نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ص. ۳۶-۲۹

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 1, Spring 2012, P. 29-36

# بررسی رابطه تولید اسکلرت و آفلاتوکسین در *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* و مقایسه اثر بعضی مواد شیمیایی و عصاره گیاه آلوئه‌ورا روی رشد پرگنه *Aspergillus parasiticus*

فاطمه خدادادی [۱*]- محمد مهدی امینایی [۲]- نادر درکی [۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۵

## چکیده

گونه‌های جنس آسپرژیلوس روی مواد غذایی مورد استفاده انسان و دام رشد کرده و با تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله آفلاتوکسین‌ها خسارات زیادی را باعث می‌شوند و از ارزش غذایی آن‌ها می‌کاهند. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسید سیتریک و اسید پروپیونیک و عصاره گیاه آلوئه ورا روی رشد پرگنه قارچ‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* مورد بررسی قرار گرفت برای این منظور غلظت‌های مورد نظر از این ترکیبات تهیه و به محیط کشت چاپک دوکس آگار اضافه شد، این محیط‌ها سپس بوسیله یک دیسک پنج میلی‌متری حاوی کشت تازه *Aspergillus parasiticus* تلقیح گردیده و نتایج حاصله نشان داد که اسید پروپیونیک در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸، ۱، ۱/۵ درصد به طور کامل از رشد پرگنه جلوگیری کرد. اسید سیتریک در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸، ۱ درصد، خواص ضد قارچی متوسط داشت و در غلظت ۱/۵درصد تاثیری در کاهش قطر پرگنه نداشت. عصاره گیاه آلوئه ورا با غلظت ۶ ، ۴، ۲ درصد اثر بازدارندگی نشان داد. در بررسی رابطه بین تولید اسکلرت و آفلاتوکسین، جدایه‌های *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* در محیط کشت چاپک کشت داده شدند، و با روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا میزان آفلاتوکسین تولید شده اندازه گیری شد، در مقایسه با میزان کل آفلاتوکسین تولید شده توسط جدایه‌های مزبور، گروه دارای اسکلرت کوچک آفلاتوکسین بیشتری در مقایسه با گروه فاقد اسکلرت و دارای اسکلرت بزرگ تولید کردند.

**واژه‌های کلیدی:** آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، اسید سیتریک، اسید پروپیونیک، عصاره گیاه آلوئه ورا

## مقدمه

مواد غذایی همواره در سراسر جهان مورد حمله قارچ‌های گوناگون قرار می‌گیرند، از جمله این قارچ‌ها، گونه‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین می‌باشند که می‌توانند قبل و بعد از برداشت، در طول انبارداری و حمل و نقل مواد غذایی را آلوده نمایند (۲۲). پسته یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی کشور می‌باشد که در طول دوره کشت و مراحل مختلف فرآوری مورد حمله این قارچ‌ها قرار می‌گیرد. دانه‌های پسته منبع غنی چربی بوده و دارای اسیدهای چرب ضروری برای رژیم غذایی انسان می‌باشد (۸).

آفلاتوکسین‌ها ترکیبات جهش‌زا و سرطان‌زا برای انسان‌ها و حیوانات‌اند که در وظایف سیستم ایمنی مداخله می‌کنند (۱۴). دو گونه *Aspergillus parasiticus* Speare و *Aspergillus flavus* Link از مهم‌ترین عوامل تولید آفلاتوکسین می‌باشند (۲۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد که تولید متابولیت‌های ثانویه با فرآیندهای توسعه قارچی مثل اسپوردهی و تشکیل اسکلرت مرتبط است (۲۳). برای تولید متابولیت و اسپورزایی شرایط محیطی مشابه‌ای مورد نیاز است، تشکیل اسپور و تولید متابولیت ثانویه تقریباً به طور همزمان اتفاق می‌افتد (۲۳). به طور معمول این قارچ‌ها دو نوع اسکلرت یا اندام سختینه تولید می‌کنند، اسکلرت نوع بزرگ که دارای اندازه بیش از ۴۰۰ میکرومتر و اسکلرت نوع کوچک با اندازه کمتر از ۴۰۰ میکرومتر است (۲). جدایه‌هایی نیز وجود دارند که بدون تولید اسکلروت قادر به تولید آفلاتوکسین می‌باشند (۷).

با توجه به مشکلاتی که قارچ‌های مولد آفلاتوکسین برای مواد غذایی بوجود می‌آورند و خطراتی که آفلاتوکسین‌ها برای سلامتی

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان
(*- نویسنده مسئول: Email :fatemekhodadadi@yahoo.com)
۲- مربی پژوهشی، بخش آفات و بیماری‌های گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان
۳- استادیار، رئیس اداره کنترل مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Archive of SID
www.SID.ir

انسان‌ها و حیوانات دارند همواره روش‌های مختلف شیمیایی و بیولوژیکی برای کنترل پرگنه این قارچها در مواد غذایی مطرح بوده است. در این خصوص ترکیبات طبیعی از جمله انواع بی ضرر و کم ضرر آنها برای انسان و حیوان و عصاره‌های گیاهی و روغن‌های فرار مناسب می‌باشند و به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۵).

