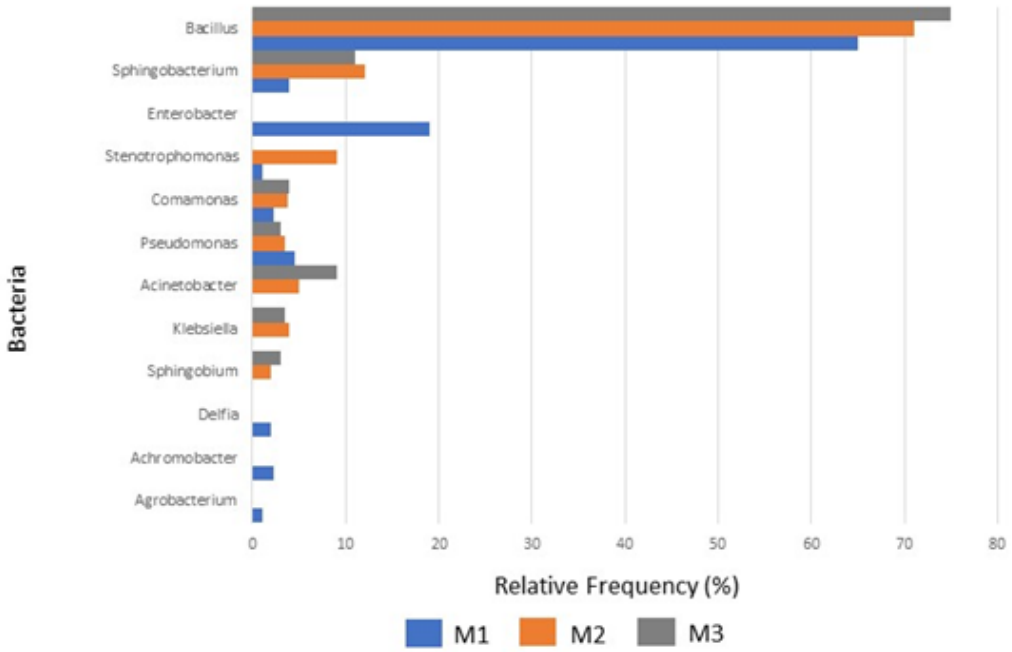
برای کاهش آلودگی، نظافت و شستشوی منظم محیط‌های مختلف از جمله اتاق تلقیح، اتاق خنک‌کننده، اتاق‌های رشد و محیط‌های آزمایشگاهی انجام شد. علاوه‌بر این، ضدعفونی با آب اکسیژنه که مؤثر بودن آن ثابت شده بود، هنگام شناسایی این کپک‌ها به کار گرفته شد.

آلودگی باکتریایی

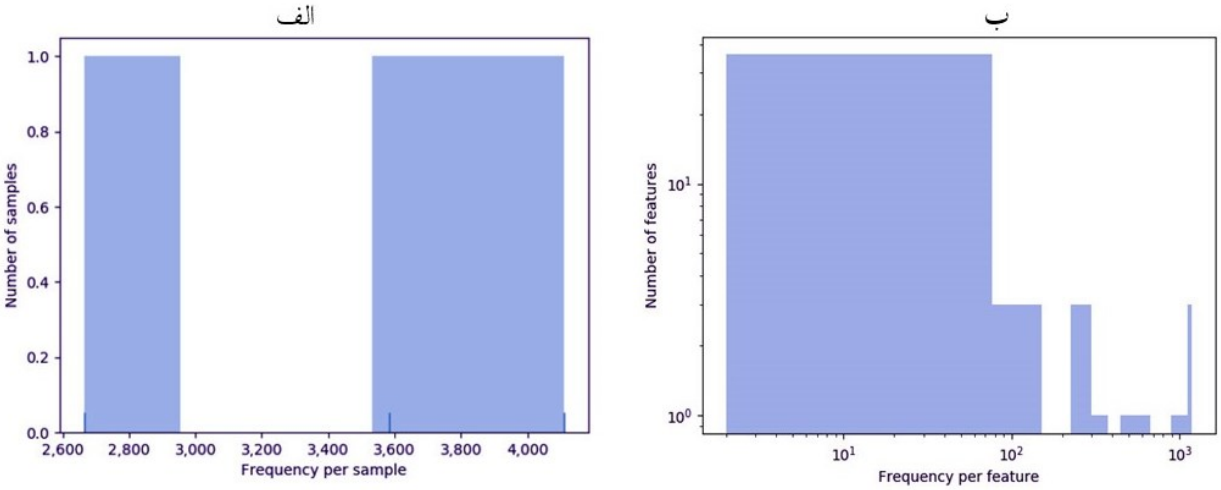
بررسی نتایج حاصل از آنالیز متاژنوم نشان داد که بیشترین جمعیت باکتری‌ها در کیسه‌های آلوده را باسیل‌ها تشکیل داده‌اند (شکل ۴).

