Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019

تأثیر پارامتر زمان بر رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و تولید آفلاتوکسین توسط آن در مجاورت گیاه چریش

مهدی قربانیان[۱]، دکتر مهدی رزاقی‌ابیانه[۲*]، دکتر عبدالامیر علامه[۳]، دکتر معصومه شمس‌قهفرخی[۱]، دکتر غلامرضا بابایی[۴]، دکتر محمدباقر رضایی[۵]

۱- گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۲- بخش قارچ‌شناسی، انستیتو پاستور ایران ۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۴- گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۵- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

Title: *Effect of incubation time on Aspergillus parasiticus growth and its aflatoxin productivity in presence of neem (Azadirachta indica A. Juss)*

Authors: *Ghorbanian M, (MSc); Razzaghi-Abyaneh M, (PhD); Allameh AA, (PhD); Shams-Ghahfarokhi M, (PhD); Babaee GR, (PhD); Rezaee MB, (PhD).*

Introduction: *Aflatoxins are secondary hazardous fungal metabolites, that are produced by toxigenic strains of some Aspergillus species on food and feedstuffs. These toxins are mutagenic and carcinogenic compounds, and are capable of causing health hazard in human and animals. Prevention of aflatoxin production and their elimination from food products is a matter of importance for many researchers in the last decades. Neem plant is known as an inhibitor of aflatoxin biosynthesis in producing fungi. In this communication, we studied the effect of incubation time as an important parameter on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in presence of different concentrations of Neem aqueous leaf extracts.*

Materials and Methods: *The toxigenic fungus (Aspergillus parasiticus NRRL 2999) was cultured on sucrose low salts (SLS) medium in presence of various concentrations of aqueous neem leaf extracts (0.2% , 0.8%, 3.12%, 12.5% and 50% v/v). After shaking incubation of culture for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days at 28oC, the fungal mycelia were collected and processed for determination of dry weight. A known amount of mycelia and also culture media were processed for aflatoxin B1(AFB1) determination by thin layer chromatography (TLC) method.*

Results: *The neem leaf extracts had not any obvious effect on fungal growth rate at different periods of time. AFB1 production in the control samples (without neem extract) increased to the maximum level in the 8th day of culture, and then remained in a constant status till 12th day. The inhibition of aflatoxin synthesis by aqueous neem extracts was found to be time- and dose-dependent with maximum of 80-90% in presence of 50% concentration. After 2 days, there wasn't any change in AFB1 production in neem treated mycelia as compared with control samples. In the 4th day, at 12.5% and 50% concentrations, toxin production was reduced and this reduction at 50% concentration was significant after comparing with control samples (P<0.05).*

Conclusion: *The obtained results clearly show that inhibitory effects of aqueous neem leaf extracts on aflatoxin synthesis reported in this study is time-dependent without any obvious effect on fungal growth rate. Aflatoxin inhibition is mainly occured in primary stages of fungal growth where the genes involved in aflatoxin biosynthesis have the maximum activity within the fungal cells .*

Keywords: *Aflatoxin, neem, Aspergillus parasiticus, TLC, incubation time*

Hakim 2005; 8(2); 41-46.

*- نویسنده مسؤول: بخش قارچ شناسی انستیتوپاستور ایران. تلفن: ۶۶۹۵۳۳۱۱ فاکس: ۶۶۴۶۵۱۳۲ پست الکترونیک: mrab442@yahoo.com

Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019

چکیده:

مقدمه: *آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی قارچی هستند که توسط سویه‌های مولد سم برخی از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس بر روی مواد غذایی انسان و دام تولید می‌شوند. بدلیل خواص جهش‌زایی و سرطان‌زایی، این سموم از جمله عوامل مخاطره‌آمیز بهداشت عمومی در انسان و دام محسوب می‌گردند. مقابله با تولید آفلاتوکسین توسط قارچ‌های مولد و یا حذف آنها از مواد غذایی، توجه محققین زیادی را طی سال‌های گذشته بخود معطوف داشته است. گیاه چریش (نیم، آزادیراکتا ایندیکا) بعنوان یکی از عوامل مهار کنندهٔ تولید آفلاتوکسین توسط قارچ‌های مولد شناخته شده است. در تحقیق حاضر تأثیر پارامتر زمان بر رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس و تولید آفلاتوکسین توسط آن در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ چریش بررسی گردید.*