اسید پروپیونیک و اسید سیتریک دو ماده شیمیایی هستند که به طور بالقوه می‌توانند از رشد کپک‌ها جلوگیری کنند و حتی اثر ضد مایکوتوکسینی این مواد هم به اثبات رسیده است (۱۵). عصاره گیاه آلوئه‌ورا هم که دارای فعالیت ضد قارچی است در داروهای مختلف و کرم‌های بهداشتی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از برگ‌های تازه آلوئه‌ورا دو ماده بدست می‌آید، یک جزء آبی که عصاره زرد رنگ و تیز و تلخ می‌باشد و یک قسمت گوشتی که مغز موسیلاژی از بافت‌های پارانشیمی است. عصاره مایع، ماهیت فنولیک دارد (۱۸)، علاوه بر آن دارای ترکیبات دیگری مثل مونوپلی ساکاریدها، تنین‌ها، استرول‌ها، اسیدهای آلی، آنزیم‌ها، ساپونین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد. مهم‌ترین قسمت فعال عصاره گیاه آلوئه ورا، آلونین است که یک هتروکسی آنتراکینون است (۱۶). گوش و همکاران (۱۱) اثر اسید پروپیونیک را روی رشد گونه *Aspergillus flavus* و میزان تولید توکسین تولیدی آن بررسی کردند. روسول و همکاران (۲۰) و گودا و همکاران (۱۲) به ترتیب غلظت‌های ۱-۰/۲۵درصد و ۰/۵-۰/۱درصد از اسید پروپیونیک و اسید سیتریک را در کاهش رشد *Aspergillus parasiticus* بررسی کردند. در بررسی اثر عصاره آبی آلوئه‌ورا، باجوا و شفیق (۵) اثر این را روی رشد گونه‌های پاتوژنیک جنس آلترناریا آزمایش کردند. همچنین باجوا و همکاران (۴) اثر بازدارندگی عصاره آلوئه ورا علیه *Aspergillus niger* را مورد بررسی قرار دادند. در مورد رابطه تولید آفلاتوکسین و تشکیل اسکلرت، رحیمی و همکاران (۱) به منظور بررسی ارتباط بین تولید آفلاتوکسین با سختینه زایی، جدایه‌های *Aspergillus flavus* را در محیط کشت چاپک کشت دادند، اما ارتباط مستقیمی بین تولید آفلاتوکسین توسط *Aspergillus flavus* و تشکیل اسکلرت مشاهده نکردند. در حالیکه اباس و همکاران (۲) رابطه‌ای معنی دار مشاهده کردند. چانگ و همکاران (۷) نیز نشان دادند که رابطه کمی و مثبت بین توسعه اسکلرت و تولید آفلاتوکسین وجود دارد. ایگال و همکاران (۹) نیز به همین نتیجه رسیدند با انجام تحقیقات رابطه مثبتی بین تولید اسکلرت و میزان تولید آفلاتوکسین بیان کردند. هدف از انجام این مطالعه بررسی رابطه بین تولید اسکلرت و میزان تولید آفلاتوکسین در جدایه‌های *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* می‌باشد در این مطالعه اثر دو ماده شیمیایی اسید پروپیونیک و اسید سیتریک و همچنین عصاره آبی آلوئه ورا را هم در کاهش رشد پرگنه گونه *Aspergillus parasiticus* بررسی کرده‌ایم.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

از ۱۸ انبار در شهرستان‌های کرمان و راور از هر کدام میزان یک کیلوگرم پسته جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و پس از کدگذاری (نام انبار، رقم پسته، تاریخ جمع‌آوری) به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های مورد نظر تا زمان استفاده در دمای $C^{o}$ ۲۰- نگهداری شدند.

### جداسازی گونه‌های آسپرژیلوس

جداسازی فلور قارچ از میوه‌های پسته به این شکل انجام شد. در پلیت‌های استریل هشت سانتی‌متری در شرایط استریل یک عدد کاغذ صافی استریل قرار داده شد و از هر نمونه ۲۰ عدد میوه پسته انتخاب شد. در هر پلیت پنج عدد میوه پسته قرار داده شد. سپس ml ۵۰ آب مقطر استریل به منظور تامین رطوبت ریخته شد. پلیت‌ها در دمای $25C^{o}$ در آزمایشگاه نگهداری شدند. بعد از دو یا سه روز رشد یا عدم رشد قارچ بوسیله استریومیکروسکوپ بررسی شد. جدایه‌های آسپرژیلوس متعلق به سکشن فلاوی[2] جدا شده و روی محیط سیب زمینی، دکستروز و آگار[1] کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای $28C^{o}$ در انکوباتور قرار داده شدند.

