مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1390، دوره سوم، شماره نهم، صفحه 18-13

بررسی توانایی جداسازی آفلاتوکسین B_1 توسط باکتریهای اسیدلاکتیک

عادل حمیدی[1]، مجتبی دیده‌دار[2]، پروانه جعفری[3]، مسعود کرمی[1]

1. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه اراک
2. دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
3. دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

نویسنده مسؤول: عادل حمیدی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه اراک. a.ha201291@yahoo.com

دریافت: 90/4/12 پذیرش:90/6/29

چکیده

زمینه و هدف: مایکوتوکسینها سمومی هستند که توسط قارچهای کپکی خاکزی تولید شده و به فراوانی در محیط و مواد غذایی وجود دارند. مهمترین گروه این سموم آفلاتوکسینها هستند که توسط چند گونه کپک از جنس ***Aspergellus*** تولید می‌شوند که قوی ترین و خطرناکترین نوع آنها آفلاتوکسین**B1** است که عوارض سمی مختلفی دارد که شایع ترین این عوارض در انسان ایجاد سرطان کبد است. تحقیقات نشان داده است که گروهی از باکتریهای غیر بیماریزا به نام باکتریهای اسید لاکتیک توانایی اتصال به آفلاتوکسین **B1** و سایر آفلاتوکسینها و جداسازی آنها ازمحیط و مواد غذایی را دارند. هدف از انجام این تحقیق به دست آوردن باکتریهای اسید لاکتیکی است که به کمک توانایی آنها در اتصال و جداسازی آفلاتوکسین**B1** از آنها به عنوان مکمل غذایی ویا پروبایوتیک برای جلوگیری از جذب آفلاتوکسین **B1** در بدن انسان و دام استفاده نمود.

روش بررسی: در این تحقیق باکتریها از **5** گروه منابع مختلف جداسازی شدند. برای بررسی توانایی این باکتریها در جداسازی آفلاتوکسین**B1** از آزمون الایزا استفاده شد وبرای شناسایی سویه‌های به دست آمده از روش تعیین توالی **16S rRNA** با استفاده از پرایمرهای یونیورسال استفاده شد.

یافته ها: در میان سویه‌های جدا شده دو سویه ***Lactobacillus pentosus*** و ***Lactobacillus berevis*** توانایی جذب وجداسازی آفلاتوکسین**B1** را داشتند که به ترتیب **17/4**٪ و **34/7**٪ از آفلاتوکسین **B1** موجود در نمونه مورد آزمایش را جذب کرده و از محلول خارج کرده بودند.

نتیجه‌گیری: باکتری ***L.pentosus*** از مدفوع انسان و باکتری ***L.berevis*** از نمونه شیر محلی جداسازی شده بودند. برای بررسی معنی‌دار بودن نتایج به دست آمده از نرم‌افزار **SPSS 16** استفاده شد.

واژه‌های کلیدی: مایکوتوکسین، آفلاتوکسین، باکتریهای اسید لاکتیک، الایزا.

www.SID.ir

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها به همراه سایر متابولیت‌های قارچی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها در مراحل پایانی رشد قارچ‌های رشته‌ای (کپک‌ها) خاکزی به وسیله سلولهای قارچی تولید می‌شوند. مایکوتوکسین‌هایی که در غذاها حضور دارند می‌توانند یک علت مهم خطرات تغذیه‌ای باشند. درکشورهای صنعتی بیش از 10% جمعیت ممکن است سالانه از بیماری‌های با منشاء غذا آسیب ببینند(1-2). آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxin) گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که به وسیله گونه‌های خاصی ازجنس قارچهای کپکی *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) که انتشار جهانی دارند شامل *A.flavus* ، *A.parasiticus* و *A.nomius* تولید می‌شوند و آفلاتوکسین B_1 به عنوان قوی ترین سم در میان انواع مختلف آفلاتوکسین‌ها شناخته شده‌است(2-3).

