Archive of SID

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (ص ۲۶۷-۲۵۹)

تأثیر اسیدیته و فشار اسمزی بر تولید افلاتوکسین در قارچ *Aspergillus parasiticus*

سید مسلم موسویان[۱]، مصطفی درویش‌نیا[۲*] و عیدی بازگیر[۳]

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۹)

چکیده

قارچ *Aspergillus parasiticus* با تولید افلاتوکسین B_1 تأثیرات جبران‌ناپذیری بر مصرف‌کنندگان مواد غذایی آلوده به این زهرابهٔ قارچی می‌گذارد. در این پژوهش، تیمارهای مختلف pH و غلظت NaCl در محیط کشت مایع قارچ اثر داده شدند و توکسین‌زایی آنها با استفاده از سه روش محیط کشت نارگیل - آگار، TLC و HPLC بررسی و مشخص شد که افلاتوکسین‌های تولیدشده به‌وسیلهٔ این قارچ، زیر نور UV خاصیت فلورسانس دارند. بیشترین توکسین‌زایی و رشد را در تیمار اسیدیته به‌ترتیب در ۶ و ۵ و در تیمار NaCl با غلظت ۳ و صفر درصد شاهد بودیم. غلظت‌های بالای نمک باعث جلوگیری از رشد و به تبع آن، تولید توکسین آن می‌شود. افلاتوکسین B_1 بیشترین توکسین تولیدی این قارچ است، بنابراین می‌توان با کنترل این دو عامل از رشد و تولید افلاتوکسین این قارچ تا حدود زیادی پیشگیری کرد و از تأثیرات سوء آن جلوگیری به عمل آورد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، اسیدیته، توکسین، NaCl.

مقدمه

تا سالیان اخیر چنین تلقی می‌شد که وقوع کپک‌زدگی روی مواد غذایی فقط یک مشکل زیبایی‌شناختی است و خطری برای سلامتی محسوب نمی‌شود. علی‌رغم مطالعات فراوان طی نیمهٔ اول قرن گذشته، فقط در دههٔ ۱۹۶۰ میلادی مشخص شد که متابولیت‌های برخی از انواع قارچ‌های رایج در مواد غذایی، مخصوصاً قارچ‌های آسپرژیلوس، مسئول بیماری و مرگ دام‌ها است. در حال حاضر به‌خوبی ثابت شده است که متابولیت‌های سمی قارچ‌ها یا مایکوتوکسین‌ها مسئول بسیاری از اپیدمی‌ها در جوامع انسانی، دام و طیور و گیاهی به‌ویژه در دوران اخیر بوده‌اند (Abbas *et al.*, 2004). قارچ کپکی آسپرژیلوس، جنس بزرگی را با بیش از ۲۰۰ گونه تشکیل می‌دهد که انسان به‌طور دائم در مواجهه با آنها قرار دارد. گونه‌های *Aspergillus fumigatus*، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus parasiticus*، *Aspergillus niger* مهم‌ترین آنها محسوب می‌شوند (Anaissie *et al.*, 2003; Zain *et al.*, 2011). مسمومیت‌های قارچی در حال حاضر یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین مشکلات تغذیه‌ای در بسیاری از کشورهای جهان، به‌ویژه در خاورمیانه و مناطق گرمسیری به شمار می‌رود. این مسمومیت قارچی خصوصاً برای طیور اهمیت زیادی دارد، زیرا اغلب مواد اولیهٔ غذایی مانند ذرت، جو،

* تلفن: ۰۹۱۶۶۶۱۶۳۰۰
E-mail: mdarvishnia44@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

گندم، کنجالهٔ تخم پنبه، سویا، پودر یونجه و حتی پودر ماهی دستخوش قارچ‌زدگی می‌گردد. رشد و ازدیاد قارچ‌ها به‌ویژه طی دورهٔ انبار کردن این مواد صورت می‌گیرد. علت این امر فراهم آمدن حرارت و رطوبت مساعد برای رشد و تکثیر قارچ است (Strosnider *et al.*, 2006). با توجه به اهمیت کپک‌ها در مواد غذایی، پژوهش‌های وسیعی روی این قارچ‌ها و متابولیت‌های ثانویهٔ آنها، به‌ویژه سم افلاتوکسین صورت گرفته است و مقدار این توکسین در محصولات کشاورزی به دقت بررسی شده و در اغلب کشورها حد مجاز آن ۵ تا ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم مشخص شده است (Fani *et al.*, 2013). آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی قارچ‌های آسپرژیلوس‌اند که به‌وسیلهٔ برخی از این کپک‌ها در مواد غذایی تولید می‌شوند. وجود آفلاتوکسین تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مختلف است. شرایط محیطی، از قبیل نور، دما، رطوبت و اسیدیته از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید سم افلاتوکسین است؛ به‌طوری که اگر تغییری در این فاکتورها به‌وجود بیاید، باعث اختلاف معنی‌داری در تولید افلاتوکسین می‌شود (Odetite *et al.*,1966). قارچ *A. parasiticus* بیشترین بازده تولید افلاتوکسین را در اسیدیته ۶ و کمترین آن را در اسیدیته ۶/۵ دارد (Fanimakki *et al.*,2011). برای کنیدی‌زایی این قارچ، اسیدیتهٔ ۵ تا ۸ و برای ریسه‌زایی آن، اسیدیتهٔ ۵ تا ۷ لازم است (Zhao *et al.*, 2011). همچنین مشخص شده که تولید افلاتوکسین و نرخ رشد قارچ *A. parasiticus* و *A. flavus* با افزایش غلظت NaCl از ۲ به ۱۲ درصد در محیط کشت مخمر - آگار کاهش می‌یابد (Shahin *et al.*, 1997). از جمله عوامل تأثیرگذار بر رشد قارچ و تولید توکسین، اسیدیته و غلظت NaCl موجود در محیط است. در این پژوهش، تأثیر این دو فاکتور بر روی رشد و تولید توکسین قارچ *A. parasiticus* بررسی شد. با دانستن اثر این فاکتورها و با پیشگیری و رعایت اصول بهداشتی، می‌توان از گستردگی آلودگی قارچی در موقعیت‌های مختلف جغرافیایی، عملیات کشاورزی، صنایع غذایی، دامداری‌ها و مرغداری‌ها و حتی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و پزشکی جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ جدایهٔ قارچی

