

# ارزیابی تاثیر مهار کننده‌ی باسیلوس لیکنی فورمیس بر آفاتوکسین‌های B1 و B2 در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی کیلکا

مهرداد ولی پور مری<sup>۱</sup>، ابراهیم علیزاده دوغیکلایی<sup>۲</sup>، رضا صفری<sup>۳</sup>، علی ارشدی<sup>۴</sup>، محمد رضا سعیدی اصل<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه زابل

<sup>۲</sup> استادیار گروه شیلات دانشگاه زابل (مسئول مکاتبات: پست الکترونیک: fisheries2008@yahoo.com)

<sup>۳</sup> مربی پژوهشی موسسه‌ی تحقیقات شیلات ایران

<sup>۴</sup> مربی گروه شیلات دانشگاه زابل

<sup>۵</sup> استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

## چکیده

آفاتوکسین‌های مورد استفاده جهت تلفیح، از تیپ‌های B1 و B2 بوده که در محیط کشت آزمایشگاهی از دو غلظت (۱۲ و ۱۶ نانوگرم بر میلی لیتر برای B1 و ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر برای B2) استفاده گردید. دوز مورد استفاده باسیلوس نیز دو غلظت ۳ و ۴ درصد بوده است. غلظت‌های مورد استفاده در آرد ماهی کیلکا به ترتیب ۲ و ۴ میلی لیتر از استاندارد آفاتوکسین به ۵۰ گرم از آرد ماهی و دوز مورد استفاده باکتری نیز ۳ و ۴ درصد بوده است. میزان تغییرات باسیلوس و آفاتوکسین به ترتیب با جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فاز آزمایشگاهی نشان داد که به هنگام استفاده از دوز ۳ درصد باسیلوس لیکنی فورمیس، میزان کاهش B1 با غلظت‌های ۱۲ و ۱۶ نانوگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۸۸/۶ و ۸۴/۷ درصد و B2 با غلظت ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۹۸/۱ و ۹۲/۴ درصد، میزان کاهش در دوز ۴ درصد باسیلوس لیکنی فورمیس به ترتیب ۹۵/۲ و ۹۰/۶ درصد برای B1 با غلظت‌های ۱۲ و ۱۶ نانوگرم بر میلی لیتر و ۹۹/۱ و ۹۷/۳ درصد برای B2 با غلظت ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر بوده است. میزان کاهش آفاتوکسین در آرد ماهی برای تیپ B1 و B2 با حضور ۳ و ۴ درصد باسیلوس لیکنی فورمیس به همراه ۲ و ۴ میلی لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد برای B1 به ترتیب ۷۶/۵ و ۷۰/۶ درصد و ۹۶/۹ و ۸۰/۴ درصد و برای B2 به ترتیب ۷۷/۵ و ۹۰/۴ درصد و ۹۷/۴ و ۹۴/۸ درصد بوده است. نتیجه گیری کلی که از این طرح حاصل می‌شود آن است که باسیلوس لیکنی فورمیس قادر به کاهش تیپ‌های شاخص آفاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی و آرد ماهی بوده، می‌توان از آن به‌عنوان ابزار بیولوژیک در جهت کنترل آفاتوکسین استفاده کرد و با دوزهای مشخص به آرد ماهی اضافه نمود.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس لیکنی فورمیس، آفاتوکسین، آرد ماهی کیلکا.

۱- مقدمه

یکی از اصول مهم در کاهش بروز بیماری در حیوانات، کنترل آلودگی در خوراک دام و طیور می‌باشد؛ زیرا وجود آلودگی در جیره‌ی غذایی، باعث بروز بیماری در حیوان می‌شود. در اکثر موارد، این بیماری به صورت اپیدمی ظاهر شده، تلفات سنگینی را به همراه دارد و ضررهای اقتصادی زیادی را متوجه‌ی پرورش دهنده می‌سازد. از طرف دیگر، به دنبال مصرف حیوان آلوده به بیماری توسط انسان، عامل بیماری به انسان انتقال یافته، باعث بروز بیماری در انسان می‌گردد (۵ و ۱۳).