کشف آفلاتوکسینها در دهه 1960 در انگلستان به دنبال شیوع بیماری ناشناخته‌ای به نام بیماری X بوقلمون که منجر به تلف شدن تعداد زیادی جوجه بوقلمون و جوجه اردک شده بود صورت گرفت در این بیماری آفلاتوکسین B1 با استفاده از کروماتوگرافی کاغذی از عصاره کلروفرمی دانه‌های بادام زمینی آلوده که به عنوان غذای طیور به‌کار رفته بود جداسازی شد و به صورت لکه آبی رنگی زیر نور UV مشاهده گردید و به دلیل داشتن رنگ آبی به نام B (Blue) مشخص گردید. واژه آفلاتوکسین به دنبال جداسازی و شناسایی این سم و عامل تولید کننده آن یعنی کپک *آسپرژیلوس فلاووس* از مواد غذایی آلوده از ترکیب اختصار کلمات *آسپرژیلوس فلاووس* و توکسین به دست آمده است(1). بر اساس مطالعات انجام گرفته بر روی این دسته ازسموم قارچی روش‌ها و الگوهای بسیارمناسبی جهت بررسی‌های تجربی به ویژه درزمینه‌هایی نظیر سمیت و سرطان‌زایی در اختیار محققین مختلف قرار گرفته‌است. بعضی از ترکیبات خانواده آفلاتوکسین به عنوان عوامل سرطان‌زای قوی در میان ترکیبات شناخته شده طبیعی مطرح می‌باشند و به همین دلیل کوشش‌های فراوانی در راستای حذف یا غیرفعال‌سازی (سم‌زدایی) این ترکیبات در زنجیره غذایی انسان و حیوانات به عمل آمده است(2-4). در میان متابولیت‌های افلاتوکسین B1 فرم اپوکسید متابولیت فعال و کلیدی افلاتوکسین B1 محسوب می‌شود که این ترکیب اثرات سمی خود را بیشتر بر روی سلولهای کبدی اعمال می‌کند و مسئول آسیبهای وارده به DNA، جهش‌زایی، ایجاد سرطان، سقط جنین، ناقص‌الخلقه‌زایی، سرکوب ایمنی و اثرات فیتوتوکسیک است. آفلاتوکسینهای M1 و M2 نیز متابولیت‌های سمی دیگر آفلاتوکسین B1 هستند و به این دو متابولیت سم شیر نیز می‌گویند که از طریق شیر حیواناتی که غذای آلوده به آفلاتوکسین B1 را مصرف کرده‌اند ازجمله شیر انسان ترشح می‌شوند و امکان انتقال این سموم از مادر به فرزند نیز وجود دارد و در مطالعات متعددی آلودگی درصد بالایی از شیر مادران مناطق مختلف دنیا با این سموم به اثبات رسیده است(1-3). علاوه بر دلایل بالا آفلاتوکسین‌ها از نظر اقتصادی هم می‌توانند به دلیل آلوده کردن محصولات کشاورزی صادراتی مشکلات زیادی به برای کشورها به وجود آورند که بهترین مثال آن تحریم گاه و بیگاه محصولات پسته صادراتی ایران به دلیل آلوده بودن آنها به آفلاتوکسین‌ها توسط اتحادیه اروپایی می‌باشد. سه روش برای خنثی‌سازی آفلاتوکسین‌های موجود در مواد غذایی شناخته شده‌است:

1- روش حرارتی، 2- روش شیمیایی، 3- روش میکروبی.