ایزولهٔ قارچ *Aspergillus parasiticus* Speare (PTCC S286) با قابلیت توکسین‌زایی از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و برای انجام آزمایش به‌کار گرفته شد.

خالص‌سازی قارچ

برای اطمینان از خالص بودن قارچ موجود، مجدداً عملیات خالص‌سازی با توجه به اسپورزاد بودن قارچ به روش تک اسپور کردن بر روی محیط آب - آگار انجام گرفت. بدین منظور، ابتدا از قارچ مورد نظر سوسپانسیون اسپوری تهیه شد و سپس با استفاده از لوپ استریل یک قطره از این سوسپانسیون بر روی محیط کشت آب - آگار مخطط‌سازی شد و بعد از ۱۲ تا ۱۴ ساعت، اسپورهای جوانه‌زده از روی محیط آب - آگار برداشته و به تشتک پتری و لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت شیب‌دار PDA انتقال داده شدند. کشت‌های درون لوله و تشتک پتری بعد از ۴ تا ۵ روز رشد در محیط انکوباتور، برای انجام مراحل بعدی آزمایش به یخچال با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال داده شدند (Selma *et al.*, 2008).

اعمال تیمار pH و NaCl

برای بررسی تأثیر pH بر روی رشد قارچ، از بسترهٔ کشت ذرت استفاده شد. بدین منظور، ابتدا اسیدیتهٔ محیط کشت با استفاده از KCl و NaOH بر روی اسیدیته‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ تنظیم شد و بعد از ضدعفونی بسترهٔ کشت، سوسپانسیون اسپوری به غلظت 10^6 اسپور در شرایط کاملاً استریل به آن اضافه گردید. برای اعمال تیمار NaCl، مشابه روش قبلی از بسترهٔ کشت ذرت استفاده شد و غلظت نمک در این محیط کشت با استفاده از NaCl ۱ درصد خالص به نسبت صفر (شاهد)، ۱/۵، ۳، ۵ و ۷ درصد تنظیم شد. هرکدام از تیمارها در ۴ تکرار و در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند و طبق فرمول زیر، درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌ها اندازه‌گیری شد (Pandey *et al.*,1982):

www.SID.ir

Archive of SID

$$\%\,GI = \frac{dc - dt}{dc} \times ۱۰۰$$

در این فرمول، GI: درصد بازدارندگی از رشد، dc: میانگین وزن میسلیوم قارچ در تیمار شاهد (گرم) و dt: میانگین وزن میسلیوم قارچ در تیمار تحت بررسی (گرم) است.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت، داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شد و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

تعیین توکسین‌زا بودن قارچ

برای این منظور، از محیط کشت نارگیل - آگار استفاده شد. برای تهیهٔ این محیط کشت، ۲۰۰ گرم پودر نارگیل در یک لیتر آب جوش ریخته شد. پس از ۵ دقیقه و به هم زدن در چند نوبت و زمانی که عصارهٔ نارگیل کاملاً خارج شد، مایع حاصل از ۴ لایه پارچهٔ ململ عبور داده شد و ۲۰ گرم پودر آگار به آن اضافه گردید. سپس مایع به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو سترون و به تشتک‌های پتری ۸ سانتی‌متری منتقل گردید. پس از سرد شدن محیط، قارچ *A. parasiticus* بر روی این محیط کشت گردید و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ روز انکباته و سپس در زیر نور UV با طول موج ۲۴۵ تا ۳۶۶ نانومتر ارزیابی شد (Davis *et al*., 1987).