مطابق با آمار FAO و FDA تقریباً ۲۵ درصد از دانه‌های زراعی جهان، آلوده به میکوتوکسین‌ها هستند و طبق گزارش WHO میکوتوکسین‌ها به ویژه آفلاتوکسین یکی از عوامل موثر در بروز بیماری‌های ناشی از مصرف غذا گزارش شده است (۱۰ و ۱۳). از میان انواع تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین، تیپ‌های  $B_1, B_2, G_1, G_2$  به عنوان آفلاتوکسین‌های اصلی مطرح می‌باشند. این دسته از سموم قارچی به ویژه آفلاتوکسین  $B_1$  دارای اثرات سمی، سرطانزایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی در انسان و حیوانات می‌باشند (۴، ۵، ۱۴ و ۲۱).

به منظور حذف یا کاهش میکوتوکسین‌ها در جیره‌ی غذایی حیوانات، از روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک استفاده شده است ولی نتایج حاصله در ارتباط با کاهش فیزیکی و شیمیایی چندان رضایت بخش نبوده است. امروزه استفاده از میکروب‌ها و آنزیم‌های تولید شده از آن‌ها به عنوان روش‌های بیولوژیک بیش تر مورد توجه قرار گرفته است. Vargal و همکارانش از قارچ‌های رشته ای گروه آسپرژیلوس، ریزوپوس و موکور به منظور تجزیه اخراتوکسین، آفلاتوکسین  $B_1$ ، زرالئون (zeraleon)، پاتولین (patulin) و دوزوکسی نیوالنول (deoxynivalenole) استفاده کرده، نتایج نشان می‌دهد که برخی از گونه‌های قارچ‌های مذکور قادر به تجزیه سموم فوق می‌باشند (۲۲).

یکی از روش‌های کاهش میکوتوکسین‌ها استفاده از باسیلوس‌ها می‌باشد. یکی از باسیلوس‌ها مورد استفاده، باسیلوس لیکنی فورمیس است. در مطالعه‌ی انجام شده توسط Santin و همکارانش از باسیلوس لیکنی فورمیس به منظور کاهش اخراتوکسین A در جیره‌ی غذایی جوجه استفاده شده

است و تأثیر تیمارهای مختلف حاوی اخراتوکسین A به همراه باسیلوس لیکنی فورمیس بر پارامترهای مختلف مثل جذب مواد غذایی، ضریب تبدیل غذایی، وزن، وزن نسبی کبد و کلیه، مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵). Stanley و همکارانش در مطالعه‌ی خود از باسیلوس لیکنی فورمیس در جیره‌ی غذایی ماکیان، با هدف کاهش اثرات جانبی بیماری آفلاتوکسیکوزیس، استفاده کرده، نتایج حاصله رضایت بخش بوده است (۲۰). Santin و همکارانش از باسیلوس لیکنی فورمیس به منظور کاهش آفلاتوکسین در جیره‌ی غذایی ماکیان با تأکید بر بهبود موکوس گوارشی و تقویت سیستم ایمنی استفاده کردند (۱۸). Santin و همکارانش تأثیر دیواره‌ی سلولی باسیلوس لیکنی فورمیس بر جذب ماده‌ی غذایی، ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که پلی‌ساکارید موجود در دیواره‌ی سلولی، دارای تأثیرات مثبت بر پارامترهای ذکر شده بوده است (۱۷).

در دریای خزر ۳ نوع ماهی کیلکا وابسته به جنس *Clupeonella* و از خانواده‌ی شک ماهیان یا هرینگ‌ها (*Clupeidae*) بنام‌های کیلکا آنچوی (*C. engrauliformis*)، چشم درشت (*C. grimmi*) و معمولی (*C. delicatula*) زندگی می‌کنند. میزان صید ماهیان کیلکا در سال ۱۳۸۶ برابر ۱۵۴۰۰ تن بوده است. در حال حاضر به دلیل مشکلات موجود در حمل و نقل کیلکا و امکان فساد سریع آن فقط ۴٪ از کیلکای صید شده به مصارف انسانی رسیده، ۹۶٪ از آن در کارخانه‌های منطقه به آرد ماهی تبدیل می‌شود. شرایط تولید آرد ماهی کیلکا، نگه‌داری و ذخیره‌ی آن در کف کارخانه و همچنین شرایط انبارداری، امکان زیاد آلودگی آن به قارچ‌های مختلف از جمله آسپرژیلوس را فراهم می‌کند. متعاقب رشد قارچ، آفلاتوکسین تولید شده که مشکل ساز خواهد بود. بنابراین، آزمایش مستمر آرد ماهی تولید شده از نظر قارچ‌های توکسین‌زا و بررسی کمی و کیفی آفلاتوکسین‌ها در آن و ارائه‌ی راه‌کارهای مناسب در جهت کاهش بار آلودگی، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق از باسیلوس لیکنی فورمیس برای کاهش تیپ‌های  $B_1$  و  $B_2$  آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی استفاده شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