روش کار: *قارچ مولد سم (آسپرژیلوس پارازیتیکوس* NRRL 2999) *در محیط سوکروز فقیر از املاح* (SLS) *در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه چریش (۰/۲، ۰/۸، ۳/۱۲، ۱۲/۵ و ۵۰ درصد حجمی/ حجمی) در دوره‌های زمانی مختلف ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتیگراد و شرایط متحرک ۱۲۰ دور در دقیقه کشت داده شد. سپس وزن خشک میسلیومی تعیین گردید و محتوای آفلاتوکسین* B_1(AFB$_1$) *میسلیومی و ترشحی با روش کروماتوگرافی لایه نازک* (TLC) *اندازه گیری شد.*

نتایج: *عصاره آبی برگ چریش فاقد هر گونه تاثیر معنی دار بر رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس بود. تولید آفلاتوکسین در نمونه های کنترل (بدون مجاورت با عصاره) در روز ۸ به حداکثر رسید و سپس تا روز ۱۲ در حد ثابت باقی ماند. مهار بیوسنتز آفلاتوکسین در مجاورت چریش از نوع وابسته به زمان و دوز بود. در نمونه های مجاور شده با عصاره، در فاصله زمانی ۲ روز تغییری در تولید آفلاتوکسین نسبت به کنترل مشاهده نشد. غلظت ۱۲/۵ و ۵۰ درصد عصاره در روز٤ و روزهای ٦ تا ۱۲، منجر به کاهش تولید آفلاتوکسین شد که این کاهش در سطح* $P<0.05$ *با نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت.*

نتیجه‌گیری: *نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره آبی برگ گیاه چریش بصورت وابسته به زمان، بدون هر گونه تاثیر معنی‌دار بر رشد قارچ، موجب مهار سنتز آفلاتوکسین می‌گردد. به نظر می‌رسد تأثیر مهاری عصاره بر تولید سم در مراحل اولیه مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یعنی زمانی که ژن‌های مسوول بیوسنتز سم حداکثر فعالیت خود را در داخل سلول‌های قارچ دارند، رخ می‌دهد.*

گل‌واژگان: *آفلاتوکسین* B_1*، چریش، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، کروماتوگرافی لایه نازک، زمان انکوباسیون.*

مقدمه:

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچی همچون آنتی‌بیوتیک‌ها و الکالوئیدها هستند که توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. اکثر مایکوتوکسین‌های شناخته شده محصولات متابولیک جنس‌های قارچی *آسپرژیلوس، فوزاریوم وپنی سیلیوم* می‌باشند (۱).

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از این سموم هستند که عمدتاً توسط دو قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شوند. این قارچ‌ها قادرند بر روی انواع مواد غذایی یا دانه‌های انبار شده بویژه ذرت، بادام زمینی، پسته و پنبه دانه رشد کنند و سم تولید نمایند (۳-۱).

بر اساس رنگ فلورسانس بر روی صفحهٔ سیلیکاژل، چهار نوع آفلاتوکسین B_1 و B_2 (فلورسانس آبی) و G_1 و G_2 (فلورسانس سبز) قابل شناسایی است. آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 اشکال هیدروکسیلهٔ آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 در شیر هستند (۳).

آفلاتوکسین B_1 قویترین عامل جهش‌زایی و سرطان‌زایی در بین سموم قارچی است. آفلاتوکسیکوزیس حاد در انسان بدنبال مصرف مواد غذایی آلوده بصورت هپاتیت شدید همراه با علایمی چون یرقان، افسردگی، اسهال و تخریب بافت چربی تظاهر می‌یابد. احتمال دخالت این سم در کواشیورکور و سندرم ری نیز مطرح شده است. آفلاتوکسیکوزیس مزمن با سرطان کبد همراه است و مکانیسم اصلی آن، بروز جهش در ژن مهار کنندهٔ تومور P^{53} در نظر گرفته می شود. سرکوب سیستم ایمنی و اختلالات

Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019

جنینی از دیگر اثرات مهم این سم است (۲و۴).