### شناسایی گونه‌ها

شناسایی گونه‌ها بر اساس کلید شناسایی کلیچ و پیت و با توجه به مشخصات مورفولوژیکی انجام گرفت. مشخصات مورفولوژیکی عبارت بودند از: اندازه وزیکل، نوع وزیکل، اندازه فیالاید، اندازه متیولا، اندازه کنیدی و کنیدیوفور، وضعیت سطح اسپورها (صاف یا خاردار بودن)، وضعیت سلول‌های کنیدی‌زا (تک ردیفه یا دو ردیفه بودن) وجود آسکوکارپ، شکل و رنگ کنیدی و رنگ سلول کنیدی‌زا. در مورد هر جدایه ۲۰ اندازه گیری انجام شد و میانگین آن‌ها محاسبه شد (۱۳). در مجموع ۱۷ جدایه *Aspergillus flavus* و ۳۴ جدایه *Aspergillus parasiticus* از میوه‌های پسته جداسازی شد.

### بررسی تولید اسکلرت در جدایه‌ها

برای تعیین توانایی تولید اسکلرت، جدایه‌ها روی محیط چاپک کشت داده شدند و مدت یک ماه در انکوباتور در دمای $28C^{o}$ نگهداری شدند. نمونه‌ها با استریومیکروسکوپ بررسی شدند. اندازه اسکلرت جدایه‌ها، یادداشت شد. در مرحله بعد میزان آفلاتوکسین تولید شده توسط این جدایه‌ها اندازه‌گیری شد.

1- PDA(potato dextrose agar)
2- Flavi section

Archive of SID

www.SID.ir

### بررسی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها

برای بررسی نوع و میزان تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا[1] استفاده شد. جدایه‌ها روی محیط چاپک کشت داده شدند و مدت هفت روز در دمای ۲۵±۲ C° در تاریکی نگهداری شدند. سپس آنالیز کروماتوگرافی مایع با فشار بالا[1] طبق روش Rodrigues و همکاران (۱۹) به شرح زیر انجام شد. تعداد سه قطعه پلاگ آگار به قطر ۵ میلی متر از هر کلنی محیط کشت برداشته و پس از وزن کردن، داخل لوله‌های کوچک قهوه‌ای رنگ منتقل شدند. سپس به هر کدام ۲ میلی لیتر متانول مخصوص HPLC اضافه کرده لوله‌ها به مدت یک ساعت نگه‌داشته شدند و سپس محتویات لوله با شیکر کاملاً مخلوط شدند.

در مرحله بعد عصاره آماده شده با روش مذکور داخل لوله‌ها با سرنگ از فیلترهای (25mm , 0.45µm) عبور داده و عصاره خروجی داخل لوله‌های مخصوص دستگاه جمع آوری شد. عصاره آماده شده به راک مخصوص دستگاه (اتوسمپلر) منتقل شد. دستگاه طبق برنامه داده شده عصاره مورد نظر را پس از آماده‌سازی از ستون آفلاتست[2] عبور داده و نمونه را جمع‌آوری کرد، سپس نمونه جمع آوری شده به ستون دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا با مارک Dionex تزریق گردید. دمای محیط ۳۶C° و میزان عبور ماده ml/min ۰/۸، حجم لوپ تزریق ۱۰۰ میکرولیتر، فاز متحرک شامل۵۷ درصد استونیتریل، ۴۱ درصد آب و ۲ درصد اسید سیتریک بود. پس از تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، نهایتاً نتایج به صورت کروماتوگرام مشخص شد. در ابتدای برنامه کاری (روزانه) جهت حصول اطمینان از صحت کار دستگاه دو پلیت حاوی محیط کشت چاپک که فاقد پرگنه قارچ بود، را با دو غلظت ۵ppb و ۱۰ ppb با آفلاتوکسین استاندارد $B_1,B_2,G_1,G_2$ آلوده نموده و پس از اندازه‌گیری میزان آلودگی آن‌ها، درصد بازیابی محاسبه شد.

### کالیبراسیون

برای کالیبره‌کردن دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، شش نمونه استاندارد مخلوط آفلاتوکسین به شرح زیر و با غلظت‌های ذکر شده به دستگاه تزریق گردید.

Std1= $B_1$, $G_1$ = 0.025 ppb  $B_2$ , $G_2$ = 0.00625 ppb

Std2= $B_1$, $G_1$ = 0.05 ppb  $B_2$ , $G_2$ = 0. 0125 ppb

Std3= $B_1$, $G_1$ = 0. 1 ppb  $B_2$ , $G_2$ = 0. 025 ppb

Std4= $B_1$, $G_1$ = 0. 2 ppb  $B_2$ , $G_2$ = 0.0 5 ppb

Std5= $B_1$, $G_1$ = 0. 4 ppb  $B_2$ , $G_2$ = 0. 1 ppb

Std6 =$B_1$, G1 = 0. 8 ppb  $B_2$ , $G_2$ = 0. 2 ppb

دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا برای این شش استاندارد تزریق شده منحنی کالیبراسیون رسم نموده و نتایج نمونه‌های مجهول بر اساس منحنی کالیبراسیون فوق محاسبه گردید.