آفاتوکسین‌های مورد استفاده جهت تلقیح، تیپ‌های B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> بوده که غلظت مورد استفاده در محیط کشت آزمایشگاهی برای B<sub>1</sub>، ۱۲ و ۱۶ نانوگرم بر میلی لیتر و برای تیپ B<sub>2</sub> ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر بود. دوز ۱۲، دوز استاندارد آفاتوکسین و دوز ۱۶، دوز خارج از دامنه‌ی استاندارد آفاتوکسین در آرد ماهی کیلکا می‌باشد. باسیلوس مورد استفاده باسیلوس لیکنی-فورمیس PTCC 1355 بوده که از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. به منظور تهیه‌ی سوسپانسیون باسیلوس، ابتدا باسیلوس را در محیط تریپتیک سویا برات یا آگار کشت داده، پس از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری (انکوباسیون) در دمای ۳۰ درجه و رساندن باسیلوس به فاز رشد لگاریتمی، مقدار ۳ و ۴ درصد از سوسپانسیون تهیه شده به محیط مایع حاوی آفاتوکسین انتقال داده شد. پس از اضافه نمودن باسیلوس و آفاتوکسین‌ها به محیط مایع و انتخاب تیمارهای مختلف، روند آزمایش در زمان‌های ۰، ۵ و ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی تغییرات رشد، جذب نوری باسیلوس در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکترومتر قرائت و جهت بررسی تیپ‌های آفاتوکسین (در محیط کشت آزمایشگاهی) نیز از دستگاه HPLC استفاده گردید و با در دست داشتن سطح زیر منحنی هریک از آفاتوکسین‌های مورد استفاده و نمونه‌های آزمایشی تزریق شده به دستگاه، مقدار نهایی هر یک از آفاتوکسین‌ها تعیین شد. مشخصات دستگاه HPLC برای اندازه گیری آفاتوکسین به صورت زیر است: دستگاه HPLC مدل ۴۹۰۰-۴۵۰۰ Cecil، دکتور: فلئورسانس، ستون: ODS، میزان تزریق: ۱۰۰ میکرو لیتر استاندارد: (SIGMA) G1, G2, B1, B2، حلال: آب، استونیتریل، متانول (۲، ۳، ۶ و ۱۲).

انجام آزمایش‌های تجزیه‌ی بیولوژیک آفاتوکسین در آرد ماهی قبل از انجام آزمایش‌ها و تیمارها در این مرحله، آرد ماهی از نظر وجود آفاتوکسین B مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده به ترتیب ۲ و ۴ میلی لیتر از استاندارد آفاتوکسین به ۵۰ گرم از آرد ماهی بوده، دوز مورد استفاده باسیلوس لیکنی فورمیس نیز ۳ و ۴ درصد بوده است. علت استفاده از غلظت‌های فوق آن است که آفاتوکسین اضافه شده تحت تاثیر واکنش‌های دیگر نظیر فوتواکسیداسیون تجزیه شده و در نتیجه از مقدار آن کاسته می‌شود. پس از اضافه نمودن استاندارد آفاتوکسین به آرد ماهی و مخلوط کردن آن، نمونه‌ها در یک مکان تاریک با دمای ۲۵ درجه نگه داری شده، در زمان‌های مشابه فاز آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. با این تفاوت که در این مرحله فقط تغییرات آفاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفت (۲، ۳، ۶ و ۱۲).

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار SPSS و تست Anova یک طرفه و به منظور وجود ارتباط معنی‌دار ما بین هریک از گروه‌ها از تست Duncan استفاده و در نهایت ارزش P مشخص گردید.

## ۳- نتایج و بحث

نتایج تجزیه‌ی بیولوژیک تیپ‌های B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> آفاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی در جدول‌های ۱ تا ۵ نشان داده شده است. نتایج فاز آزمایشگاهی نشان می‌دهد که به-هنگام استفاده از باسیلوس لیکنی فورمیس در دوز ۳ درصد، میزان کاهش آفاتوکسین B<sub>1</sub> در دو غلظت ۱۲ و ۱۶ به ترتیب ۸۸/۶ و ۸۴/۷ درصد و میزان کاهش تیپ B<sub>2</sub> در دو غلظت ۸ و ۱۲ به ترتیب ۹۸/۱ و ۹۲/۴ درصد بوده است (p < ۰/۰۵).