همچنین با توجه به نتایج متاژنومیکس داده‌ها، در نمونه‌ی کیسه‌های آلوده به باکتری (شکل۵)، بیشترین فراوانی جمعیت به باسیل‌ها اختصاص دارد. از آنجایی‌که باسیل‌ها در برابر مواد ضدعفونی‌کننده مقاوم هستند، کاهش جمعیت آن‌ها در محیط یک چالش مهم است. به همین دلیل، انواع مختلفی از ضدعفونی‌کننده‌ها از جمله ضدعفونی‌کننده‌های با پایه آلدهید، ضدعفونی‌کننده‌های با پایه کلر و لامپ‌های UV برای ریشه‌کن‌کردن این باکتری‌ها استفاده شدند. در میان این ضدعفونی‌کننده‌ها، ضدعفونی‌کننده‌های با پایه کلر در کاهش باسیل‌ها بسیار مؤثر بوده و به‌طور منظم و مکرر مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]



شکل ۴- فراوانی نسبی واحدهای طبقه‌بندی عملیاتی باکتریایی (OTUs) در سطح جنس در سراسر نمونه‌های اسپان آلوده به باکتری در روزهای ۳، ۸ و ۱۴ (M1: روز ۳، M2: روز ۸، M3: روز ۱۴). OTUها با استفاده از پایگاه داده Silva طبقه‌بندی شدند.



شکل ۵- میزان فراوانی در هر نمونه باکتریایی (الف) و میزان فراوانی بر اساس ویژگی باکتریایی (ب).

با این‌حال، اگرچه جمعیت *باسیلوس* پس از استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها کاهش پیدا کرده است، اما در طول پلیت‌گذاری مجدد، با جمعیت کمتر، تقریباً ۳ تا ۵ درصد از کل باکتری‌ها، همچنان در محیط شناسایی شدند. در نتیجه، تصمیم گرفته شد که آزمایشگاه به مدت یک هفته

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

به‌طور موقت بسته شود و کل اتاق رشد به‌طور کامل تمیز شود. در طول فرآیند تمیزکردن از ضدعفونی‌کننده کلر با غلظت بالا استفاده شد. علاوه‌بر این، اتاق رشد پس از نظافت ایزوله شد و پس از یک هفته دوباره پلیت‌گذاری انجام شد. پس از پلیت‌گذاری مجدد در اتاق رشد استریل شده، هیچ‌گونه آلودگی *باسیلوس* در داخل پلیت‌ها مشاهده نشد. این موضوع نشان داد که اقدامات ضدعفونی به‌طور مؤثر باکتری‌ها را از بین می‌برد. در نتیجه، کار ازسرگرفته شد و محصولات جدید هیچ شواهدی از آلودگی باکتریایی نشان ندادند که نشان‌دهنده تلاش‌های موفق ریشه‌کنی است. لازم به ذکر است که بر اساس شکل ۴، شایع‌ترین باکتری بعدی پس از *باسیلوس*، *سودوموناس* بود؛ بنابراین، ضدعفونی‌کننده کلر که در برابر *باسیلوس* مؤثر بود، در مبارزه با *سودوموناس* نیز به کار گرفته شد. در نتیجه، پس از مواجهه با چالش‌ها و زیان‌های قابل‌توجه تولید به دلیل آلودگی با باسیل، مشخص شد که پروتکل‌های ضدعفونی معمول باید به‌طور کامل اجرا شود، حتی زمانی‌که سطوح آلودگی به دنبال پلیت‌گذاری مجدد پایین است. پروتکل‌های نظافت و بهداشت منظم در آزمایشگاه به‌دقت رعایت شد و پلیت‌گذاری مجدد هفتگی انجام شد. مبارزه با آلودگی به‌طور مداوم انجام شد و از رسیدن آلودگی به سطوح شدید و در نتیجه از نیاز به توقف تولید جلوگیری شد.