### تهیه غلظت‌های اسید پروپیونیک و اسید سیتریک

غلظت‌های ٪ ۰/۵، ۰/۸، ۱، ۱/۵ اسید پروپیونیک و اسید سیتریک تهیه شد، بدین طریق که میزان ۰/۵، ۰/۸، ۱، ۱/۵ میلی لیتر از این اسیدها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد و به پلیت‌های هشت سانتی متر حاوی محیط کشت چاپک استریل (قبل از این که محیط سرد شده و ببندد) اضافه شد و از آب مقطر به عنوان تیمار شاهد استفاده شد هر کدام از محیط کشت‌ها با یک پلاک آگار از قارچ *Aspergillus parasiticus* تلقیح شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از ۷۲، ۴۸ و ۹۶ ساعت قطر پرگنه‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد.

**روش کار تهیه عصاره آلوئه ورا:** برگ‌های تازه آلوئه ورا با آب شسته و با دستمال خشک شد سپس با یک تیغ استریل اجزاء برگ را به قطعات ریز تبدیل کرده و درون آب مقطر استریل در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داشته شد سپس عصاره مورد نظر از پارچه ململ عبور داده شده و با کاغذ صافی واتمن صاف شد و تحت شرایط استریل به محیط کشت چاپک استریل شده ( قبل از این که محیط سرد شده و ببندد) به نسبت‌های ۲و۴و۶ درصد اضافه شد. پلیت‌های حاوی محیط با پلاک آگار از جدایه *A. Parasiticus* تلقیح شدند. از آب مقطر به عنوان تیمار شاهد استفاده شد پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداشته شدند پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت قطر کلنی‌ها اندازه گیری شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد (۴).

### تجزیه آماری

آنالیز مواد شیمیایی اسید پروپیونیک و اسید سیتریک با پنج تیمار و در چهار تکرار انجام شد. همچنین آنالیز عصاره آبی آلوئه ورا با چهار تیمار در چهار تکرار انجام شده و در نهایت داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار SPSS و آزمون دانکن تحلیل آماری شده و نمودارهای مربوطه با برنامه Exel رسم و نتایج تفسیر گردید. مقایسه تولید آفلاتوکسین در جدایه‌هایی که تولید اسکلرت نوع L و نوع S کردند با جدایه‌هایی که اسکلرت تولید نکردند با نرم افزار SPSS و آزمون دانکن (آزمون F) انجام شد.

1- HPLC
2- Aflatest

Archive of SID

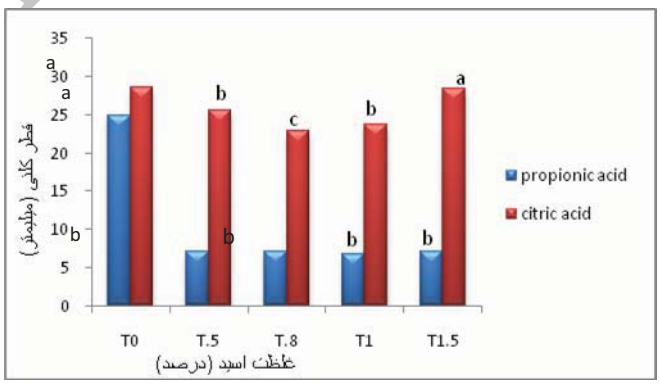
www.SID.ir

## نتایج و بحث

در مجموع ۱۷ جدایه BY54، AY25، BY57، AX61، AX68،BT3، AX56، AY212، AX69، AX41، BT11، BY53، BT9، BT2، BY511، BT15، AY28 گونه *Aspergillus flavus* و ۳۴ جدایه AY213، AY214، AX32، AX57،AX65، AX67، BT1، BT7، BT10، BY21، BT17، BY26، BY32، BY55، BY56، BY58، BY516، BY59، AZ4، BY24، AY3، BY24، AX52، AY210، BY34 ، AX52، AX21، AZ1، BY515، AY215، BY2 ، AZ2، AX11، BY514 گونه *A. parasiticus* شناسایی شد. گونه *Aspergillus parasiticus* که غالب بود برای انجام آزمایشات بررسی اثر مواد شیمیایی و عصاره گیاهی انتخاب شد، با توجه به مطالعات انجام شده در این آزمایشات غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۰/۸، ۱، ۱/۵ درصد از اسید پروپیونیک ($p<0.05$) نسبت به شاهد از رشد پرگنه قارچ *Aspergillus parasiticus* جلوگیری کردند. بنابراین اثر بازدارندگی اسید پروپیونیک در همه سطوح نسبت به شاهد مشاهده شد. بین میانگین غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸، ۱، ۱/۵ درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل۱). غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸، ۱، ۱/۵ درصد از اسید پروپیونیک در مقایسه با شاهد رشد قطر پرگنه *Aspergillus parasiticus* را به طور کامل کاهش دادند (شکل ۱). با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی اثر اسید سیتریک غلظت‌های ۰/۸ درصد و ۱ درصد از اسید سیتریک در مقایسه با شاهد به طور متوسط رشد پرگنه *Aspergillus parasiticus* را کاهش دادند. در غلظت ۰/۵ درصد اسید سیتریک هم در مقایسه با شاهد کاهش قطر پرگنه دیده شد. غلظت ۱/۵ درصد اسید سیتریک با شاهد تفاوتی نداشت و تاثیری در کاهش قطر پرگنه نشان نداد. غلظت ۰/۵و ۱ درصد اسید سیتریک اگر چه در مقایسه با شاهد توانستند رشد پرگنه را کاهش دهند، اما با هم اختلاف چندانی نداشتند (شکل ۱). خواص ضد قارچی اسید سیتریک برای جلوگیری از رشد گونه *Aspergillus parasiticus* متوسط بود (۳۶-۴۶ درصد کاهش). در بررسی اثر عصاره آبی آلوئه‌ورا نتایج نشان داد که غلظت‌های ۲، ۴ و۶ درصد آلوئه‌ورا قطر پرگنه قارچ *Aspergillus parasiticus* را در مقایسه با تیمار شاهد به طور متوسط کاهش دادند. اثر بازدارندگی آلوئه‌ورا ($p<0.05$) در همه سطوح نسبت به شاهد مشاهده شد. بین نسبت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). در این مطالعه اثر اسید پروپیونیک و اسید سیتریک به عنوان بازدارنده رشد *Aspergillus parasiticus* روی محیط کشت جامد سنجیده شد و بازدارندگی موثر در کاهش قطر پرگنه دیده شد. درجه بازدارندگی اسید پروپیونیک ارتباطی با غلظت‌های متفاوت بکار برده آن‌ها نداشت، اما ممکن است این تاثیرات روی پایداری مواد غذایی و شرایط مزرعه و غذاهایی که مدت طولانی انبار می‌شوند ضعیف‌تر باشد، بنابراین می‌طلبد تحقیقات جامع و کاملی در این زمینه انجام شود.