در روش حرارتی با استفاده از درجات حرارت بالا می‌توان آفلاتوکسین‌های موجود در مواد غذایی را تخریب کرده و از بین برد ولی این روش کاربردی در صنایع غذایی ندارد به دلیل اینکه حرارت دهی باعث تغییر شکل و طعم مواد غذایی شده و کیفیت محصول را از بین می‌برد. در روش شیمیایی با استفاده از ترکیباتی مثل مشتقات کلر مانند آب ژاول(هیپوکلرید سدیم) و محلولهای سفید کننده آلودگی با آفلاتوکسین‌ها را از بین می‌برند که این روش نیز به دلیل اثر تخریبی و سمیت حاصله از باقیمانده‌های این مواد شیمیایی در آفلاتوکسین زدایی مواد غذایی کاربردی ندارد و فقط از آن برای آلودگی‌زدایی محیط‌های آلوده با آفلاتوکسین‌ها استفاده می‌شود(1-4). یک شانس بسیارخوب برای کاهش آفلاتوکسین‌های موجود در مواد غذایی به وسیله انواعی از باکتریهای غیربیماریزا از گروه باکتریهای اسیدلاکتیک ایجاد شده است. گروه باکتریهای اسیدلاکتیک از 4 جنس تشکیل شده است که عبارتند از: *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لکونوستوک* و *پدیوکوکوس*. اکثریت LABها (Lactic Acid Bacteria) و تمام گونه‌های جنس لاکتوباسیلوس کاملا بی‌خطر و غیربیماریزا می‌باشند. (5). با جداسازی سویه‌هایی از LABها (به خصوص لاکتوباسیلوسها)که توانایی اتصال با آفلاتوکسین‌ها و خارج کردن آنها از محلول را داشته باشند از آنجایی که لاکتوباسیلوسها مهمترین باکتریهای پروبایوتیک انسانی هستند و برای انسان کاملا ایمن و غیر بیماری زا می‌باشند می‌توان از

www.SID.ir
Archive of SID

آنها به عنوان پروبایوتیک‌هایی استفاده کرد که از طریق اتصال با آفلاتوکسین‌های موجود در مواد غذایی خورده شده توسط انسان و حیوان در دستگاه گوارش مانع جذب توکسین شده و در نتیجه مانع آلودگی با آفلاتوکسین‌ها و همچنین مانع ترشح آفلاتوکسین‌های M1 و M2 در شیر انسان و دامها شوند. با استفاده از محصولات این سویه‌هایLAB می‌توان شیر مورد استفاده برای صنایع لبنی را آفلاتوکسین زدایی کرد بدون اینکه هیچ گونه مشکلی از نظر کیفیت ماده غذایی و وجود باقیمانده‌های مواد سمی ایجاد شود. علاوه بر آن اضافه کردن آنها به شیر باعث افزایش اثر سلامت بخشی شیر و محصولات لبنی حاصل از آن و تقویت فلور میکروبی بومی روده انسان نیز می‌شود همچنین کشت این باکتریها نیز آسان بوده و در مدت کوتاهی می‌توان حجم بالایی از باکتریها را تولید نمود(6-9).

هدف از انجام این تحقیق به دست آوردن سویه‌هایی از LABها است که به علت توانایی‌شان در جذب آفلاتوکسینها از آنها یا ترکیبات حاصل از آنها بتوان به صورت مکمل غذایی یا پروبایوتیک برای آفلاتوکسین‌زدایی و جلوگیری از جذب آفلاتوکسینها استفاده کرد.

روش بررسی

نمونه‌های مورد استفاده برای جداسازی باکتریهای گروه LAB در این آزمایش عبارت بودند از: الف- مواد غذایی(60 نمونه)، ب- نمونه‌های محیطی(20 نمونه)، ج- نمونه‌های بالینی(5 نمونه)، د- نمونه‌های آزمایشگاهی(10 نمونه)، ه- سویه‌های تهیه شده ازبانک‌های میکروبی(5 نمونه).