بحث

جوامع میکروبی نقش حیاتی در فرآیند تولید قارچ دارند (McGee. 2018). قارچ دکمه‌ای سفید بر روی یک بستر کمپوست تهیه شده از کاه گندم یا بستر اسب، همراه با افزودنی‌های حاوی نیتروژن، کود مرغی، پودر دانه، نیتروژن مصنوعی و گچ رشد می‌کند (Gupta et al. 2018; Suresh et al. 2021). در این پژوهش از گندم استریل شده برای حمل هاگ یا بافت ظریف قارچ دکمه‌ای در کمپوست استفاده شد. اسپان با کیفیت یکی از مهمترین عوامل برای دستیابی به عملکرد بهینه قارچ دکمه‌ای است (Singh et al. 2009).

جوامع میکروبی به‌طورکلی با استفاده از روش‌های مستقل از کشت، مانند توالی‌یابی ژن *16S rRNA* تجزیه و تحلیل می‌شوند (Karstens et al. 2019). تجزیه و تحلیل جوامع میکروبی محیطی به‌طور عمده بر تکثیر ژن‌های *16S rRNA* جهت شناسایی گونه‌ها متکی است (Rosselli et al. 2016). در این مطالعه از آنالیز متاژنوم برای شناسایی و کنترل آلاینده‌های قارچی و باکتریایی در طول تولید اسپان *A. bisporus* استفاده شد. جمعیت قابل کشت میکروارگانیسم‌ها روی قارچ دکمه‌ای شامل سودوموناس‌ها، باسیل‌ها و استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی همراه با مخمر *رودوتورولا* و چندین گونه از اکتینومیست‌ها هستند (Xiang et al. 2017).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

روسو و کورستن در یک مطالعه آلاینده‌های عمده قارچی و باکتریایی را در طی تولید اسپان *A. bisporus* گزارش کردند. درصد آلودگی توسط آلاینده‌های فردی بین ۲/۶ تا ۳۹/۳ بود. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که *پنی‌سیلیوم* بیشترین آلودگی را در محیط کشت داشت و به دنبال آن *Mucor* sp.، *Rhizopus* sp.، *Aspergillus* sp. و *Diehliomyces* sp. در جایگاه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند (Rossouw and Korsten, 2017). گونه‌های *تریکودرما*، *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم* و *ریزوپوس* آلاینده‌های اصلی اسپان قارچ هستند که از طریق اسپان آلوده به یک محصول قارچ سالم سرایت می‌کنند (Kumaran and Pandey, 2010).

آرانا و همکاران در یک مطالعه با استفاده از رویکردهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی، باکتری *باسیلوس پومیلوس* (*Bacillus pumilus*) را به‌عنوان باکتری‌های آلوده‌کننده اسپان قارچ شناسایی کردند (Earanna et al. 2010). به‌طور مشابه، در مطالعه ما نیز، بیشترین میزان آلودگی قارچی و باکتریایی در کیسه‌های اسپان به ترتیب مربوط به *پنی‌سیلیوم* و *باسیلوس* بود.