استخراج توکسین

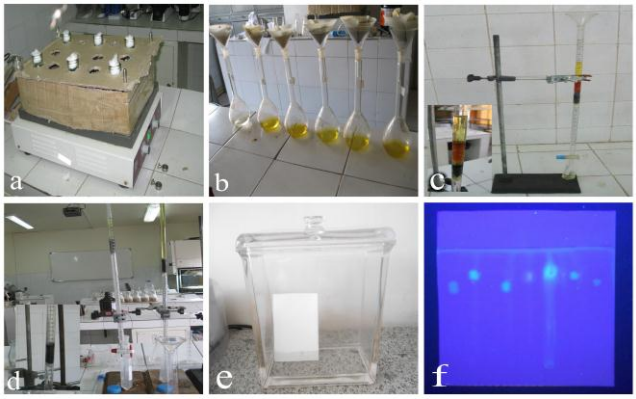
به منظور استخراج زهرابه‌های قارچی، ابتدا محتویات ارلن‌های حاوی بذور آلوده به قارچ *A. parasiticus* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس بذور ذرت آسیاب شدند و روی ۱۵ گرم از هر نمونهٔ آسیاب‌شده، ۴۸ میلی‌لیتر استونیتریل، ۳ میلی‌لیتر متانول و ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس مواد روی شیکر با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند. مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن صاف گردید و عصارهٔ حاصل از ستون تصفیه حاوی رزین کاتیونی و مخلوط آلومینا - کربن عبور داده شد. به این منظور، ابتدا و انتهای ستون با یک لایه پشم‌شیشه مسدود و بر روی آن یک گرم مخلوط آلومینا - کربن اضافه شد و دوباره یک لایه پشم‌شیشه مسدود روی آن قرار گرفت. سپس رزین کاتیونی که از قبل به مدت یک ساعت در آب مقطر قرار گرفته است، در ستون ریخته و بعد از آن عصارهٔ نمونه‌ها از ستون عبور داده شد. عصارهٔ عبور داده‌شدهٔ ستون اول با استفاده از ستون تصفیهٔ دوم، به‌ترتیب شامل پشم‌شیشه و آلومینا - کربن و پشم‌شیشه مجدداً خالص شد و سپس عصارهٔ عبور داده‌شده از ستون تصفیهٔ دوم برای تبخیر حلال به آون ۷۰ درجهٔ سانتی‌گرادی منتقل شد. پس از خشک شدن عصارهٔ استخراج‌شده، ۲ میلی‌لیتر محلول متانول - آب (۱۰ به ۹۰) به آن اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول متانول - آب (۵ به ۹۵) و ۲ میلی‌متر محلول استونیتریل - متانول (۳ به ۱) نیز به آن افزوده گردید و به منظور تبخیر مجدد حلال، دوباره در آون با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت، به عصارهٔ خشک‌شده، ۲ میلی‌متر محلول متانول - آب (۵ به ۹۵) اضافه شد و عصاره‌های استخراج‌شده در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱- a تا d) (Davari *et al*., 2014).

سنجش کلی افلاتوکسین‌های تولیدی قارچ *A. parasiticus* به روش TLC

بدین منظور از روش Afzali (1998)، استفاده شد. به این صورت که بعد از استخراج سموم، محلول‌های نمونه و استاندارد افلاتوکسین روی صفحهٔ TLC (صفحهٔ آلومینیومی همراه با سیلیکاژل، Thin Layer Chromatography (TLC)) در یک راستا نقطه‌گذاری شدند. بعد از اینکه صفحه در مخزن TLC قرار داده شد و محلول متانول: استونیتریل (۸۸ : ۱۲) از آن بالا رفت و صفحه شسته شد، صفحه در هوا خشک شد و زیر نور لامپ UV (۳۶۵ nm) ارزیابی گردید و شدت نقطهٔ فلورسانس آبی نمونه با نقطهٔ فلورسانس استاندارد مقایسه شد (شکل ۱ – e و f).

www.SID.ir

Archive of SID



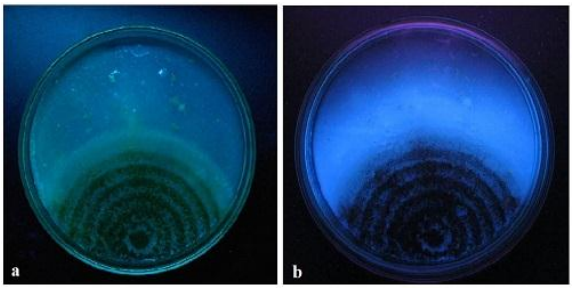
شکل ۱. مراحل استخراج افلاتوکسین و سنجش کمی توسط TLC. a) شیکر کردن عصاره، b) مرحلهٔ صاف کردن عصاره با استفاده از کاغذ واتمن، c) ستون تصفیهٔ ۱، d) ستون تصفیهٔ ۲، e) تانک TLC، f) نقطه‌گذاری روی کاغذ TLC و خاصیت فلورسانس افلاتوکسین در زیر نور UV.

ارزیابی کمی افلاتوکسین‌های موجود در عصاره با استفاده از روش HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

به منظور تجمیع بیشتر افلاتوکسین‌ها، عصارهٔ به‌دست‌آمده به ستون ایمونوافیمنیتی (Immunoaffinity columns (IAC) R-Biopharm Rhone Ltd, UK) با قطر داخلی ذرات ۰/۵ میلی‌متر وارد شد که به دلیل داشتن آنتی‌بادی‌های سطحی روی ذرات، ابتدا افلاتوکسین‌ها نگهداری شد و سپس با عبور متانول، از ستون خارج گردید و آب دیونیزه اضافه شد. برای سنجش کمی افلاتوکسین‌ها از دستگاه HPLC استفاده شد. بدین منظور، ۲۰ میکرولیتر عصاره به ستون کروماتوگرافی فاز معکوس C18-Supelco Discovery به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر متصل به دستگاه Unicam-Crystal-200 (Brand Kinesis, UK) تزریق شد. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل (۲۰ درصد)، متانول (۲۰ درصد) و آب دیونیزه (۶۰ درصد) است که با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون عبور می‌کند. دتکتور از نوع فلورسانس در طول موج تحریکی ۳۶۵ نانومتر و طول موج خروجی ۴۴۵ نانومتر تنظیم گردید و به منظور تقویت فلورسانس افلاتوکسین‌ها از ستون مشتق‌ساز تولیدکنندهٔ برم PB.PB با قطر ذرات داخلی ۰/۵ میلی‌متر (R-Biopharm Rhone Ltd, UK) استفاده شد. هرکدام از انواع افلاتوکسین‌ها بر اساس مطابقت پیک خروجی با زمان بازداری پیک استاندارد و بر اساس غلظت نمونهٔ استاندارد تعیین هویت و غلظت شدند (Trucksess *et al.*, 1994; Shephard, 2009).