برای جداسازی LAB ها از منابع مختلف از دو محیط‌کشت اختصاصی MRS broth و MRS agar استفاده شد و به دلیل اینکه باکتریهای LAB عمدتا بی‌هوازی بوده و یا اینکه رشد بهتری درشرایط بی‌هوازی دارند کشت در این دو محیط کشت به صورت بی‌هوازی انجام شد(10). بدین منظور لوله‌های حاوی محیط‌کشت MRS broth را ابتدا در بن ماری 80 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه حرارت دادیم تا اکسیژن محلول در آن خارج شود سپس توسط آب سرد به سرعت محیط‌ها را خنک کردیم در مرحله بعد از نمونه‌های مایع به مقدار 1 میلی‌لیتر و از نمونه‌های جامد به مقدار1 گرم به هر لوله حاوی محیط‌کشت MRS broth تلقیح شد و سطح محیط‌کشت توسط پارافین جامد استریل ذوب شده پوشانده شد تا هم از ورود اکسیژن هوا به محیط جلوگیری شود و هم اینکه تولید گاز در اثر رشد باکتریها نیز مشخص شود. دمای انکوباسیون 37 درجه سانتی گراد و مدت آن 4 شبانه روز در نظر گرفته شد. پس از رشد کردن نمونه‌ها در محیط‌کشت مایع از آنها بر روی پلیت‌های حاوی محیط‌کشت جامد MRS agar توسط لوپ کشت چهارجهتی داده شد تا بتوان با بدست آوردن تک کلونی سویه‌های باکتریایی را از یکدیگر جدا نمود و توسط تستهای رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، پتاس 3%، تحرک، تولید اندول و احیای نیترات تعلق و یا عدم تعلق سویه‌های بدست آمده به گروه LAB مشخص گردید(10).

آفلاتوکسین B1 مورد نیاز برای این تحقیق از شرکت سیگما خریداری شد که به صورت ویال 1 گرمی حاوی پودر توکسین بود که در محلول بنزن و استونیتریل به نسبت 97:3 ریخته شده و پس از تبخیر حلال آن در بن ماری و زیر هود شیمیایی در بافر فسفات دارای pH 7/2 حل شد.

برای تعیین توانایی باکتریها در جذب AFB1 (Aflatoxin B1)و خارج کردن آن از محلول مورد آزمایش، ویالهای حاوی بافر فسفات دارای pH 7/2 تهیه شد و به آن غلظت مشخصی از سویه باکتریایی مورد نظر برابر با محلول 0/5مک‌فارلند (تقریبا 108 x 3/5 باکتری در هر میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس مقدار 1 میگروگرم AFB1 به محلول حاوی سویه باکتری مورد نظر اضافه گردید و 48 ساعت در دمای37 درجه سانتی گراد در شیکرانکوباتور گرماگذاری شد. سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) حداکثر مقدار مجاز AFB1 موجود در خوراک انسان و دام را مشخص کرده است که برابر با 20ppb (part per billion = ppb) می‌باشد که غلظت AFB1 استفاده شده در این آزمایش (1 میگروگرم) 50 برابر حد مجاز در خوراک انسان و دام است. پس از گرماگذاری محلول بافر فسفات حاوی سویه باکتری مورد نظر و AFB1، محلول را به مدت 15 دقیقه درrpm 10000 سانتریفیوژ کرده و باکتریها رسوب داده شدند سپس محلول رویی نمونه برداشته شده و برای اطمینان بیشتر از جداسازی تمام باکتریها دوباره با همان شرایط قبل سانتریفیوژ شد و محلول رویی آن برداشته شد. برای تعیین مقدار AFB1 باقیمانده در محلول مورد آزمایش از روش الایزا استفاده شد. کیت الایزای رقابتی 96 خانه‌ای آفلاتوکسین B1 خریداری شده از شرکت Veratox در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که حداقل غلظت AFB1 قابل تشخیص توسط آن 2 ppb بود.

سپس توسط روش الایزا مقدار AFB1 باقیمانده در محلول مورد آزمایش تعیین گردید و با مقدارAFB1 موجود در