مطالعه دقیق *انتروباکتریاسه* روی قارچ‌های دکمه‌ای در زمان برداشت، حضور قابل توجهی از *Ewingella americana* را نشان داده است که در گزارشی توسط سیام و همکاران در مورد جانشینی میکروبی روی قارچ‌های سالم در آستانه برداشت تایید شد (Siyoum et al. 2016). این میکروارگانیسم یک بیماری‌زای بالقوه انسانی است، اما بیشتر به دلیل ایجاد نکروز در شاخه‌های قارچ شناخته شده است (González et al. 2012). وجود *E. americana* بر روی قارچ‌های سالم پس از برداشت، حساسیت قارچ‌های خوراکی را به انواع بیمارگرهای میکروبی که بر کیفیت محصول تاثیر مستقیم دارد، برجسته می‌کند (Largeteau and Savoie, 2010).

کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی برای صنعت قارچ ضروری است، زیرا عدم کنترل بیماری می‌تواند بخش زیادی از محصول را از بین ببرد. آلودگی اسپان قارچ به‌طور عمده به دلیل استریل کردن نامناسب دانه‌های غلات مورد استفاده برای تولید اسپان رخ می‌دهد (Earanna et al. 2010). پیشگیری مؤثر به‌طور سنتی به حفظ بهداشت مناسب تولید همراه با استفاده هدفمند و کنترل شده از سموم ضد قارچی و باکتریایی بستگی دارد (Fletcher and Gaze. 2007).

محدودیت‌ها و چشم‌انداز آینده

وجود طیف محدودی از ضدعفونی‌کننده‌های تائید شده جهت استفاده در تولید قارچ یکی از محدودیت‌های این حوزه است. ماده ضدعفونی‌کننده رایج در صنعت قارچ بر پایه کلر (هیپوکلریت سدیم) است. کلر دارای طیف گسترده‌ای از عملکرد در برابر ویروس‌ها،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها است. همچنین پراکسیدها دارای طیف گسترده‌ای از عملکرد در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها از جمله اسپور آنها هستند (O'Neill et al. 2015). در مطالعه حاضر، آب اکسیژنه در برابر کپک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌های مبتنی‌بر کلر به‌طور مؤثر *باسیلوس* را در سوسپانسیون مایع از بین برد.

روش‌های جایگزینی شامل استفاده از اسانس‌ها و گونه‌های باکتریایی آنتاگونیست به عنوان عوامل کنترل زیستی در حال توسعه است (Berendsen et al. 2012; Milijašević et al. 2017). علاوه‌براین، آب فعال شده با پلاسما (plasma activated water: PAW) نیز می‌تواند به‌طور مؤثر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها را غیرفعال کند (Xu et al. 2016). همچنین، راهکارهای مولکولی پیشرفته نیز برای تشخیص زودهنگام آلودگی و انتخاب گونه‌های قارچ مقاوم در کاهش تأثیر عوامل بیماری‌زای گسترده ضروری است (Savoie et al. 2016).

نتیجه‌گیری

کاهش آلودگی میکروبی اسپان منجر به افزایش عملکرد محصول قارچ دکمه‌ای می‌شود. صنعت قارچ به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر آلودگی باکتری‌ها و قارچ‌ها از جمله *باسیلوس*، *سودوموناس*، *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* قرار دارد. اجرای یک روش استریلیزاسیون مؤثر برای ضدعفونی کردن دانه‌های غلات مورداستفاده برای تولید اسپان بسیار مهم است. علاوه‌بر این، پیشرفت دانش ما در مورد مکانیسم‌های کنترل زیستی در برابر بیماری‌زاهای قارچ، نویدبخش افزایش کیفیت کشت قارچ است. با شناسایی و حذف منابع بالقوه آلودگی قارچی و باکتریایی در اسپان، می‌توان قارچ‌ها را به‌عنوان یک منبع غذایی پایدار معرفی کرد. با این‌وجود، مدیریت آلاینده‌ها در آزمایش‌های زیست‌توده میکروبی در مقیاس کم، به‌ویژه با ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل بعدی، به‌راحتی قابل‌دسترس است.