بیوسنتز آفلاتوکسین در قارچهای مولد با مشارکت واحدهای استات و مالونات شروع می شود. چندین دستهٔ ژنی در تنظیم و کنترل آنزیم های مسیر بیوسنتز سم دخالت دارند (۵). بدلیل اهمیت آفلاتوکسین B_1، مطالعات زیادی در مورد تأثیر مهاری ترکیبات مختلف بر تولید آن انجام گرفته است. دی کلروس (۶)، سلنیت (۷)، نیتراتها (۸)، اکسیژن (۹)، سولفیت پتاسیم (۱۰)، بی‌فلاوونوییدها (۱۱)، بلاستی سیدین A (۱۲) و آفلاستاتین A (۱۳) از جمله مهار کننده های مهم تولید آفلاتوکسین هستند.

یکی از ترکیبات مهاری که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، گیاه چریش می‌باشد. اجزای مختلف چریش نظیر میوه، دانه، برگ و روغن ،اثرات متعددی را دارا هستند. از جمله، عصاره آبی برگ چریش، تولید آفلاتوکسین را در محیط کشت به مقدار زیادی مهار می‌کند در حالی که تأثیر چندانی بر رشد قارچ مولد سم ندارد (۱۴و ۱۵). در تحقیق حاضر تأثیر پارامتر زمان بر رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و تولید آفلاتوکسین توسط آن در مجاورت غلظت‌های مختلف گیاه چریش بررسی شده است.

روش کار:

– استرین قارچی: سویه قارچی مورد استفاده در تمام مراحل تحقیق سوش استاندارد *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* NRRL ۲۹۹۹ بود. به منظور تهیه حجم تلقیح، ابتدا قارچ در محیط سابورو دکستروزآگارتهیه شده در لوله، کشت داده شد و به مدت ۷– ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس سوسپانسیون اسپور قارچ توسط آب مقطر استریل واجد توئین ۸۰ در زیر هود میکروب شناسی تهیه گردید و تعداد آن توسط لام نئوبار شمارش شد.

– تهیه عصاره آبی برگ چریش: برگ گیاه چریش بصورت تازه از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه گردید. ۵۰ گرم برگ پس از شستشو، توسط دستگاه هموژنایزر در مجاورت یک لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با pH 7، عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل توسط سانتریفوژ یخچال دار در ۷۰۰۰×g رسوب‌گیری شد و صاف شده آن با عبور از صافی‌های ۰/۲۲ میکرون توسط قیف سارتریوس، استریل گردید.

– روش کشت: از محیط سوکروز فقیر از املاح (SLS) برای کشت قارچ استفاده شد. این محیط حاوی سوکروز(۸۵ گرم)، آسپاراژین (۱۰ گرم)، سولفات آمونیوم (۳/۵ گرم)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۱۰ گرم)، کلرید کلسیم (۷۵ میلی‌گرم)، سولفات روی (۱۰ میلی‌گرم)، بورات سدیم (۲ میلی‌گرم)، سولفات آهن (۲ میلی‌گرم)، کلرید منگنز (۲ میلی‌گرم) و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد. محیط پس از تهیه، به میزان ۵۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۳۰۰ میلی‌لیتری تقسیم شد و اتوکلاو گردید. در شرایط استریل غلظت‌های ۰/۲، ۰/۸، ۳/۱۲، ۱۲/۵ و ۵۰ درصد حجمی/ حجمی از عصاره آبی برگ چریش، همراه با سوسپانسیون اسپور قارچ به ارلن‌ها اضافه شد. حجم نهایی تمام ارلن‌ها با بافر فسفات پتاسیم استریل در سطح ۱۰۰ میلی‌لیتر قرار گرفت. آزمایش در هر غلظت عصاره به صورت سه تایی انجام شد. ارلن های محیط کشت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۱±۲۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت و دور آن در سطح ۱۲۰ دور در دقیقه تنظیم شد. کشت ها در شش دوره زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز مورد بررسی قرار گرفتند.

– سنجش وزن خشک قارچ: جهت تعیین میزان رشد قارچ، وزن خشک میسلیومی از طریق قرار دادن وزن مشخصی از میسلیوم قارچ در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت تعیین گردید.

– سنجش آفلاتوکسین B_1 میسلیومی و محیط کشت: وزن مشخصی از میسلیوم توسط ازت مایع منجمد گردید و با کمک شن‌ریزه شسته شده با اسید به همراه کلروفرم در دو مرحله عصاره گیری شد. عصارهٔ حاصل، از سولفات سدیم بدون آب عبور داده شد و پس از انجام تغلیظ توسط دستگاه روتاری، نمونه‌ها تا مرحله سنجش در دمای ۲۰– درجه قرار گرفت. آفلاتوکسین موجود در نمونه‌های محیط کشت نیز در حضور کلروفرم با استفاده از قیف دکانتور و دستگاه شیکردکانتور عصاره‌گیری گردید.