Archive of SID
www.SID.ir

محلول شاهد که فاقد باکتری ولی حاوی همان مقدار AFB1 بود مقایسه شد. کاهش در مقدار AFB1 موجود در محلول مورد آزمایش نسبت به محلول شاهد نشان‌دهنده توانایی سویه باکتری مورد نظر در جذب توکسین و خارج کردن آن از محلول بود. به منظور شناسایی قطعی سویه‌های باکتریایی از روش شناسایی 16S rRNA استفاده شد و برای این کار DNA باکتری‌های مورد نظر به روش زیر استخراج گردید: 1 میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های باکتریایی کشت داده شده در محیط MRS broth به میکروتیوب‌ها منتقل شده و به مدت 5 دقیقه با دور g x 5000 سانتریفیوژ شدند مایع رویی تخلیه و به رسوب 200 میکرولیتر بافر 10 mM TrisHCl ، 1 mM EDTA , 0.1 M NaCl (set pH=8) اضافه شده و به طور کامل مخلوط گردید. سپس به مدت 10 دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن 200 میکرولیتر استات سدیم 3 مولار با pH=5.2 اضافه گردید. سپس هریک از میکروتیوب‌های فوق را 10 بار سر و ته نموده و به مدت 5 دقیقه در g x 5000 و دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی را به لوله‌های دیگر منتقل کرده و سه برابر حجم آن اتانول 100 درجه اضافه کرده و به مدت 10 دقیقه در 20- درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از آن نمونه‌ها را از فریزر خارج کرده و 5 دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار دادیم و سپس در g x 13000 به مدت 10 دقیقه و در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب 200 میکرولیتر اتانول 70 درجه اضافه گردید و پس از 5 دقیقه قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه در g x 13000 به مدت 10 دقیقه و در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تخلیه شده و لوله‌ها به صورت وارونه قرار داده شدند تا خشک شوند پس از آن 50 میکرولیتر آب مقطر تزریقی به رسوب اضافه شده و کاملا مخلوط شده و تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر 20- درجه سانتیگراد قرار داده شدند. روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید با توجه به اینکه توانایی روش الکتروفورز در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در تعیین مقدار DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد صورت گرفت(18). بنابراین نمونه‌های به دست آمده از محیط کشت به صورت سریالی یک دوم تا یک هشتادم رقیق شدند و سپس ضعیف ترین باند انتخاب شد. دمای اتصال پرایمرها، پروفایلهای حرارتی و زمان واکنش تغییر داده شدند تا بهترین شرایط PCR فراهم شود(جدول2).

جدول 1. سکانس پرایمرهای عمومی 16S rRNA انتخاب شده برای تکثیر ژنوم باکتریایی

Primers	Position 16S rRNA Sequences	Sequences(5' to 3')
U3	509 – 533	AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
U8	1517 – 1541	AAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTTC

درجه حرارتهای مختلف جهت تنظیم دوره زمانی و ایجاد شرایط بهینه شده برای PCR به شرح ذیل می باشد. دناتوراسیون اولیه در 94 درجه سانتی گراد به مدت 6 دقیقه دناتوراسیون در 94 درجه به مدت 1 دقیقه چسبیدن در 72 درجه به مدت 1 دقیقه و طویل شدن در 72 درجه به مدت 1 دقیقه که به تعداد 28 سیکل تکرار گردید. بعلاوه طویل شدن نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 7 دقیقه انجام گرفت.

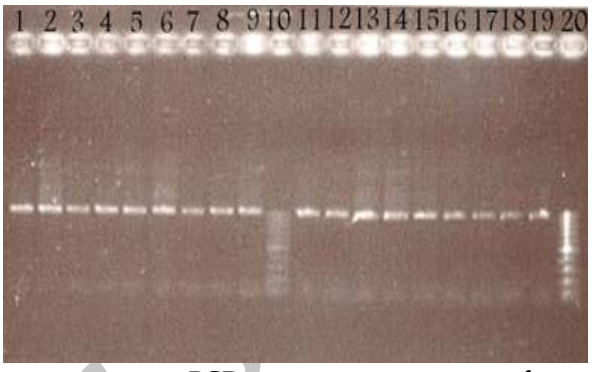
برای انجام PCR در این تحقیق تناسب غلظت مواد مصرفی بدین صورت بود. Primer U8 (0/8 پیکومول بر میکرولیتر) ، Primer U3 (0/8 پیکومول بر میکرولیتر) ، Taq Polymerase (3/5 واحد در میکرولیتر) ، 10mM dNTP (0/35 میلی‌مول) ، MgCl 50mM (0/2 میلی‌مول) و Bacterial genome (0/8 میکرولیتر). محصول واکنش PCR بر روی ژل آگاروز 1% منتقل شده و به مدت 40 دقیقه الکتروفورز شد. سپس ژل با محلول اتیدیوم بروماید به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی شده و در دستگاه ژل داکت زیر نور UV عکس برداری انجام گردید. پس از رنگ آمیزی و مشاهده صفحات ژل باندهایی یکنواخت و با وزن مولکولی یکسان (1000 bp) تشکیل شد که نشان دهنده تکثیر بخش مورد نظر از ژن 16S rRNA می‌باشد.برای تعیین توالی قطعات ژن 16S rRNA نمونه‌ها به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شده و توسط دستگاه 3730XL Automatic DNA Sequencer توالی‌یابی شدند. دو نمونه فرستاده شده دارای 1518 و 1539 باز بودند و توالی‌های به دست آمده توسط برنامه BLAST N با سایر توالیهای موجود در بانک ژن مقایسه شدند.