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود به هنگام استفاده از باسیلوس لیکنی فورمیس در دوز ۴ درصد، میزان کاهش  $B_1$  در غلظت ۱۲ و ۱۶ نانو گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۹۵/۲ و ۹۰/۶ درصد و تیپ  $B_2$  با غلظت ۸ و ۱۲ نانو گرم بر میلی‌لیتر با کاهش ۹۹/۱ و ۹۷/۳ همراه بوده است. غلظت هر چهار تیپ آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روندی نزولی داشته، نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است ( $p < 0/05$ ). بیش‌ترین درصد کاهش، ۹۹/۱ درصد بوده که مربوط به تیپ  $B_2(8)$  می‌باشد.

نتایج نشان می‌دهد که به‌هنگام استفاده از باسیلوس لیکنی- فورمیس با دوز ۳ درصد، میزان کاهش  $B_1$  در دو غلظت ۱۲ و ۱۶ به ترتیب ۸۸/۶ و ۸۴/۷ درصد و میزان کاهش تیپ  $B_2$  در دو غلظت ۸ و ۱۲ به ترتیب ۹۸/۱ و ۹۲/۴ درصد بوده است ( $p < 0/05$ ) (جدول ۱). همچنین نتایج نشان می‌دهد که غلظت هر دو تیپ آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روند نزولی داشته، بیش‌ترین میزان کاهش ۹۸/۱ درصد و مربوط به تیپ  $B_2(8)$  بوده است.

جدول ۱- نتایج کاهش آفلاتوکسین در حضور ۳٪ باسیلوس لیکنی فورمیس (نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۱۶  $B_1 =$  و ۸  $B_2 =$ ) در مقیاس آزمایشگاهی ( میانگین و انحراف معیار)

آفلاتوکسین				زمان (روز)
$B_2(12)$	$B_1(16)$	$B_2(8)$	$B_1(12)$	
a۰/۵۷±۷۵/۸	a۰/۵۷±۶۴/۱۳	a۲۲/۰±۹۱/۶	a۲۷/۰±۴۸/۹	صفر
b۵۱/۰±۵۹/۳	b۳۳/۰±۳۳/۵	b۱۲/۰±۴۲/۲	b۱۳/۰±۰۶/۴	۵
c۰/۱۱±۰/۶۶	c۱۴/۰±۰/۸/۲	c۰/۲/۰±۱۳/۰	c۱۴/۰±۰/۸/۱	۱۰

جدول ۲- نتایج کاهش آفلاتوکسین در حضور ۴٪ باسیلوس لیکنی فورمیس (نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۱۶  $B_1 =$  و ۸  $B_2 =$ ) در مقیاس آزمایشگاهی ( میانگین و انحراف معیار)

آفلاتوکسین				زمان (روز)
$B_2(12)$	$B_1(16)$	$B_2(8)$	$B_1(12)$	
a۳۳/۰±۳۲/۸	a۵۷/۰±۸۹/۱۳	a۳۰/۰±۶۰/۶	a۱۴/۰±۴/۹	صفر
b۴۴/۰±۸۲/۲	b۳۹/۰±۷۲/۳	b۵۰/۰±۸۲/۱	b۵۵/۰±۹۶/۲	۵
c۰/۳/۰±۲۲/۰	c۱۹/۰±۳۰/۱	c۰/۸/۰±۰/۰۶	c۲۸/۰±۴۵/۰	۱۰

تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنی فورمیس در زمان‌های مختلف به‌هنگام استفاده از غلظت ۳ و ۴ درصد باسیلوس در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان افزایش رشد باسیلوس بعد از ۱۰ روز، در غلظت‌های (۱۶ و ۱۲) B1 به ترتیب ۹۲/۴۳ و ۹۱/۰۷ درصد بوده و (۱۲ و ۸) B2 به ترتیب ۹۰/۲ و ۸۹/۳ درصد بوده، در نتیجه، افزایش جذب نوری باسیلوس در زمان‌های مختلف معنی دار بوده است ( $p < 0/05$ ). همچنین تغییرات جذب نوری باسیلوس در دو غلظت ۳ و ۴ درصد نسبت به هم معنی دار بوده ( $p < 0/05$ ) ولی ما بین دوزهای مختلف آفاتوکسین ارتباط معنی داری وجود نداشته است. جذب نوری (OD) در هر دو تیپ آفاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روندی کاملاً صعودی داشته، نتایج حاصله نیز معنی دار بوده است و بیش‌ترین درصد افزایش مربوط به تیپ B1 با غلظت (۱۲) برابر با ۹۲/۴۳ درصد بوده است. نتایج فاز آزمایشگاهی نشان می‌دهد که به‌هنگام استفاده از باسیلوس لیکنی فورمیس با دوز ۳ درصد، به‌همراه ۲ و ۴ میلی-لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا موجب کاهش میزان توکسین در هر دو تیپ شده است و غلظت آفاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روندی نزولی داشته و نتایج حاصله نیز معنی دار بوده است ( $p < 0/05$ ). بیش‌ترین درصد کاهش توکسین مربوط به تیپ (۳/بناکتری و ۴ میلی B2) برابر با ۹۰/۴ درصد بوده است.

جدول شماره ۳- نتایج جذب نوری باسیلوس لیکنی فورمیس در محیط کشت آزمایشگاهی در زمان‌های مختلف (نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۸  $B_1 = 12$  و  $B_2 = 16$ ) در مقیاس آزمایشگاهی ( میانگین و انحراف معیار)

جدول شماره ۳- نتایج جذب نوری باسیلوس لیکنی فورمیس در محیط کشت آزمایشگاهی در زمان‌های مختلف (نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۸  $B_1 = 12$  و  $B_2 = 16$ ) در مقیاس آزمایشگاهی ( میانگین و انحراف معیار)

آفاتوکسین				
زمان (روز)	۱	۲	۳	۴
صفر	$a.03/0 \pm 37/0$	$a.05/0 \pm 38/0$	$a.03/0 \pm 46/0$	$a.01/0 \pm 44/0$
۵	$b.16/0 \pm 33/3$	$b.42/0 \pm 41/3$	$b.14/0 \pm 84/3$	$b.19/0 \pm 76/3$
۱۰	$c.37/0 \pm 89/4$	$c.06/0 \pm 26/4$	$c.11/0 \pm 74/4$	$c.03/0 \pm 12/4$

\* ۱: آفاتوکسین B1 به میزان ۱۲ نانو گرم بر میلی‌لیتر و B2 به میزان ۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر غلظت باکتری ۳٪.

\* ۲: آفاتوکسین B1 به میزان ۱۶ نانو گرم بر میلی‌لیتر و B2 به میزان ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر غلظت باکتری ۳٪.

\* ۳: آفاتوکسین B1 به میزان ۱۲ نانو گرم بر میلی‌لیتر و B2 به میزان ۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر غلظت باکتری ۴٪.

\* ۴: آفاتوکسین B1 به میزان ۱۶ نانو گرم بر میلی‌لیتر و B2 به میزان ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر و غلظت باکتری ۴٪.

جدول ۴- نتایج کاهش آفاتوکسین در حضور ۳٪ باسیلوس لیکنی فورمیس به‌همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا ( میانگین و انحراف معیار)

آفاتوکسین				زمان (روز)
$B_1$ (۲ میلی لیتر)	$B_2$ (۲ میلی لیتر)	$B_1$ (۴ میلی لیتر)	$B_2$ (۴ میلی لیتر)	
$a.08/2 \pm 59/51$	$a.25/0 \pm 51/6$	$a.44/1 \pm 92/1.06$	$a.73/0 \pm 32/13$	صفر
$b.89/0 \pm 13/26$	$b.32/0 \pm 75/3$	$b.65/2 \pm 33/53$	$b.56/0 \pm 86/5$	۵
$c.31/0 \pm 11/12$	$c.24/0 \pm 46/1$	$c.56/1 \pm 38/31$	$c.30/0 \pm 27/1$	۱۰

جدول ۵- نتایج کاهش آفلاتوکسین در حضور ۰.۴٪ باسیلوس لیکنی فورمیس به همراه ۲ و ۴ میلی لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا ( میانگین و انحراف معیار)