به منظور آنالیز کمی آفلاتوکسین B_1، نمونه‌ها توسط دستگاه نمونه‌گذار بر روی صفحات سیلیکا ژل قرار گرفت. در هر صفحه به همراه نمونه سه غلظت مختلف استاندارد آفلاتوکسین B_1 نیز نمونه‌گذاری شد. صفحات به تانک TLC حاوی حلال کلروفرم– متانول با نسبت حجمی ۹۸ به ۲ منتقل گردید و بعد از اتمام جداسازی به منظور ظهور و تعیین محل لکه‌ها از جعبه اولتراویوله استفاده شد. مقادیر کمی آفلاتوکسین B1 توسط دستگاه TLC اسکنر بر اساس مقایسه سطح زیر منحنی لکه‌های نمونه با لکه‌های استاندارد تعیین گردید.

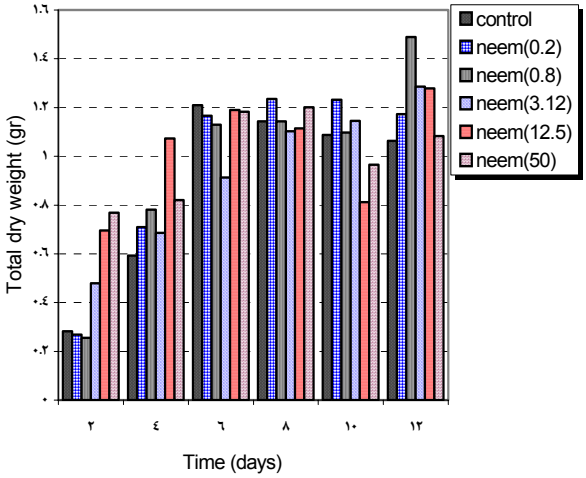
– آنالیز آماری: نتایج بدست آمده با استفاده از روش‌های t-test و آنالیز واریانس یک طرفه بر حسب مورد از نظر آماری آنالیز گردید و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

نتایج حاصله در مورد رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* در

Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019

نمودار ۱ نشان داده شده است. بر ایـن اسـاس، در نمونـه‌هـای کنترل (فاقد عصاره)، وزن خشک قارچ تا روز ۶ افزایش یافـت و سپس تا روز ۱۲ در حد تقریباً ثابتی بـاقی مانـد. در نمونـه‌هـای مجاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره برگ چریش و در همه دوره‌های زمانی، همین الگـو مـشاهده شـد. در مجمـوع، نتـایج حاصل نشان داد که پارامتر زمان فاقـد تـاثیر معنـی‌دار بـر رشـد *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* در مجاورت این عصاره می‌باشد.



نمودار ۱- تأثیر پارامتر زمان بر میزان رشد قارچ *آسـپرژیلوس پارازیتیکوس* NRRL۲۹۹۹ در مجاورت عصاره آبی برگ گیـاه چریش

در مورد سـطح آفلاتوکـسین B_1 میـسلیومی در نمونـه‌هـای کنترل، نتایج نشان داد که میزان تولید سم از روز ۲ تا روز ۸ سیر صعودی داشت و پس از آن تا روز ۱۲ در حد ثابـت بـاقی مانـد. آنـالیز آمـاری نـشان دهنـده اخـتلاف معنـی‌دار بـین سـطح آفلاتوکـسین B_1 در دوره‌هـای زمـانی ۱۲-۶ روز بـا روز ۲ بـود ($P<0.05$). سنجش میزان آفلاتوکـسین B_1 نمونـه‌هـای مجـاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره به شرح ذیل گـزارش گردیـد. در روز ۲ تولید سم نسبت به نمونه‌های کنترل تغییـری نداشـت. در روز ۴، در غلظت‌های ۵۰-۳/۱۲ درصد، تولید سم نـسبت بـه کنترل کاهش یافت. در دوره‌هـای زمـانی ۱۲-۶ روز نیـز تولیـد آفلاتوکسین B_1 توسط قارچ مولد در مجاورت تمامی غلظت‌های عصاره کاهش داشت. این کـاهش بـویژه در غلظـت ۵۰ درصـد عصاره بیش از ۸۰ درصـد گـزارش گردیـد و در سـطح کمتـر از ۰/۰۵ نسبت به نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۱).

نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری آفلاتوکسین B_1 ترشـحی در نمونه‌های کنترل نشان دهنده افزایش میزان ترشـح آن از روز ۲ تا ۱۰ و سپس کـاهش آن در روز ۱۲ بـود. نـسبت آفلاتوکـسین ترشحی به داخل سلولی در روز ۴ (۹ به ۱) بسیار بالاتر از دیگـر دوره‌های زمانی بود. سـنجش میـزان ترشـح سـم توسـط قـارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* در نمونه‌های مجاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه چریش، تقریباً الگوی نمونه‌های کنترل را نشان داد (جدول ۲).

بحث:

آفلاتوکسین‌ها گروه بسیار با اهمیتی از زنوبیوتیک‌ها هـستند که همانند سایر متابولیت های ثانویه قارچی، فاقد هر گونه نقش شناخته شده در رشد ارگانیسم های مولد خود بـوده و در شـرایط خـاص محیطـی تولیـد مـی شـوند. ایـن سـموم دارای اثـرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه زایی در انسان و حیوانات هستند. اعضاء گروه *آسپرژیلوس فلاووس* بـدلیل توانـایی تولیـد انـواع آفلاتوکـسین توجـه بـسیاری از محققـین را بخـود جلـب کرده‌اند. در این میان دو گونه *فلاووس* و *پارازیتیکوس* در شرایط مساعد بسرعت بر روی مواد غذایی و یـا محـیط هـای صـناعی آزمایشگاه رشد می کنند و آفلاتوکسین تولید مـی نماینـد (۱۶ و ۱۷و ۴ و ۱).

بدلیل اهمیت آفلاتوکسین‌ها بویژه AFB_1، ترکیبات زیادی از نظر اثرات مهار کنندگی بر تولید آفلاتوکسین مورد بررسـی قـرار گرفته است (۱۸). در این میان نتایج تحقیقات اولیه نشان داد که گیاه چریش یکی از مهارکنندگان پرقدرت تولید آفلاتوکـسین در قارچهای مولد می باشد (۱۵، ۱۴). در تحقیق حاضر، تاثیر پارامتر زمان بر رشد قارچ مولد سم *آسـپرژیلوس پـارازیتیکوس* و تولیـد آفلاتوکسین توسط آن در مجاورت عصاره آبی برگ گیاه چریش بررسی گردید.

بررسی وزن خشک میسلیومی قارچ *آسپرژیلوس پـارازیتیکوس* نشان داد که هم در نمونه‌های کنترل و هم نمونه‌های مجاور شده با عصاره، رشد قارچ تا روز ۶ افزایش می‌یابـد و پـس از آن تـا روز ۱۲ در حد ثابتی باقی می‌ماند. بنابراین پارامتر زمان نیز تـأثیری بـر فرایند رشد قارچ در حضور عصاره آبی بـرگ گیـاه چـریش نـدارد. عدم تأثیر عصاره برگ چریش بر رشـد قـارچ مولـد، آن را از نظـر بررسی اثرات مهار کنندگی بر تولیـد آفلاتوکـسین بـسیار مناسـب می‌گرداند (نمودار ۱). این مسئله توسط سایر محققین نیز منحـصرا در دوره زمانی ۴ روز نشان داده شده است (۱۴ و ۱۵).

سنجش آفلاتوکسین B_1 نمونه‌هـای کنتـرل نـشان داد کـه بیشترین میزان تولید سم بین روزهای ۴ و ۶ کشت مـی‌باشـد و

Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019

جدول ۱- بررسی تاثیر پارامتر زمان بر الگوی بیوسنتز آفلاتوکسین B_1 * در نمونه های کنترل و نمونه‌های حاوی عصاره برگ گیاه چریش در کشت‌های غوطه ور *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* NRRL ۲۹۹۹