یافته ها

مجموعا 100 نمونه (از 5 نوع منبع ذکر شده) برای جداسازی LABها مورد بررسی قرار گرفت که از این 100 نمونه کشت

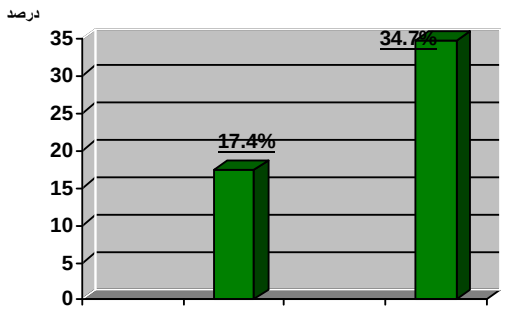
www.SID.ir
Archive of SID

داده شده و درنهایت 119 سویه باکتری اسیدلاکتیک از آنها جداسازی شد. در میان سویه‌های جداشده طی آزمون سم‌زدایی و سپس تعیین مقدار AFB1 باقیمانده توسط روش الایزا دو سویه توانایی جذب AFB_1 از محلول مورد آزمایش را از خود نشان دادند که با روش تعیین توالی 16S rRNA هویت آنها مشخص شد.



شکل 1. الکتروفورز محصول واکنش PCR برای تکثیر قطعه 16S rDNA از ژنوم باکتریها (شماره‌های 1 تا 7: قطعات تکثیر شده سویه‌های باسیلوس، شماره‌های 8 و 9: قطعات تکثیر شده سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده در این تحقیق، شماره‌های 20 و 10: استاندارد وزن مولکولی، شماره‌های 11 تا 19: قطعات تکثیر شده سویه‌های سالمونلا).

این دو سویه *Lactobacillus pentosus* و *Lactobacillus berevis* بودند. سویه *L.pentosus* 17/4٪ و *L.berevis* 34/7٪ از آفلاتوکسین B1 موجود در نمونه مورد آزمایش که برابر با 1 میکروگرم بود را جذب کرده و از محلول خارج کرده بودند(نمودار1).



نمودار1 . درصد جذب AFB1 توسط دو سویه *لاکتوباسیلوس* جدا شده

از نظر فیلوژنتیکی *Lactobacillus berevis* در حدواسط گروه‌های *Lactobacillus buchneri* و *Lactobacillus plantarum* قرار می‌گیرد و *Lactobacillus pentosus* نیز در گروه *Lactobacillus casei* قرار دارد.