نتایج

نتایج بررسی‌های این آزمایش روی رشد قارچ *A. parasiticus* نشان داد که این قارچ روی محیط کشت نارگیل - آگار دارای خاصیت فلورسانس است (شکل ۲).



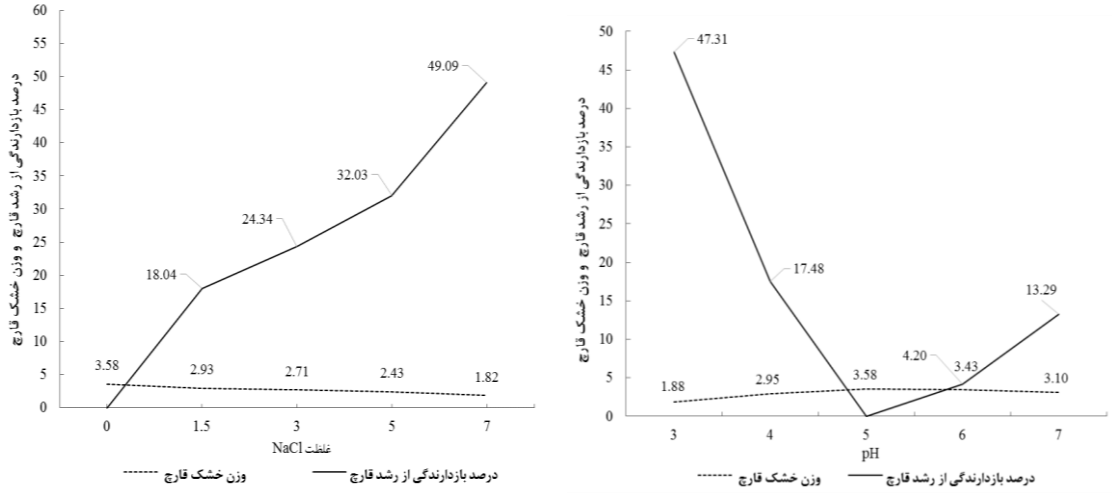
شکل ۲. خاصیت فلورسانس افلاتوکسین روی محیط کشت نارگیل - آگار در زیر نور UV.
a) کلونی *A. parasiticus* در زیر نور لامپ مهتابی، b) کلونی *A. parasiticus* در زیر نور UV

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین مشخص شد که این قارچ در pH = ۵ با میانگین رشدی ۳/۵۸ گرم وزن خشک میسلیوم قارچی بهترین رشد را دارد و نسبت به تیمار pH = ۳ تفاوت معناداری نشان داد. تیمار pH = ۳ با میانگین رشدی ۱/۸۸ گرم وزن خشک میسلیوم قارچی (۴۷/۳۱ درصد بازدارندگی از رشد) نسبت به شاهد، تفاوت معناداری با دیگر تیمارهای اسیدیته دارد و بهترین رشد را بعد از pH = ۵ ، pH های ۶ و ۷ به‌ترتیب با میانگین وزن خشک ۳/۴۳ و ۳/۱۰ گرم نشان دادند. همچنین مشخص شد که این قارچ در غلظت صفر NaCl با میانگین وزن خشک ۳/۵۸ گرم بیشترین رشد و در بیشترین غلظت به‌کاررفته در این آزمایش، یعنی غلظت ۷ درصد کمترین رشد و بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را نشان می‌دهد که تقریباً باعث کاهش ۵۰ درصد رشد این قارچ شد (نمودار ۱).