این مواد به خوبی بازدارنده رشد گونه *Aspergillus parasiticus* می‌باشند، بنابراین با کاهش رشد این کپک‌ها تولید توکسین هم کاهش می‌یابد. هدف از انجام این آزمایشات جلوگیری از تولید آفلاتوکسین با توجه به مضراتی که برای سلامتی انسان دارد، می‌باشد. در همین راستا گوش و همکاران (۱۱) گزارش کردند که غلظت ۰/۵ درصد اسید پروپیونیک از رشد کپک و بیوسنتز آفلاتوکسین توسط قارچ *Aspergillus flavus* جلوگیری کرد.

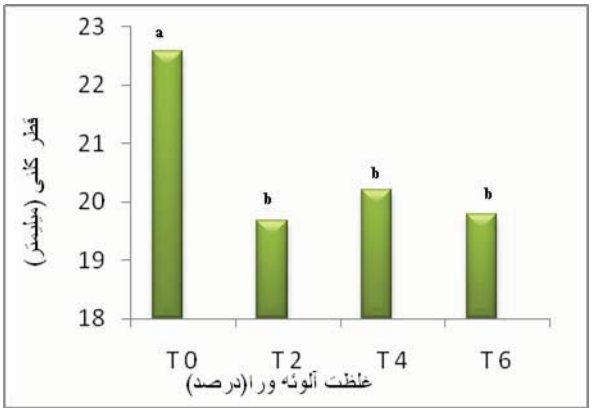
همچنین روسول و همکاران (۲۰) طی انجام تحقیقاتی در این زمینه گزارش کردند، غلظت (۱-۰/۲۵درصد) از اسید پروپیونیک رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین توسط *Aspergillus parasiticus* را کاهش داد. نتایج مطالعه ما همچنین با نتایج گودا و همکاران (۱۲) که بیان کردند اسید پروپیونیک در غلظت‌های ۰/۵-۰/۱ درصد به طور کامل از رشد *Aspergillus parasiticus* جلوگیری کرد، مطابقت داشت.




**شکل ۱- اثر اسید پروپیونیک و اسید سیتریک روی رشد قطر پرگنه *Aspergillus parasiticus* محور افقی: TO: تیمار شاهد (آب مقطر)، T0.5: غلظت 0.5 درصد اسیدها، T0.8: غلظت 0.8 درصد اسیدها، T1: غلظت 1درصد اسیدها، T1.5: غلظت 1.5 درصد اسیدها**

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۲- اثر آلوئه‌ورا روی رشد پرگنه *Aspergillus parasiticus***

محور افقی: TO: تیمار شاهد (آب مقطر)، T2: غلظت ۲درصد آلوئه‌ورا، T4: غلظت ۴درصد آلوئه‌ورا، T6: غلظت ۶درصد آلوئه‌ورا

طی گزارشی اثر بازدارندگی اسید پروپیونیک برای قارچ *Aspergillus parasiticus* روی محیط جامد ثابت شد (Monila and Giannuzzi, 1999). اسید سیتریک در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸و ۱درصد اثر بازدارندگی متوسطی روی رشد قطر پرگنه *Aspergillus parasiticus* داشت، اما در غلظت ۱/۵درصد بی تاثیر بود. می‌توان گفت که غلظت‌های پائین‌تر اسید سیتریک تاثیر بیشتری در کاهش قطر پرگنه داشت. مطالعات در همین زمینه نشان داد که اسید سیتریک ($p<0.01$) میزان اسپور قارچ و تولید توکسین را در همه سطوح در مقایسه با شاهد کاهش داد (۴). در نان‌های تیمار شده با اسید سیتریک کاهش رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* و مهار تولید آفلاتوکسین $G_1$, $B_1$ توسط این قارچ گزارش شد (۱۷).