بحث

تعداد کل مولکول‌های AFB1 که می‌تواند به یک باکتری زنده متصل شود بیش از 107 مولکول تخمین زده می‌شود. به جز AFB1 این باکتریها به سایر آفلاتوکسین‌ها مثل B2a , G1 , G2 , M1 , M2 , B2 و نیز سایر مایکوتوکسین‌ها هم متصل می‌شوند اما نه به اندازه‌ای که به AFB1 متصل می‌شوند. در میان این آفلاتوکسین‌ها نوع AFB1 از همه سمی‌تر بوده و بیشتر از بقیه نیز یافت می‌شود (6-8). هیچ محصول حاصل از تجزیه آفلاتوکسین‌ها و سایر مایکوتوکسین‌ها در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) از سوپرناتانت یا عصاره متانولی این باکتریها به دست نیامده است و هر دو نوع باکتریهای کشته شده با حرارت و با اسید قادر به جداسازی آفلاتوکسین‌ها و سایر مایکوتوکسین‌ها هستند که این موضوع نشان دهنده جداسازی این توکسین‌ها به روش اتصال به سطح باکتری (به عنوان مثال تئی‌کوئیک اسید موجود در دیواره سلولی) است و نه توسط متابولیسم باکتری، بنابراین زنده یا مرده بودن باکتریها نقشی در جداکردن توکسین از محلول مورد آزمایش ندارد(11).

سطح وسیعی از محل‌های اتصالی باکتریها و انواع واکنشهای موجود برای AFB1 تشخیص داده شده است. اتصال AFB1 به سطح LABها به وسیله رقابت بین قابلیت دسترسی این توکسین به محلهای اتصال سطح باکتری و یک آنتی‌بادی ضد AFB1 پلی‌کلونال در الایزای با مهار رقابتی غیرمستقیم مشخص شد. بازیافت بیش از 99٪ AFB1 متصل شده به باکتری به وسیله عصاره‌گیری با حلال نیز دلیل دیگری برای متصل شدن آفلاتوکسین‌ها به سطح این باکتریهاست(6). یافته‌ها یک پتانسیل مقرون به صرفه و تجارتی به عنوان یک روش قابل استفاده برای پاکسازی محصولات غذایی آلوده شده با مایکوتوکسین‌ها به وسیله به کاربردن سویه‌های باکتریهای اسیدلاکتیک که به طور معمول در محصولات غذایی وجود دارند ایجاد می‌کند. این روشها در هر دو حالت آزمایشگاهی و داخل مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است تا یک پروسه صنعتی برای جداسازی آفلاتوکسین‌ها و سایر مایکوتوکسین‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

از محصولات مایع آلوده مثل شیر و روغنها ابداع شود. این روش با هر دو شکل باکتریهای زنده و مرده انجام می‌گیرد(12-14).
در مطالعات مشابهی که روی باکتریهای اسیدلاکتیک برای بررسی توانایی جداسازی آفلاتوکسین B1 انجام شده مهمترین نتایجی که به دست آمده به صورت زیر است. توربیک و همکاران در سال 2007 اتصال اختصاصی آفلاتوکسین B1 موجود در مواد لبنی با باکتریهای اسیدلاکتیک را مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه توانایی این باکتریها در جذب توکسین در محیط مایع مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که فرایند جذب سریع بوده و بیش از 1 دقیقه طول نمی‌کشد. این جذب در اثر واکنش توکسین با سطح باکتری و بدون تغییر شیمیایی توکسین صورت می‌گرفت(12). کانکانپا و همکاران در سال 2004 اثر تغییرات فیزیکوشیمیایی که قابلیت جذب آفلاتوکسین B1 توسط سویه‌های شیری باکتریهای اسیدلاکتیک از مواد آلوده را افزایش می‌دادند بررسی کردند. تیمار باکتریها با هیدروکلریک اسید به طور مشخص توانایی باکتریها در جذب آفلاتوکسین B1 را نسبت به باکتریهای تیمار نشده افزایش می‌داد(11).
هاسکارد و همکاران درسال 2000 اثر فاکتورهای مختلف را روی جذب آفلاتوکسین B1 توسط *Lactobacillus rhamnosus*سویه GG مورد مطالعه قرار دادند. اتصال آفلاتوکسین B1 به سویه GG در انتهای فاز رکود صورت می‌گیرد. مطالعات روی باکتریهای زنده، کشته شده با گرما و کشته شده با اسید با روشهای یکسانی انجام شد(10). پلتونن و همکاران در سال 2001 دو سویه *L.amylovorus* و *L.rhamnosus* جداکردند که قادر بودند بیش از 50% آفلاتوکسین B1 را از محلول مورد آزمایش جدا کنند(13). گراتز و همکاران در سال 2004 دو باکتری *L.rhamnosus* سویه GG و *L.rhamnosus* سویه LC-705 را مورد بررسی قرار دادند و دیدند که این دو باکتری به ترتیب 23% و 61/2٪ آفلاتوکسین B1 موجود در محلول را جدا کردند(15). النظامی و همکاران در سال 2002 دو سویه *Lactobacillus* به دست آوردند که توانایی جداسازی 44% از آفلاتوکسین B1 موجود در محلول را داشتند(16).