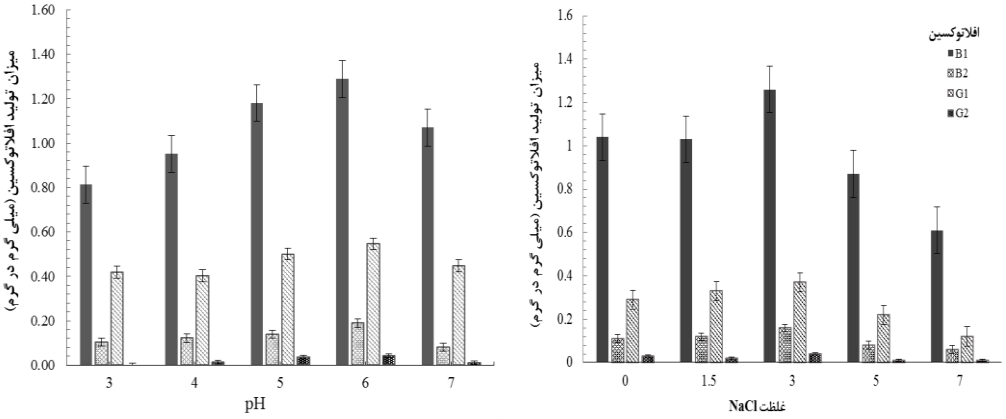
نتایج تجزیه و تحلیل کمی TLC و HPLC مشخص کرد که قارچ *A. parasiticus* در غلظت NaCl سه درصد با تولید ۱/۸۳ میلی‌گرم در گرم افلاتوکسین بیشترین میزان تولید توکسین را دارد و با دیگر تیمارهای غلظت NaCl تفاوت معناداری نشان می‌دهد. غلظت صفر و ۱/۵ درصد به‌ترتیب با تولید ۱/۴۷ و ۱/۵۰ میلی‌گرم در گرم افلاتوکسین تفاوت معناداری نسبت به هم نشان ندادند. غلظت‌های ۵ درصد با تولید ۱/۱۸ و غلظت ۷ درصد با تولید کمترین مقدار سم به میزان ۰/۸۰ میلی‌گرم در گرم افلاتوکسین نسبت به هم و همهٔ تیمارها تفاوت معناداری نداشتند. همچنین مشخص شد که در همهٔ تیمارهای آزمایشی، میزان تولید سم افلاتوکسین B_1 به وفور بیشتر از بقیهٔ تیمارها است؛ به نحوی که ۶۴/۶۳ درصد از کل توکسین‌های تولیدی را تشکیل می‌دهد و بعد از آن، افلاتوکسین G_1 با ۲۸/۲۷ درصد قرار دارد و افلاتوکسین G_2 تنها با یک درصد، کمترین میزان سم تولیدی این قارچ است. تجزیه و تحلیل‌های آماری تأثیر اسیدیته بر روی تولید افلاتوکسین نشان داد که این قارچ در pH = ۶ با تولید ۲/۱۱ میلی‌گرم در گرم بیشترین مقدار تولید افلاتوکسین را به خود اختصاص داده است که از این نظر تفاوت معناداری با دیگر تیمارها از خود نشان داد. بعد از آن، pH ۵ است و همچنین قارچ *A. parasiticus* در اسیدیته‌های ۳ و ۴ به‌ترتیب با تولید ۱/۴۲ و ۱/۶۷ میلی‌گرم در گرم افلاتوکسین کمترین میزان این سم را در بین این تیمارها تولید می‌کنند و تفاوت معناداری با دیگر تیمارها نشان دادند (نمودارهای ۲ و ۳)، (جدول ۱).



نمودار ۱. اثر pH و NaCl بر روی رشد قارچ *A. parasiticus*

www.SID.ir

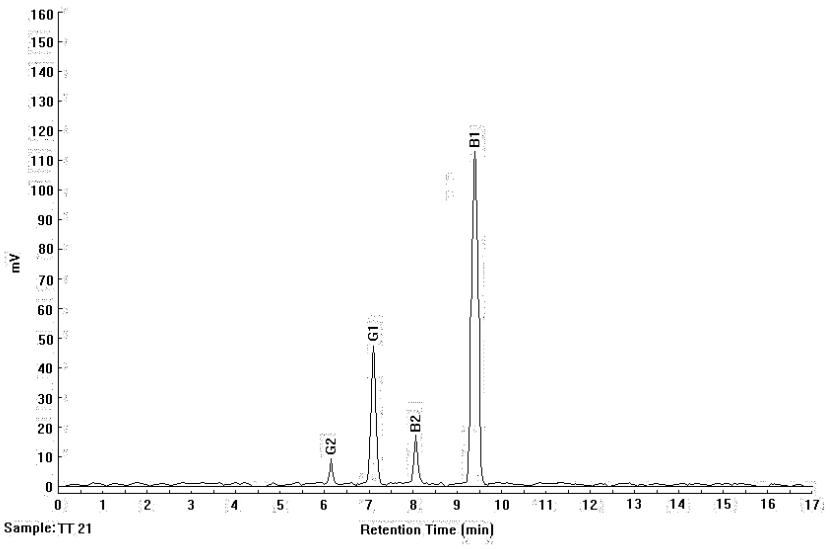
Archive of SID



نمودار ۲. مقایسهٔ افلاتوکسین‌های تولیدی قارچ *A. parasiticus* تحت تأثیر فاکتورهای pH و غلظت NaCl

جدول ۱. میزان کمی افلاتوکسین‌های تولیدی *A. parasiticus* تحت تأثیر تیمار pH و غلظت NaCl

تیمار	غلظت افلاتوکسین بر حسب میکروگرم در سی‌سی				
غلظت NaCl (درصد)	B_1	B_2	G_1	G_2	مجموع کل افلاتوکسین قارچ
۰	۱/۰۴	۰/۱۱	۰/۲۹	۰/۰۳	۱/۴۷
۱/۵	۱/۰۳	۰/۱۲	۰/۳۳	۰/۰۲	۱/۵۰
۳	۱/۲۶	۰/۱۶	۰/۳۷	۰/۰۴	۱/۸۳
۵	۰/۸۷	۰/۰۸	۰/۲۲	۰/۰۱	۱/۱۸
۷	۰/۶۱	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۰۱	۰/۸۰
اسیدیته (pH)	B_1	B_2	G_1	G_2	مجموع کل افلاتوکسین قارچ
۳	۰/۸۱	۰/۱۰	۰/۴۲	۰	۱/۳۳
۴	۰/۹۵	۰/۱۲	۰/۴۰	۰/۰۱	۱/۴۹
۵	۱/۱۸	۰/۱۴	۰/۵۰	۰/۰۳	۱/۸۵
۶	۱/۲۹	۰/۱۹	۰/۵۴	۰/۰۴	۲/۰۶
۷	۱/۰۷	۰/۰۸	۰/۴۵	۰/۰۱	۱/۶۱