آلوئه‌ورا اثرات سمی برای رشد قارچ‌ها و تکثیر آن‌ها دارد که با توجه به گونه‌های مورد آزمایش و غلظت‌های آزمایش شده متغیر است. باجوا و شفیق (۵) فعالیت ضد قارچی عصاره برگ‌های آلوئه‌ورا در حلال‌های آلی و غیر آلی را بر ضد گونه‌های پاتوژنیک جنس آلترناریا ارزیابی کرده و نشان دادند که عصاره‌های آبی برگ از رشد سه گونه قارچ ۱۰۰درصد جلوگیری کردند. در مورد عصاره ان – هگزان[1]، بازدارندگی با غلظت‌های به کار برده شده متغیر بود. غلظت‌های ۲ تا ۶ درصد آلوئه ورا به طور کامل بیومس سه گونه از جنس آلترناریا را کاهش داد. همچنین باجوا و همکاران (۳) قوه بازدارندگی عصاره‌های آبی سه گونه آللوپاتیک را علیه رشد پرگنه آسپرژیلوس نایجر آزمایش کردند و نتایج مثبتی ارائه دادند. نتایج این مطالعه با گزارش بررسی عصاره هیدروآللیک برگ‌های تازه آلوئه‌ورا بر ضد رشد میسلیومی فوزاریوم[2] که توسط کازین (۶) روی محیط چاپک آزمایش شد مطابقت داشت.

### مقایسه تولید آفلاتوکسین در جدایه‌های با اسکلرت نوع L، S و نوع N

از بین ۵۰ جدایه شناسایی شده، تعداد ۱۴ جدایه تولید اسکلرت نوع بزرگ (L) دو جدایه تولید اسکلرت نوع کوچک (S) کردند و ۳۴ جدایه هم اسکلرت تولید نکردند. در این سه گروه میزان آفلاتوکسین $B_1$, $B_2$ و میزان کل این دو نوع آفلاتوکسین مقایسه شد. با توجه به نتایج حاصله جدایه‌هایی که تولید اسکلرت نوع S کردند میزان آفلاتوکسین $B_1$ بیشتری در مقایسه با جدایه‌هایی که تولید اسکلرت نوع L و جدایه‌هایی که اسکلرت نداشتند، تولید کردند. بین جدایه‌های گروه L و گروه N تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان تولید آفلاتوکسین مشاهده نشد (شکل ۴). میزان آفلاتوکسین $B_2$ در جدایه‌های دارای اسکلرت نوع S بیشتر از نوع N بود. اما تفاوت معنی‌داری بین این گروه و جدایه‌های دارای اسکلرت نوع L مشاهده نشد (شکل ۵). در مقایسه میزان کل آفلاتوکسین، گروه S میزان بیشتری آفلاتوکسین در مقایسه با گروه N و L تولید کرد. بین دو گروه N و L تفاوت معنی‌داری از نظر تولید میزان کل آفلاتوکسین دیده نشد (شکل ۶).

در این مطالعه جدایه‌های دارای اسکلرت نوع L در مقایسه با جدایه‌های که اسکلرت تولید نمی‌کردند از لحاظ میزان تولید آفلاتوکسین تفاوت معنی داری نداشتند. اما جدایه‌هایی که تولید اسکلرت نوع S کردند، آفلاتوکسین بیشتری نسبت به جدایه‌هایی که اسکلرت نوع L داشتند، تولید کردند. همچنین جدایه‌های گروه S در مقایسه با جدایه‌هایی که اسکلرت نداشتند، هم میزان بیشتری آفلاتوکسین تولید کردند. رحیمی و همکاران (۱) در بررسی تولید اسکلرت و آفلاتوکسین در گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های پسته، بیان کردند که ارتباط مستقیمی بین تولید اسکلرت و تولید آفلاتوکسین وجود ندارد. اباس و همکاران (۲) رابطه بین تولید