دوره زمانی(روز) / غلظت عصاره(%V/V)	۲	٤	٦	۸	۱۰	۱۲
کنترل	۱۳۴/۰۸ ±۱۴/۳۲	۲۴۳/۳۲ ± ۹۰/۰۳	۶۲۰/۳۶ ±۱۰۳/۹۱	۹۱۵/۰۶ ±۸۵/۱۲	۹۸۱/۹۹ ±۴۰/۶۰	۱۰۱۹/۷۷ ±۱۰۲/۰۸
۰/۲	۱۴۷/۱۱ ± ۴۳/۵۳	۳۸۶/۲۶ ± ۷۲/۵۸	۴۷۳/۶۰ ±۳۷/۸۴	۶۵۳/۰۷ ±۳۵/۴۳	۷۶۹/۶۰ ±۱۰۰/۱۲	۵۷۲/۷۰ ±۱۱/۷۰
۰/۸	۱۵۳/۵۶ ± ۲۸/۱۱	۳۳۵/۵۸ ± ۸۲/۱۲	۵۰۹/۱۵ ±۴۸/۱۴	۵۹۶/۷۱ ±۱۱۸/۹۰	۶۰۱/۸۴ ±۶۰/۸۰	۴۹۱/۳۹ ±۸۳/۵۷
۳/۱۲	۸۴/۱۶ ± ۱۲/۷۰	۲۵۷/۷۹ ± ۷۴/۵۴	۴۸۳/۱۲ ±۴۸/۱۰	۳۵۶/۷۱ ±۲۵/۸۶	۲۷۹/۰۸ ±۳۷/۴۹	۲۹۵/۵۸ ±۴۲/۳۸
۱۲/۵	۷۸/۷۰ ± ۲۳/۳۷	۱۳۷/۹۱ ± ۱۰/۶۱	۲۱۸/۲۵ ±۲۷/۷۱	۲۳۰/۴۶ ±۹۲/۷۵	۱۷۹/۲۳ ±۴۱/۱۰	۲۵۰/۴۶ ±۴۶/۷۰
۵۰	۴۹/۷۹ ± ۵/۵۰	۱۰۷/۳۱ ± ۱۱/۴۷	۱۰۳/۹۸ ±۳۱/۰۳	۸۲/۶۹ ±۲۰/۳۲	۱۵۰/۴۶ ±۴۶/۷۰	۱۷۹/۷۷ ±۴۰/۸۷

*میزان AFB_1 بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک میسلیوم می باشد.

جدول ۲- بررسی تاثیر پارامتر زمان بر الگوی ترشح آفلاتوکسین B_1 * در نمونه‌های کنترل و نمونه های حاوی عصاره برگ گیاه چریش در کشت‌های غوطه ور *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* NRRL ۲۹۹۹

دوره زمانی(روز) / غلظت عصاره(%V/V)	۲	٤	٦	۸	۱۰	۱۲
کنترل	۵۶۳/۴۷ ±۹۸/۳۰	۲۲۳۴/۷۶ ±۱۵۴/۷۲	۲۶۶۱/۷۵ ±۱۲/۴۳	۳۰۱۶/۴۱ ±۲۸۵/۳۰	۳۳۷۸/۱۳ ±۳۲۴/۴۲	۲۳۹۵/۷۷ ±۳۰۲/۹۷
۰/۲	۸۷۷/۵۵ ±۶۱/۱۶	۲۷۱۰/۴۲ ±۳۳/۸۱	۲۵۶۱/۸۵ ±۱۲/۴۳	۲۱۵۸/۴۸ ±۱۵۸/۲۵	۱۸۱۱/۶۲ ±۱۰۸/۰۱	۱۱۸۴/۵۷ ±۱۶۲/۸۷
۰/۸	۸۴۶/۸۰ ±۱۲۷/۹۵	۲۷۹۲/۷۷ ±۱۲۴/۰۲	۲۵۷۱/۹۷ ±۴۸/۸۵	۲۴۵۰/۸۷ ±۳۶۷/۰۸	۱۶۹۷/۲۳ ±۱۲۰/۴۲	۱۰۰۱/۴۷ ±۱۵۲/۲۸
۳/۱۲	۶۷۸/۰۷ ±۸۴/۵۸	۱۸۱۳/۱۲ ±۱۲۸/۶۱	۲۰۴۱/۱۳ ±۷۰/۷۵	۱۹۱۳/۲۳ ±۱۷۴/۱۷	۷۷۱/۴۶ ±۶۳/۹۲	۱۰۴۰/۳۱ ±۲۰۷/۱۴
۱۲/۵	۴۶۸/۷۷ ±۵۱/۲۴	۱۳۳۶/۳۳ ±۵۶/۰۳	۱۶۲۳/۵۷ ±۱۱/۹۹	۹۴۶/۷۶ ±۶۶/۶۲	۱۱۴۵/۵۱ ±۱۵/۱۸	۹۰۶/۵۱ ±۹۴/۰۱
۵۰	۸۶/۵۸ ±۲۵/۳۹	۳۰۵/۵۴ ±۳۸/۰۹	۲۳۲/۸۲ ±۶۵/۱۰	۲۴۰/۸۶ ±۷۳/۵۳	۲۰۶/۵۱ ±۴۶/۷۰	۲۶۹/۸۲ ±۴۳/۵۴