آفلاتوکسین				
زمان (روز)	(۲ میلی لیتر) $B_1$	(۲ میلی لیتر) $B_2$	(۴ میلی لیتر) $B_1$	(۴ میلی لیتر) $B_2$
صفر	a۱۲/۱±۹۱/۵۱	a۲۹/۰±۵۸/۶	a۹۸/۰±۴۵/۱۰۷	a۲۹/۱±۹۷/۱۲
۵	b۷۲/۰±۵۹/۱۲	b۴۸/۰±۱۸/۲	b۴۱/۱±۲۲/۴۰	b۴۷/۰±۶۵/۴
۱۰	c۵۷/۰±۵۷/۱	c۰۶/۰±۱۷/۰	c۷۳/۰±۰۱/۲۱	c۱۲/۰±۶۷/۰

این باسیلوس دارای ۴۰ تا ۴۵ درصد پروتئین بوده، سرشار از ویتامین‌های گروه B می‌باشد. نتایج نشان داده که به‌هنگام استفاده از دیواره‌ی سلولی این باسیلوس، میزان آفلاتوکسین و سایر توکسین‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. دیواره‌ی سلولی باسیلوس لیکنی فورمیس حاوی الیگو ساکاریدهایی بوده که مکانیسم‌های مختلف پیوند با توکسین را فراهم می‌نمایند (پیوندهای هیدروژنی، یونی و هیدروفوبی). به ازای هر گرم از دیواره‌ی سلولی باسیلوس، ۲/۶ میلی گرم از سم زرانئون جذب می‌گردد. فرآیند اتصال به توکسین به سرعت انجام گرفته، در عرض ۱۰ دقیقه فرآیند کامل می‌گردد (۱۵ و ۱۶).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که باسیلوس لیکنی- فورمیس مورد استفاده، قادر به کاهش تپ‌های مختلف آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی می‌باشد ولی با وجود این، میزان کاهش آفلاتوکسین در آرد اندکی کم تر بوده است که این امر به دلیل در دسترس نبودن آفلاتوکسین در محیط جامد بوده در صورتی که در محیط برات، آفلاتوکسین در دسترس باسیلوس بوده و واکنش تجزیه و غیر فعال کردن آن با سرعت بیش‌تری انجام می‌گیرد. تحقیقات مختلفی در ارتباط با استفاده از مواد جاذب شیمیایی و بیولوژیک در مواد غذایی و خوراک طیور انجام گرفته است. خسروی و همکارانش از ساکارومیسس سرویزیه، ژئولیت و بی‌سولفیت سدیم به منظور کاهش آفلاتوکسین در زنجیره‌ی غذایی جوجه‌های گوشتی استفاده کرده و تاثیر آن‌ها بر پارامترهایی نظیر رشد، ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌ی حاوی آفلاتوکسین به-

نتایج جدول شماره‌ی (۵) نشان می‌دهد که استفاده از باسیلوس لیکنی فورمیس با دوز ۴ درصد به همراه ۲ و ۴ میلی لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا موجب کاهش میزان توکسین‌ها در هر دو تپ شده است. غلظت هر دو تپ آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روند نزولی داشته و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است (۰/۰۵ < p). بیش‌ترین درصد میزان کاهش توکسین مربوط به تپ (۰.۴٪/باکتری و ۴ میلی B2) برابر با ۹۷/۴ درصد بوده است.

مطالعات مختلفی در ارتباط با کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماریزا و متابولیت‌های آن‌ها توسط باسیلوس و مخمر انجام گرفته است. نتایج نشان داد که باسیلوس لیکنی فورمیس دارای اثر مهار کننده بر فعالیت قارچ‌های بیماریزا فوق بوده‌اند. مهم‌ترین فاکتور مهارکننده‌ی رشد کپک، کاهش مواد غذایی در محیط است که باسیلوس‌ها با رشد خود و رقابت با کپک باعث این امر می‌شوند (۲۲). باسیلوس‌ها به دلیل مزایایی نظیر نیازمندی‌های ساده غذایی، توانایی رشد در فرماتور در حضور محیط کشت ارزان قیمت، توانایی زنده ماندن در شرایط محیطی متفاوت و عدم تولید ترکیبات سمی از اهمیت خاصی برخوردار بوده، از آن‌ها به‌عنوان ابزارهای بیولوژیک در زمینه‌ی کنترل آلاینده‌های میکروبی و متابولیت‌های سمی از آن‌ها در مواد غذایی استفاده می‌شود (۱۵ و ۱۶). به‌هنگام استفاده از باسیلوس‌ها یا از سلول کامل استفاده شده یا آن‌ها که از دیواره‌ی سلولی آن به منظور کاهش آفلاتوکسین استفاده می‌گردد. باسیلوس لیکنی فورمیس از ارگانسیم‌هایی است که به‌عنوان ماده‌ی جاذب بیولوژیک آفلاتوکسین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