نمودار ۳. کروماتوگرام افلاتوکسین‌های تولیدشدهٔ قارچ *A. parasiticus* با روش HPLC

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

رشد کپک‌ها باعث کاهش کیفیت مواد غذایی و همچنین ایجاد خطری بالقوه برای سلامتی انسان به دلیل تولید متابولیت‌های سمی شناخته‌شده، با عنوان مایکوتوکسین‌ها می‌شود. مایکوتوکسین‌ها در بسیاری از نقاط جهان در مواد غذایی مختلف شناسایی شده‌اند و در حال حاضر، یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های مواد غذایی به حساب می‌آیند (Martins *et al.*, 2001). *A. parasiticus* یکی از این نوع قارچ‌هاست که بیشترین میزان سم آفلاتوکسین B_1 را می‌تواند تولید کند (Diaz *et al.*, 2008). در تحقیق حاضر، نتایج توکسین‌زایی این قارچ در محیط کشت نارگیل - آگار با تولید فلورسانس مشخص شد (شکل ۲). حضور ترکیباتی در محیط کشت، سبب تحریک خاصیت فلورسانس شده و به گسترش روش‌های شناسایی این ترکیبات کمک می‌کند. چون این قارچ در محیط کشت PDA خاصیت فلورسانس نداشت، می‌توان این ترکیبات توکسین‌زا را در عصارهٔ نارگیل پیدا کرد. Danesh *et al.* (1979)، بیان کردند که تولید نور فلورسانس به دلیل ماهیت طبیعی آفلاتوکسین‌ها است، فلورسانس طبیعی آفلاتوکسین‌ها ناشی از ساختار حلقوی پنتاهیدروسیکلیک اکسیژنه آنها است. همچنین مشخص شده است که خاصیت فلورسانس این ماده در زیر نور فرابنفش به دلیل وجود متیل بتا سیکلو دکسترین است که با تأثیر از آنزیم سید ترانس گلیکولاز بر روی دکستران تولید می‌شود و با واکنش با افلاتوکسین سبب افزایش خاصیت فلورسانس آن در زیر نور فرابنفش با طول موج ۳۶۰ نانومتر می‌شود (Fente *et al.*, 2001). قارچ *A. parasiticus* در اسیدیتهٔ ۵ بیشترین میزان رشد را از خود نشان می‌دهد، ولی بهینهٔ توکسین‌زایی این قارچ در اسیدیتهٔ ۶ است و هرچه شرایط اسیدی‌تر شود، میزان تولید سم و رشد قارچ هم کمتر می‌شود، به نحوی که در اسیدیتهٔ ۳ کمترین رشد و تولید افلاتوکسین را دارد. این قارچ در همهٔ تیمارهای اسیدیته، رشد و تولید توکسین داشت و بنابراین می‌توان گفت که نسبت به شرایط اسیدی تحمل خوبی دارد.

میزان کلی رشد و تولید افلاتوکسین قارچ *A. parasiticus* تحت تأثیر تنش اسمزی (صفر تا ۷ درصد) کاهش یافت، اما تولید توکسین این قارچ در غلظت NaCl سه درصد افزایش یافت و سپس با افزایش غلظت نمک مقدار این توکسین کاهش یافت، تا جایی که در غلظت ۷ درصد نمک تقریباً ۵۰ درصد از تولید توکسین قارچ جلوگیری کرد و در همین غلظت هم کمترین میزان رشد را نشان داد و انتظار می‌رود حتی در غلظت‌های بالاتر، به‌طور کامل از توکسین‌زایی و رشد قارچ جلوگیری شود. بنابراین می‌توان گفت که این قارچ تا حدودی اسیددوست است و افزایش توکسین آن در غلظت ۳ درصد NaCl شاید به‌عنوان سلاح دفاعی است که در ابتدای مکانیسم احساس تنش در قارچ در برابر شرایط نامساعد تولید می‌شود و کاهش آن در غلظت‌های بالاتر مربوط به ضعیف شدن رشد قارچ است. در آزمایش‌های Zhao *et al.* (2010)، نشان داده شده که برای کنیدی‌زایی قارچ *A. parasiticus*، اسیدیتهٔ ۵ تا ۸ و برای ریسه‌زایی آن، اسیدیتهٔ ۵ تا ۷ لازم است. همچنین مشخص شده که قارچ *A. parasiticus* از نظر رشدی به قارچ *A. flavus* بسیار نزدیک است و این دو قارچ نرخ رشد مشابهی در طول محدودهٔ اسیدیتهٔ ۲ تا ۱۱ نشان می‌دهند و در دمای بهینه، قارچ *A. parasiticus* نسبت به اسیدیته‌های پایین‌تر، از *A. flavus* رشد بهتری نشان می‌دهد (Diaz *et al.*, 2008) که با نتایج این پژوهش تقریباً همخوانی دارد. پژوهش‌های دیگری روی pH مشخص کرده که رشد قارچ‌ها در محدودهٔ اسیدیتهٔ ۳ تا ۸ است و حداکثر وزن خشک و اسپوردهی در اسیدیتهٔ ۵/۵ تا ۶/۵ در محیط مایع است (Saha *et al.*, 2008). طبق پژوهش‌های صورت‌گرفته، مشخص شده که قارچ *A. parasiticus* در اسیدیتهٔ ۵ بیشترین اسپورزایی را دارد و بعد از آن اسیدیتهٔ ۷ است و در اسیدیتهٔ ۱۰ کمترین اسپورزایی را دارد و همچنین قارچ مورد نظر در اسیدیتهٔ ۴ بیشترین وزن خشک را دارد (Dantigny *et al.*, 2005; Abubakar *et al.*, 2013).