*میزان AFB_1 بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک میسلیوم می‌باشد.

پس از آن از شدت افزایش سم کاسته می‌شود و در روزهای ۱۰ و ۱۲ به حدثابت می‌رسد. بنابراین بنظر می‌رسد، میزان بیوسنتز سم وابسته به غلظت آن در سیتوپلاسم قارچ است و در غلظت معینی از AFB_1 داخل سلولی، واکنش‌های تنظیمی موجب ثبات تولید سم می‌گردد، اما هیچگاه متوقف نمی‌گردد. بنابراین قارچ‌های مولد AFB_1 درمحیط زیست و بر روی مواد غذایی، تولید آن را در طول زمان متوقف نمی‌کنند. این موضوع نشان می‌دهد چنانچه غلظت AFB_1 در ابتدای مرحله بسته‌بندی یا ذخیره‌سازی در محدوده کمتر یا برابر استانداردهای اعلام شده توسط مراکز نظارتی باشد، با افزایش زمان نگهداری ماده غذایی تولید سم کماکان ادامه می‌یابد و به مقدار آن افزوده می‌شود. پس لازم است تعیین میزان آفلاتوکسین مواد غذایی پیش از

Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019

مصرف یا توزیع آن انجام گیرد و در تعیین تاریخ انقضای مصرف مواد غذایی خاص، این مسئله مورد توجه قرار گیرد.

از طرف دیگر ثبات تولید سم در قـارچ، احتمـالاً مربـوط بـه کاهش میزان ترکیبات مؤثر در بیوسنتز سم در محیط نیست زیرا اولاً؛ مقادیر ترکیبات محیط کـشت در حـد اشـباع اسـت و ثانیـاً میزان رشد قـارچ نیـز دسـتخوش کـاهش در دوره‌هـای زمـانی انتهایی نمی‌گردد. میزان تولید AFB_1 بـه هنگـام مجـاور شـدن قارچ مولد با عصاره برگ چریش بـویژه در غلظـت‌هـای ۱۲/۵ و ۵۰ درصد آن به شدت کاهش می‌یابد. این مهار تولید سم توسط Bhatnagar و همکـاران (۱۵) و Allameh و همکـاران (۱۴) در کشت‌های ۴ روزه مجاور شده با عصاره آبـی بـرگ چـریش نیـز نشان داده شده است. بنابراین چنین نتیجه‌گیـری مـی‌شـود کـه عصاره برگ چـریش تولیـد سـم را در مراحـل خاصـی از مـسیر بیوسنتز کاهش می‌دهد.

نتایج حاصل از سنجش AFB_1 ترشح شده از سلول قارچ بـه محیط کشت، در نمونه‌های کنترل، نشان دهنـده افـزایش آن در دوره‌های زمانی ۴ و ۶ است که مطابق با حداکثر تولیـد سـم در داخـل سـلول قـارچی اسـت. پـس از ثابـت شـدن بیوسـنتز در دوره‌های زمانی بعدی، میزان ترشح سم نیز کـاهش یافتـه و در حد ثابتی است. بنابراین به نظر می‌رسد که مقدار ترشـح سـم بـا میزان تولید آن در داخل سلول‌های قارچی ارتباط مستقیم دارد.