گیرد. آرد ماهی کیلکا پس از تولید به علت گرم بودن در کف کارخانه نگه داری شده که گرمای بالای آن باعث جذب رطوبت محیط و در نتیجه محیط مناسب برای رشد و تکثیر اسپوره‌های قارچی فراهم می‌شود. از طرفی کنترل مستمر دستگاه‌ها، محیط‌های مورد استفاده از نظر آسپرژیلوس حائز اهمیت می‌باشد (۷، ۸، ۹، ۱۹ و ۲۳).

#### ۴- نتیجه گیری

نتیجه‌گیری کلی که از طرح حاصل می‌شود آن است که باسیلوس لیکنی فورمیس قادر به کاهش تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی و آرد ماهی بوده و می‌توان از آن به عنوان ابزار بیولوژیک در جهت کنترل آفلاتوکسین استفاده کرده، با دوزهای مشخص به آرد ماهی اضافه نمود. با توجه به مطالعات انجام گرفته، پیشنهاد می‌شود که از باکتری مذکور به منظور کاهش سایر سموم قارچی نظیر اخراآتوکسین، فوزاریوتوکسین و... در دو مقیاس آزمایشگاهی و آرد ماهی نیز استفاده گردد.

#### ۵- منابع

- ۱- خسروی، ع. مدیرصنای، م. ۱۳۷۸، مقایسه‌ی برخی از روش‌های مورد استفاده در کاهش اثرات آفلاتوکسین بر روی شاخص‌های تولیدی جوجه‌های گوشتی، *مجله‌ی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران*، دوره‌ی ۵۴، شماره‌ی ۲، ۶۶ - ۵۹.
- 2- AOAC Official Methods, 1999. Aflatoxin B1 and Total Aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder immunoaffinity column liquid chromatography with Post-Column Derivatization, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17<sup>th</sup> Edition, Volum II, Chapter 49 Natural Toxins.
- 3- Adsule, R.N. Salunkhe, D.K. 1984. *Aflatoxins in foods and feeds*. Metropolitan Book Co. 17: 231-265.
- 4- Chantawannakul, P., Onchaeroen, A., Klanbut, K., Chukeatorite, E., and Lumyong, S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*. 28: 241-245.
- 5- CAST. 1989. Mycotoxins. Economic and health risks. Task Force Rep. No. 116. November 1989. *Council for Agricultural Science and Technology*, Ames, IA. 13: 147 -153

همراه ساکارومیسس سرویزیه، دارای بالاترین وزن، کم‌ترین درصد تلفات و بهترین تبدیل غذایی بودند. نتایج تحقیق خسروی و همکارانش تایید کننده‌ی مطالعه حاضر می‌باشد (۱).  
مطالعات Huwing و همکارانش نشان داد که مواد بیولوژیک مثل مخمرها و باکتری‌ها به طور غیر اختصاصی عمل کرده و بر اساس نوع آنزیم تجزیه کننده و یا غیر فعال کننده‌ی میکروارگانیسم، روند واکنش متفاوت بوده و سموم مختلف دیگر، تحت تاثیر خواهند گرفت (۱۱). نتایج مطالعه‌ی مذکور تایید کننده‌ی مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. به عبارت دیگر، تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین، به علت ساختار مولکولی مشابه، تحت تاثیر تجزیه باسیلوس لیکنی فورمیس قرار گرفته اند. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان کاهش تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی در غلظت ۳ درصد باسیلوس لیکنی فورمیس بین ۸۸/۶ تا ۹۸/۱ درصد، در غلظت ۴ درصد ۸۴/۷ تا ۹۲/۴ درصد و این میزان کاهش در آرد ماهی با غلظت ۳ درصد باسیلوس لیکنی فورمیس به همراه ۲ و ۴ میلی-لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین بین ۷۰/۰۸۰ تا ۹۰/۶ درصد و در غلظت ۴ درصد باسیلوس به همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین بین ۸۰/۴ تا ۹۶/۹ درصد متغیر بوده است.