Marin *et al.* (2008)، با مقایسهٔ میزان رشد

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ‌ها با تولید توکسین آنها بیان داشتند که بهترین راه جلوگیری از رشد میکوتوکسین‌ها، جلوگیری از رشد قارچ‌های تولیدکنندهٔ آنها در مواد غذایی است. طبق گزارش‌های Deshmukh *et al.* (2012)، دو قارچ *A. parasiticus* و *A. flavus* در محدودهٔ اسیدیتهٔ ۶/۵ تا ۱۱ فعالیت دارند. Reddy *et al.* (1971)، بیان داشتند که اسیدیتهٔ ۴/۵ در محیط کشت باعث رشد خوب و تولید توکسین این قارچ می‌شود. همچنین بیان داشتند که سطوح پایین NaCl در بسترهها مناسب تولید افلاتوکسین است. نتایج پژوهش روی ژن‌های مسیر بیوسنتز افلاتوکسین نشان داد که در اسیدیتهٔ ۴ تا ۶ بیان این ژن‌ها به حداکثر می‌رسد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (Keller *et al.*, 1997). همچنین مشخص شده که با افزایش غلظت نمک از ۱ تا ۱۲ درصد، رشد و تولید افلاتوکسین کاهش می‌یابد (Shahin & Aziz, 1997).

Ei-Gazzar *et al.* (1986)، بیان داشتند که با افزایش غلظت NaCl مونتاژ افلاتوکسین و فاز رشدی قارچ کاهش می‌یابد. در پنیرهای آلوده به دو قارچ *A. parasiticus* و *A. flavus* مشخص شده که با افزایش غلظت نمک موجود در پنیر از ۳ به ۷ درصد، مقدار رشد قارچ و افلاتوکسین آنها کاهش می‌یابد (Matches & Liston, 1972) و گزارش شده است که غلظت‌های ۱۲، ۱۴ و ۱۵ درصد باعث بازدارندگی کامل از تولید افلاتوکسین شده است (Shih & Marth, 1972; Kulik *et al.*, 1968). بنابراین اسیدیته و غلظت نمک موجود در محیط تأثیر زیادی بر رشد و تولید توکسین قارچ *A. parasiticus* دارد و این قارچ در غلظت بالای نمک، رشد و توکسین‌زایی کمی دارد و در محدوده‌های اسیدیتهٔ ۶ تولید توکسین قارچی زیاد شده است. البته رشد طبیعی ممکن است ادامه داشته باشد، ولی تولید توکسین آنها کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه گستردگی آلودگی آفلاتوکسینی محصولات کشاورزی در موقعیت‌های مختلف جغرافیایی، عملیات کشاورزی و حساسیت کالاهای کشاورزی به حملهٔ این کپک‌ها در طول برداشت و نگهداری متفاوت است، یک نگرانی جهانی در ایمنی غذایی به‌وجود آمده است. با توجه به سرطان‌زایی بالقوهٔ افلاتوکسین‌های تولیدی این قارچ‌ها، به‌ویژه قارچ *A. parasiticus* و از آنجا که اتحادیهٔ اروپا حد مجاز افلاتوکسین را حداکثر ۵ میکروگرم در کیلوگرم برای افلاتوکسین B_1 و برای دیگر آفلاتوکسین‌ها ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم محصولات کشاورزی تعیین کرده است (Anonymous, 2006)، بنابراین می‌توان با کنترل شرایط محیطی از جمله اسیدیتهٔ محیط و غلظت نمک موجود در محیط از رشد و تولید توکسین آن جلوگیری به عمل آورد و آن را به زیر حد مجاز تعیین‌شده رساند.