بدلیل اهمیت آفلاتوکسین‌هـا در بهداشـت عمـومی و تـأثیر عصاره برگ چریش در مهار تولید آن توسط قارچ‌های مولد، لازم است با تجزیه دقیق عصاره، ترکیبات مؤثر آن را شناسایی نمـود و به منظور کنترل و مهار تولیـد آفلاتوکـسین در مـواد غـذایی، راهکارهای مناسب را به کار بست. یکی از این راهکارهـا تعیـین ژن‌های کد کننده ترکیبات مهار کننده تولید آفلاتوکسین در گیاه چریش است. سپس با انجام کلون ایـن ژن‌هـا در گیاهـانی کـه محصول آنها برای تولید آفلاتوکـسین توسـط قـارچ‌هـای مولـد مناسب است، در صورت کلونیزه شدن ایـن قـارچ‌هـا در مراحـل کاشت، داشت، برداشت و ذخیره‌سـازی بـر روی ایـن گیاهـان و محصول آنها، تولید سم توسط قارچ‌ها تضعیف یا مهار می‌شود.

تشکر و قدردانی:

از آقای دکتر جایمند از بخش شیمی جابر بن حیان مؤسـسه تحقیقات جنگلها و مراتع، آقای دکتر کریمی و آقای هادی‌زاده از بخش ریوی انستیتو پاستور ایران، آقای دکتر خاکـسار از بخـش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور ایران، آقای دکتر یادگـاری از بخـش قارچ‌شناسی دانشکده علـوم پزشـکی دانـشگاه تربیـت مـدرس، آقایان دکتر شوشـتری و دکتـر ملـک آرا از بیمارسـتان حـسینیه ارشاد وابسته به مدیریت درمان تأمین اجتمـاعی کـرج صـمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

۱- علامه، عبدالامیر و رزاقی ابیانه، مهدی، مایکوتوکسین‌ها، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه امام حسین (ع)، ۱۳۸۰، صفحه ۷۹-۱.

2- Richard JL. Mycotoxins and human disease. In: Anaissie, McGinnis, Pfaller, eds. Clinical Mycology. New York. Churcill Livingston; 2003;:389- 98.

3- Hussein SH, Brasel JM. Review: Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 2001; 167: 101-34.

4- D'Mello J, Felix P. Handbook of Plant and Fungal Toxicant. CRC Press. Boca Raton; 1997: 189- 255.

5- Brown MP, Brown- Jenco CS, Payne GA. Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis. Fungal Genet Biol 1999; 26: 81- 98.

6- Draughon FA. Control or supression of aflatoxin production with pesticides. South Coop Ser Bull 1983; 279: 81-6.

7- Badii F, Moss MO, Willson K. The effect of sodium biselenite on the growth and aflatoxin production of Aspergillus Parasiticus and the growth of other Aspergilli. Lett Appl Microbiol 1986; 2: 61-4.

8- Kachholz T, Demain AL. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. J Nat Prod 1983; 46: 499-506.

9- Shih N, Cassity TR, Chipley JR. Partial characterization of the mode of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis. Can J Microbiol 1977; 23: 1580-4.

10- Davis ND, Diener UL. Inhibition of aflatoxin synthesis by P- amino- benzoic acid, potassium sulfite and potassium flouride. Appl Microbiol 1967; 15: 1517-8.

11- Gonsalez E, Felicio JD, Pinto MM. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by Aspergillus flavus. Brazilian J Med Biol Res 2001; 3 (11): 1453-6.

12- Sakuda S, Ono M, Ikeda H, et al. Blasticidin A as an inhibitor of aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. J Antibiot 2000; 53(11): 1265-71.

13- Konda T, Sakuda M, Okamato S, et al. Effect of aflastatin A, an inhibitor of aflatoxin production, on aflatoxin biosynthetic pathway and glucose metabolism in Aspergillus parasticus. J Antibiot 2001; 54(8): 650-7.

14- Allameh A, Razzaghi abyaneh M, Shams M, et al. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins, and activities of fatty acid syntethase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S- transferase in Aspergillus parasiticus. Mycopathologia 2001; 154(2): 79- 84.

15- Bhatnagar D, McCormic SP. The inhibitory effect of neem (Azadirachta indica) leaf extracts on aflatoxin synthesis in Aspergillus parasiticus. J Am Oil Chem Soc 1988; 65: 1166-8.

16- Sweeny MY, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus Fusarium* and *Penicillium* species. J Food Microbiol 1998; 43: 141-58.

17- Cole RJ, Cox RH. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York: Academic Press; 1981: 87-165.

18- Zaik LA, Buchanan RL. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxin. J Food Prot 1987; 50(8): 691-708.

Downloaded from hakim.hbi.ir at 3:30 IRST on Friday February 22nd 2019