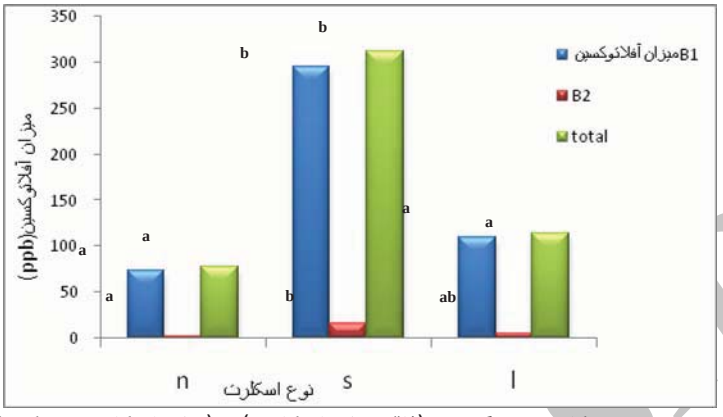
1 -n-hexan

2 - *Fusarium* sp

Archive of SID

www.SID.ir

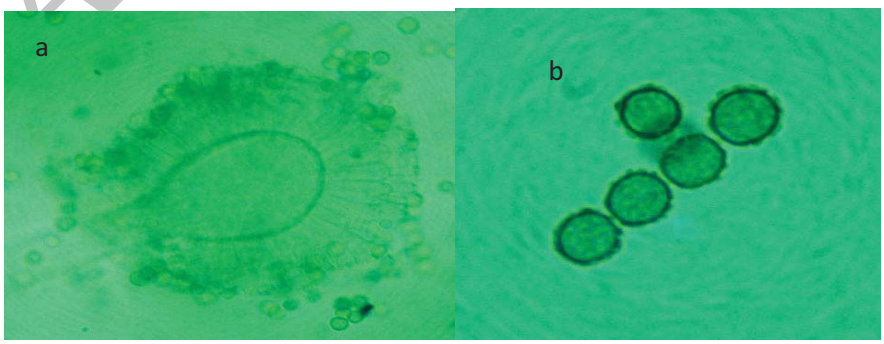
آفلاتوکسین و تشکیل اسکلرت بین جدایه‌های گروه فلاوی را بررسی کردند. استرین‌هایی که تولید اسکلرت نوع L کردند آفلاتوکسین بیشتری نسبت به استرین‌هایی که اسکلرت نداشتند تولید کردند. چانگ و همکاران (۷) طی تحقیقاتی که انجام دادند نتیجه گرفتند که توسعه اسکلرت با تولید آفلاتوکسین رابطه عکس دارد. توسعه اسکلرت و بیوسنتز آفلاتوکسین به صورت تنگاتنگی به هم مرتبطاند. نتایج عده‌ای از این پژوهشگران با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. اگر چه رابطه بین تولید اسکلرت و سنتز آفلاتوکسین در *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* وجود دارد اما هنوز این روابط به خوبی تعریف نشده‌اند (۷).




**شکل ۳- مقایسه تولید آفلاتوکسین B1, B2, و کل در سه گروه n (فاقد تولید اسکلرت)، s (تولید اسکلرت نوع کوچک s) و l (تولید اسکلرت نوع بزرگ L)**

**جدول ۱- تجزیه واریانس مقایسه تولید آفلاتوکسین در گروه‌های L، S و N**

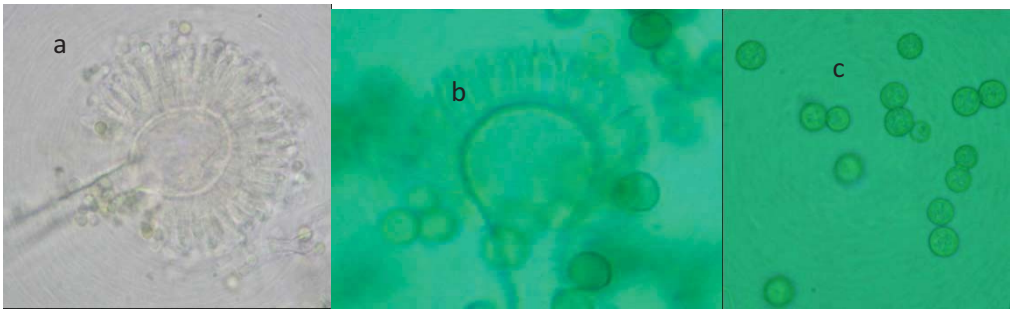
| | | SS | df | MS | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B1 | بین گروه‌ها | ۹۸۶۴۷/۷۲۳ | ۲ | ۴۹۳۲۳/۸۶۸ | ۴/۵۵۵ | ۰/۰۱۶ |
| | در گروه‌ها | ۵۰۸۸۶/۷۲۲ | ۴۷ | ۱۰۸۲۷/۳۷۷ | | |
| | کل | ۶۰۷۵۳۴/۴۴۵ | ۴۹ | | | |
| B2 | بین گروه‌ها | ۴۳۹/۶۸۹ | ۲ | ۲۱۹/۸۴۴ | ۳/۰۷۸ | ۰/۰۵۵ |
| | در گروه‌ها | ۳۳۵۶/۸۸۵ | ۴۷ | ۷۱/۴۲۳ | | |
| | کل | ۳۷۹۶/۵۷۳ | ۴۹ | | | |
| TOTAL | بین گروه‌ها | ۱۰۹۰۸۷/۹۸۷ | ۲ | ۵۴۵۴۳/۹۹۳ | ۴/۳۰۶ | ۰/۰۱۹ |
| | در گروه‌ها | ۵۹۵۳۹۰/۴۴۶ | ۴۷ | ۱۲۶۶۷/۸۸۲ | | |
| | کل | ۷۰۴۴۷۸/۴۳۲ | ۴۹ | | | |




**شکل٤ – a) سر کنیدی‌زای دو طرفه در گونه *Aspergillus parasiticus* (عکس اصلی با بزرگنمایی ٤٠x) b) اسپورهای با سطح خاردار در گونه *Aspergillus parasiticus* (عکس اصلی با بزرگنمایی ۱۰۰ x)**

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل۵- a) سر کنیدی‌زای دو ردیفه (biseriate) در گونه *Aspergillus flavus*.(عکس اصلی با بزرگنمایی۴۰x)، b) سر کنیدی‌زای یک ردیفه (monoseriate) در گونه *Aspergillus flavus* (عکس اصلی با بزرگنمایی ۴۰ x)، c) کنیدی‌های با سطح صاف در گونه *Aspergillus flavus* (عکس اصلی با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ x)**

## سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری اساتید و کارمندان بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی کرمان کمال سپاس و تشکر را دارند.