سپاسگزاری

از شرکت بذر قارچ پگاه ایران (PEGAH) بابت فراهم کردن بذر قارچ سپاس‌گزاریم.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

References فهرست منابع

Berendsen RL, Kalkhove SI, Lugones LG, Baars JJ, Wösten HA, Bakker PA. 2012. Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. Biological Control. 63(2): 210-21

Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Caporaso JG. 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. Microbiome. 6(1): 1-17.

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology. 37(8): 852-857.

Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, Serrano MG, Reris RA, Sheth NU, Huang B, Girerd P, Strauss III JF, Jefferson KK, Buck GA. 2015. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in *16S rRNA* studies. BMC Microbiology. 15: 1-14.

Carrasco J, García- Delgado C, Lavega R, Tello ML, De Toro M, Barba- Vicente V, Rodríguez-Cruz MS, Sánchez-Martín MJ, Pérez M, Preston GM. 2020. Holistic assessment of the microbiome dynamics in the substrates used for commercial champignon (*Agaricus bisporus*) cultivation. Microbial Biotechnology. 13(6): 1933-1947.

Earanna N, Sajeevan RS, Nataraja KN. 2010. Identification of mushroom spawn contaminating bacterium using morphological, biochemical and molecular approaches. Mushroom Research. 19(2): 62-67.

Fletcher JT and Gaze RH. 2007. Mushroom pest and disease control: a color handbook. Elsevier. https://doi.org/10.1201/b15139

Gontia-Mishra I, Tripathi N, Tiwari S. 2014. A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies. Indian Journal of Biotechnology. 13: 536-539.

González AJ, Gea FJ, Navarro MJ, Fernández AM. 2012. Identification and RAPD-typing of *Ewingella americana* on cultivated mushrooms in Castilla-La Mancha, Spain. European Journal of Plant Pathology. 133: 517-522.

Gupta S, Summuna B, Gupta M, Annepu SK. 2018. Edible mushrooms: cultivation, bioactive molecules, and health benefits. Bioactive Molecules in Food. 1: 1-33.

Karstens L, Asquith M, Davin S, Fair D, Gregory WT, Wolfe AJ, McWeeney S. 2019. Controlling for contaminants in low-biomass *16S rRNA* gene sequencing experiments. MSystems. 4(4): 10-1128.

Kõljalg U, Nilsson HR, Schigel D, Tedersoo L, Larsson KH, May TW, Abarenkov K. 2020. The taxon hypothesis paradigm—on the unambiguous detection and communication of taxa. Microorganisms. 8(12): 1910.

Kõljalg U, Nilsson HR, Schigel D, Tedersoo L, Larsson KH, May TW, Abarenkov K. 2020. The taxon hypothesis paradigm—on the unambiguous detection and communication of taxa. Microorganisms. 8(12): 1910.

Kumaran GS and Pandey M. 2010. System management for enhancing production of mushroom spawn. In National Conference on Production of Quality seeds and planting material–Health Management in Horticultural Crops, New Delhi March (pp. 11-14).

Largeteau ML and Savoie JM. 2010. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. Applied Microbiology and Biotechnology. 86: 63-73.

McGee CF. 2018. Microbial ecology of the Agaricus bisporus mushroom cropping process. Applied Microbiology and Biotechnology. 102: 1075-1083.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

Milijašević-Marčić S, Stepanović M, Todorović B, Duduk B, Stepanović J, Rekanović E, Potočnik I. 2017. Biological control of green mould on Agaricus bisporus by a native *Bacillus subtilis* strain from mushroom compost. European Journal of Plant Pathology. 148(3): 509-519.

Netam RS, Yadav SC, Mukherjee SC, Kumari P. 2018. Cultivation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) under controlled condition: An initiative in Bastar Plateau of Chhattisgarh. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7(10): 782-787.

O'Neill T, Lole M, Drakes D, Irving R, Baars JK, Grogan H. 2015. Use of chemical disinfectants in mushroom production. Agriculture and Horticulture Department Board.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic acids Research. 41(D1): D590-D596.