REFERENCES

1. Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Wearver, M.A., Horn, B.W., Xie, W. & Shier, W.T. (2004). Comparison of cultural and analytical methods for determination of production by Mississipi Delta *Aspergillus* isolates. *Journal of Microbiology*, 50, 193-199.
2. Abubakar, A., Suberu, H.A., Bello, I.M., Abdulkadir, R., Daudu, O.A. & Lateef, A.A. (2013). Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Plant Sciences*, 1, 64-67.
3. Afzali, N. (1998). Biotechnological method to counteract Aflatoxicosis in broiler breeders. Ph.D. thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore, India, 184 pp. University of Agricultural Science, Bangalore. (in Farsi)
4. Anaissie, E.J., Ginnis, M.R. & Pfaller, M.A. (2003). Clinical Mycology. *Churchill Livingstone, Philadelphia, Churchill Livingstone*, 51, 273-296.
5. Anonymous. (2006). European Commission Regulations, setting maximum levels of certain contaminants in foods. *Official Journal of European Ommunities*, 1881, 364-365.
6. Danesh, D., Mojtahedi, H., Barnett, R. & Cambell, A. (1979). Correlation between climatic data and aflatoxin contamination of Iranian pistachio nuts. *Phytopathology*, 69, 715-716.
7. Dantigny, P., Guilmart, A. & Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *Jurnal of Food*
8. *Microbiology*, 100, 187-196.
9. Davari, M., Safaei, N., Darvishnia, M. &Didar Taleshmikaeil, R. (2014). Occurrence of Deoxynivalenol producing isolates of F*usarium graminearum* species complex associated with Head Blight of wheat in Moghan area. *Journal Crop Protection*, 3(2), 113-123.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Davis, N.D., Iyer, S.K. & Diener, U.L. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1593-1595.
11. Deshmukh, A.J., Mehta, B.P., Sabalpara, A.N. & Patil, V.A. (2012). In vitro effect of various nitrogen, carbon sources and pH regimes on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc causing anthracnose of Indian bean. *Journal of Biopest*, 5, 46-49.
12. Diaz, G.J., Calabrese, E. & Blain, R. (2008). Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): An example of hormesis. *Poultry Science*, 87, 727-32.
13. Ei-Gazzar, F.E., Rusul, G. & Marth, E.H. (1986). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of sodium chloride. *Food Protection*, 49, 461-466.
14. Fani, S.R., Javanshah, A.A. & Moradi, M. (2013). Prevalence of aflatoxin in Rafsanjan processed pistachios during 2011-2012 and its relation with time of harvest. *Journal of Toloo-e- Behdasht*, 4 (42), 175-189. (in Persian)
15. Fanimaki, O., Afzalli, N., Omidi, A. & Shakib, A. (2011). Comparison of aflatoxin B_1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* under different conditions of temperature, light and pH. *Yasuj University of Medical Sciences*, 4, 18-28. (in Persian)
16. Fente, C.A., Ordaz, J.J., Vazquez, B.I., Franco, C.M. & Cepeda, A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxinproducing *Aspergillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 4858-4862.
17. Keller, N.P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D. & Burow, G.B. (1997). pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 87, 643-648.
18. Kulik, M.M. & Hanlin, R.T. (1968). Osmophilic strains of *Aspergillus* specie. *Mycologia*, 60, 961-964.
19. Marin, S., Cuevas, D., Ramos, A.J. & Sanchis, V. (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 139-149.
20. Martins, M.L., Martins, H.M. & Bernardo, F. (2001). Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 18, 315-319.
21. Matches, J.R. & Liston J. (1972). Effects of incubation temperature on salt tolerance of Salmonella. *Journal of Milk and Food Technology*, 35, 39-44.
22. Odetite, L., Shotwll, C., Hesseltine, W., Stubbleefield, R.D. & Sorenson W.G. (1966). Production of Aflatoxin on Rice. *American Society for Microbiology*, 14, 425-428.
23. Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D. & & Dixit, S.N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. *Zeitschrift fur Pflanzenkraneaten and Pflanzenschutz*, 89, 344-349.
24. Reddy, T.V., Viswanathan, L. & Venkitasubramanian, T.A. (1971). High aflatoxin production on chemically defined medium. *Applied Microbiology*, 22, 393-396.
25. Saha, A., Mandal, P., Dasgupta, S. & Saha, D. (2008). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Environmental Biology*, 29, 407-410.
26. Selma, M.V., Martínez-Culebras, A. & Aznar, P.V. (2008). Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Journal of Food Microbiology*, 122, 126-134.
27. Shahin, A.A.M. & Aziz, N.H. (1997). Influence of gamma rays and sodium chloride on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *International Microbiology*, 90, 163-175.
28. Shephard, G. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1215-1224.
29. Shih, C.N. & Marth, E.H. (1972). Production of aflatoxin in B_1 a medium fortified with sodium chloride. *Journal Dairy Science*, 55, 1415-1419.
30. Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R., Breiman, R. & Brune, M. (2006). Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environtonemal ealth Perspect*, 12, 1898-903.
31. Trucksess, M.W., Stack, ME., Nesheim, S., Albert, R.H. & Romer, T.R. (1994). Multifational column coupled liquid chromatography for the determination of aflatoxin B_1, B_2, G_1 and G_2 in corn, almond, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts, collaborative study, *Journal AOAC International*, 77, 1512-1521.
32. Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 29-144.
33. Zhao, H., Huang, L., Xiao, C.L., Liu, J., Wei, J. & Gao, X. (2010). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and conidial production of *Diplocarpon Mali*, The Society for Applied Microbiology. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 639-644.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Plant Protection, Vol. 46, No. 2, Autumn & Winter 2015-2016

The effect of pH and NaCl on the aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*

Seyed Moslem Moosavian[1], Mostafa Darvishnia[2*] and Aeidi bazgir[3]
1, 2, 3. M.Sc. Student of Plant Pathology, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran
(Received: Jun. 28, 2015 - Accepted: Dec. 30, 2015)

ABSTRACT

Aspergillus parasiticus causes adverse effects on its consumers of food infected with this fungal toxins by producing aflatoxin B_1. In this study, the effects of different treatments of pH and NaCl concentration on the growth and toxin production of this fungus was investigated using three methods including coconut-agar medium, TLC, and HPLC. Based on our examinations, the aflatoxins produced by this fungus had fluorescence effect under UV light. The highest growth and production toxin of *A. parasiticus* was, respectively, occurred at pH 6 and 5 and NaCl concentration of 3 and 0 percent. High concentrations of salt suppressed this fungi growth and consequently its toxin production. Aflatoxin B_1 was the most common toxin produced by *A. parasiticus*. As a result, by controlling these two factors, the growth and aflatoxin production of this fungus can be largely inhibited to avoid its adverse effects.

Keywords: *Aspergillus*, toxin, pH, NaCl.

* Corresponding author E-mail: mdarvishnia44@yahoo.com Tel: +98 916 6616300

www.SID.ir