## منابع

۱- رحیمی پ.، شریف نبی ب. و بهار م. ۱۳۸۶. گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از میوه‌های پسته و بررسی تولید آفلاتوکسین در آنها. مجله رستنیها، جلد۸ ، شماره ۱،. صفحات ۴۲-۳۰.

2- Abbas H.K., Weaver M.A., Zalotowicz R.M., Horn B.W. and Shier W.T. 2005. Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section Flavi from the Mississipi delta. European Journal of Plant Pathology, 112:283-287.

3- Bajwa R,. Akhtar N. and Javid A. 2001. Antifungal activity of allelopathic plant extracts.I. Effect of aqueous extracts of three allelopathic Asteraceous species on growth of Aspergilli. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4:503-507.

4- Bajwa R. Shafique S. Anjum T. and Shafique S. 2004. Antifungal activity of allelopathic plant extracts.I. Growth response of *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* and *Drechslera hawaiiensis* to aqueous extract of Partenium hysterophorus. The International Journal of Agricultural, 38: 175-184.

5- Bajwa R. and shafique S. 2007. Apprasial of antifungal activity of Aloevera. Mycopathologia, 5:5-9.

6- Casian O.R., Parvu M., Vlase L. and tamas M. 2007. Antifungal activity of Aloevera leaves. Fitoterapia, 78:219-222.

7- Chang P.K., Bennett J.W. and Cotty P.J. 2001. Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia, 153:41-48.

8- Cheraghali A.M., yazdanpanah H., doraki N., Abouhossain G., Hassibi M., Aliabadi S., Aliakbarpour M., Amirahmadi M., Askarian A., Fallah N., Hashemi T., Jalali M., Kalantari N., Khodadadi E., Maddah B., Mohit, R., Mohseny, m., Phaghihi, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleymani, E. and Zamanian, F. 2007. Incidence of aflatoxin in Iran pistachio nuts. Food and Chemichal Toxicology, 45:812-816.

9- Egel D.S., Cotty P.J. and Elias K.S. 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. Flavi that vary in aflatoxin production. Phytopathology, 84:906-912.

10- Geiser D.M., Dorner J.W., Horn B.W. and Taylor J.W. 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus orayzea*. Fungal Genetics and Biology, 31:169-179.

11- Gosh M.K., Chhabra A. Atreya P.P., and Choppra R.C. 1996. Effect of treating with propionic acid, sodium bisulfate and sodium hydroxide on the biosynthesis of aflatoxin on groundnut cake. Animal Feed Science and Technology, 60: 43-49.

12- Gowda N.K.S., Malathi V. and Suganthi R.U. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Animal Feed Science and Technology, 116:281-291.

13- Klich M. A. and Pitt J. I. 1988. Differentiation of *A. flavus* from *A. parasiticus* and other closely related

Archive of SID

www.SID.ir

species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91: 99-108.
14- Kumar, V. Basu, M.S. and Rajendron, T.P. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commertially important agricultural commodities. Crop Protection, 27:891-905.
15- Monila M. and Giannuzzi L. 1999. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of Aspergillus parasiticus. Food Research International, 32:677-682.
16- Newall C.A., Anderson L.A., and Phillipson J.D. 1996. Herbal medicines. The Pharmaceutical Press, London, 25.
17- Reiss, J. 1997. Prevention of the formation of mycotoxins in whole wheat bread by citric acid and lactic acid. Experientia, 32:168-169.
18- Reynolds T. 1985. The compounds in Aloe leaf exudates: a review. Botanical Journal of the Linnean Society, 90:157-177.
19- Rodrigues P., Venoncio A., Kozakiewicz Z. and Lima N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from Portugals almond. International Journal of Food Micobiology, 129:187-193.
20- Rusul G., El-Gazzar F.E., and Marth E.H. 1987. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of acetic or propionic acid and at differential PH values. Journal of Food Protection, 50:909-914.
21- Varga J., Frisvad J.C. and Samson R.A. 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxin. Mycology, 2:263-277.
22- Whitlow L.W., and Kagler W.M. 2005. Mycotoxins: A Review of dairy concerns. Mid-South Ruminant Nutrition Conference.
23- Yu J., Bhatnagar D. and Ehrlich K.C. 2002. Aflatoxin biosynthesis. Reviberoam Micology, 19:191-200.

Archive of SID

www.SID.ir