Rosselli R, Romoli O, Vitulo N, Vezzi A, Campanaro S, de Pascale F, Schiavon R, Tiarca M, Poletto F, Concheri G, Valle G. 2016. Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. Scientific Reports. 6(1): 32165.

Rossouw W and Korsten L. 2017. Cultivable microbiome of fresh white button mushrooms. Letters in Applied Microbiology. 64(2): 164-170.

Royse DJ, Baars J, Tan Q. 2017. Current overview of mushroom production in the world. Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications. 5-13.

Savoie JM, Mata G, Largeteau M. 2016. New prospects in pathogen control of button mushroom cultures. In Mushroom Biotechnology (pp. 93-110). Academic Press.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology. 75(23): 7537-7541.

Singh A, Varshney A, Upadhyay RC. 2009. Studies on incidence of spawn contaminants and economic losses in spawn production of button mushroom, *Agaricus bisporus*. Mushroom Research. 18(1).

Siyoum NA, Surridge K, Van der Linde EJ, Korsten L. 2016. Microbial succession in white button mushroom production systems from compost and casing to a marketable packed product. Annals of Microbiology. 66: 151-164.

Suresh M, Srinivasan M, Shankar SG, Karthikeyan D, Nakhul V, Kumar AN, Maniraj P. 2021. Monitoring and automatic control of various parameters for mushroom farming. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 1055(1): 012011. IOP Publishing.

Suwannarach N, Kumla J, Zhao Y, Kakumyan P. 2022. Impact of cultivation substrate and microbial community on improving mushroom productivity: A review. Biology. 11(4): 569.

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. 2012. Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. Microbial Informatics and Experimentation. 2: 1-12.

Vieira FR, and Pecchia JA. 2018. An exploration into the bacterial community under different pasteurization conditions during substrate preparation (composting–phase II) for *Agaricus bisporus* cultivation. Microbial Ecology. 75: 318-330.

Xiang Q, Luo L, Liang Y, Chen Q, Zhang X, Gu Y. 2017. The Diversity, growth promoting abilities and anti-microbial activities of bacteria isolated from the fruiting body of. Polish Journal of Microbiology. 66(2): 201-207.

Xu Y, Tian Y, Ma R, Liu Q, Zhang J. 2016. Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*. Food Chemistry. 197: 436-444.

Zhang K, Pu YY, Sun DW. 2018. Recent advances in quality preservation of postharvest mushrooms (*Agaricus bisporus*): A review. Trends in Food Science & Technology. 78: 72-82.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]

Unveiling Microbial Contaminants in *Agaricus bisporus* Mushroom Spawns using Metagenomics Approach

Shahnaz Shahi[1], Kolsoum InanlooRahatloo[*2], Mohammad Ali Amoozegar[3]

1- PhD Student, Department of Biology, Kish international Campus, University of Tehran, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor, Department Of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

3- Professor, Microbiology Department, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

inanloo@ut.ac.ir

Abstract

Mushroom production is a practical circular economy model, leveraging agricultural by-products like wheat straw and chicken manure to yield nutrient-dense, protein-enriched foods. The edible mushroom is *Agaricus bisporus*, commonly known as the button mushroom. Throughout the production process of *A. bisporus*, a variety of bacteria and fungi are involved. The presence of bacterial and fungal contamination in mushroom spawn can lead to substantial economic losses and the development of harmful diseases in the mushrooms. Recent advancements in metagenomics have played a crucial role in identifying the main bacteria and fungi present in mushroom spawn. In this study, the contamination of mushroom spawn was analyzed using *16S rRNA* and internal transcribed spacer sequencing. The data was classified into operational taxonomic units. The most frequent bacterial contamination was caused by *Bacillus*, while *Penicillium* was the most common fungal contaminant. Gaining a comprehensive understanding of the biocontrol of mushroom pathogens has the potential to enhance mushroom yield and quality. This study, utilizing metabarcoding techniques, reveals the fungal and bacterial community present in mushroom spawn during cropping. It also highlights the importance of effective sterilization procedures to eliminate contaminants from cereal grains used for spawn production.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Metagenomics, Spawning, *16S rRNA*.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-21]