نتیجه گیری

این تحقیق نشان می‌دهد که دو سویه بومی *لاکتوباسیلوس* یعنی *L. pentosus* و *L. berevis* به ترتیب توانایی جداسازی 17/4٪ و 34/7٪ از AFB1 موجود در نمونه را با سطح اطمینان 95% بر اساس آزمون دو جمله‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 را دارند.

References

1- Abdolamir A, Razagi Abyane M. Mycotoxins. Emam Hossein Univ.1380, 35-79.
2- Boutrif E. Aflatoxin and food safety and aflatoxin prevention programmes. *Pistachio*.2006; 14(5):27-28.
3- Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Pharmacol toxicol*.2004; 34(3):135-172.
4- Hernandez-Mendoza A, Guzman-de-Pena D, Garcia HS. Key role of teichoic acids on aflatoxin B binding by probiotic bacteria. *J Appl Microbiol* 2009; 107(2):395-403.
5- Hernandez-Mendoza A, Gonzalez-Cordova AF, Vallejo-Cordoba B, Garcia HS. Effect of oral supplementation of Lactobacillus reuteri in reduction of intestinal absorption of Aflatoxin B1 in rats. *J Basic Microbiol*. 2011; 51(3):8-26.
6- Fernandez MG, Muzzolon JA, Dalcero A, Magnoli CE. Effect of acid lactic bacteria isolation from faeces of healthy dogs on growth parameters and Aflatoxin B1 production by Aspergillus species in vitro. *Mycotoxin research*. 2011; 27(4):273-280.
7- Fazeli MR, Hajimohammadali M, Moshkani A, Samadi N, Jamalifar H, Khoshayand MR, Vaghari E, Pouragahi S. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *J Food Prot*. 2009; 72(1):92-189.
8- Hernandez-Mendoza A, Guzman D, Fernandez-Gonzalez A, Vallejo-Cordoba B,Garcia HS. In vivo assessment of the potential protective effect of Lactobacillus casei Shirota against Aflatoxin B1. *Dairy Science & Technology*. 2010; 90(6):729-740.
9- Halttunen T, Collado MC, El-Nezami H, Meriluoto J, Salminen S. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46(2):5-160.
10- Biernasiak J, Piotrowska M, Libudzisz Z. Detoxification of Mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens. *Mycotoxin Research*. 2006; 22(4):230-235.
11- Kankaapaa P, Salminen S, Ahokas JT. Biologic control of food carcinogen using lactobacillus GG. *Nutr Today*.2007; 31: 41-43.
12- Turbic A, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. *App Environ Microbial*.2008;70: 3014-3020.
13- Khanafari A, Soudi H, Miraboulfathi M, Osboo RK. An in vitro investigation of Aflatoxin B1 biological control by Lactobacillus plantarum. *Pak j Bio sci*. 2007; 10(15):6-25.
14- Pierides M, Elnezami HS, Peltonen K, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin B_1 an a food model. *J food prot*.2005; 36:645-650.
15- Gratz CA, Ahokas JT, Turbic A. Selective in vitro binding of dietary aflatoxin B individually or in combination by lactic acid bacteria. *Food add cont*.2006; 19:144-152.

Archive of SID

www.SID.ir