آرد ماهی یکی از اجزای تشکیل دهنده‌ی غذای کنسانتره آبزیان بوده، در اکثر موارد از ماهی کامل مثل ماهی کیلکا، ساردین، کاپلین و یا ضایعات آن‌ها نظیر ماهی منهدان (Menhaden) و هرینگ تهیه می‌گردد. آلودگی آرد در هنگام تولید، جمع کردن در کف کارخانه و یا انبارداری رخ می‌دهد. یکی از راه‌های آلودگی آرد ماهی، مخلوط نمودن آن با غذاهایی با منشاء گیاهی بوده که در اکثر موارد آلوده به آفلاتوکسین می‌باشند. بنابراین، جیره‌ی غذایی باید به گونه‌ای انتخاب شود که عاری از هر نوع غذای آلوده به آفلاتوکسین باشد. بر اساس گزارش FAO وجود مایکوتوکسین‌ها در غذای آبزیان در آسیای جنوب شرقی بسیار بالا می‌باشد. آلودگی جیره‌ی غذایی ماهیان پرورشی به آفلاتوکسین مشکل اساسی در نواحی گرمسیری بوده که علت عمده‌ی آن فرآوری ناقص آرد و روش‌های نگه داری نامناسب آن بوده است. به منظور کاهش آفلاتوکسین در آرد باید مواردی نظیر خشک کردن به موقع آرد و کاهش رطوبت آن به ۱۱ تا ۱۲ درصد و یا پائین تر، مورد توجه قرار

- 20- Stanley V. G., Ojo R., Woldesenbet S., and Hutchinson, D. H. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*. 72: 1867-1872.
- 21-Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 141-158.
- 22-Vargal, J., Rigol, K. and Taboril, K. 1998. Degradation of mycotoxins by filamentous fungi. *Int. J. Food. Microbiol.* 43 : 141-158.
- 23- Yiannikouris A. and Jouany J. 2002. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. *Animal Research*. 51: 81-99.
- 6-Commission Directive 98/53/EC of sampling & analysis methods for control levels for certain contaminations in foods stuffs. 1998. *FAO*. 42: 117-125
- 7- Dragoni, I., Cantoni, C., Papa, A. and Vallone, L. 2000. *Muffe, alimenti ecotossicosi. Citta' Studi Edizioni*. UTET Libreria srl, Milano, Italia. ISBN. 19: 188 -251
- 8- Dutta, T.K. and Das, P. 2000. Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxins B1 from feeds in India. *Mycopathologia*. 151: 29 -33.
- 9- Hagler, W.M. 1998. Potential for detoxification of mycotoxin, *Contaminated Commodities*. 76: 233-243.
- 10- Hussein S.H. and Brasel J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101-134.
- 11- Huwing, A. Freimund, S. and Kappeli, O. 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*. 122: 179-188.
- 12- Hyogo International Center. 1999. Japan International Cooperation Agency- *Textbook for group training course in mycotoxin inspection in food*. 9:129-133
- 13-Moss, M.O. 1996. The environmental factors controlling mycotoxin formation and animal foods. 100: 513-523
- 14- Paskevicius, A. Bakutis, B. and Baliukoniene, V. 2006. The search for ecologically safe means of mycotoxin detoxification in fodder. *Ekologija*. 3: 128-131.
- 15-Santin, E. Paulillo, A.C. Nakagui, L.S.O. and Alessi, A.C. 2003. Evaluation of cell wall yeast as adsorbent on ochratoxin in broilers diets. *International Journal of Poultry Science* 2(6): 465-468.
- 16-Santin E., Maiorka A., Krabbe E.L., Paulillo A.C., and Alessi A.C. 2002. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicates on the prevention of the toxic effects of ochratoxin. *Journal of Applied Poultry Research*. 11 : 22-28.
- 17- Santin E., Paulillo A. C., Krabbe E. L., Alessi A. C., Polveiro W.J. C., and Maiorka A. 2003. Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin. *Archives of veterinary science*. 8 : 51-55.
- 18-Santin, E., A. Maiorka, M. Macari, M. Grecco, L.C. Sanchez, T.M. Okada and Myasaka, A.M. 2001. Performance and intestinal mucosa development in broiler chickens feed ration containing *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10: 236 -244.
- 19- Spring, P. and Fegan, D.F. 2005. Mycotoxins – a rising threat to aquaculture. *Feed mix Springer publication*. 135: 323-331.