

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

مهدی قربانیان^۱، دکتر مهدی رزاقی‌ابیانه^{۲*}، دکتر عبدالامیر علامه^۳، دکتر معصومه شمس‌قهرخی^۱، دکتر غلامرضا بابایی^۴،
دکتر محمدباقر رضایی^۵

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

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

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

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

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

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

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

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

Hakim 2005; 8(3); 54-60.

چکیده:

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

روش کار: قارچ مولد سم (آسپرژیلوس پارازیتیکوس NRRL 2999) در محیط سوکروز فقیر از املاح (SLS) در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه چریش (۰/۲، ۰/۸، ۳/۱۲، ۱۲/۵ و ۵۰ درصد حجمی/حجمی) در دوره‌های زمانی مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و شرایط متحرک ۱۲۰ دور در دقیقه کشت داده شد. سپس وزن خشک میسلیمی تعیین گردید و محتوای آفلاتوکسین B_1 (AFB₁) میسلیمی و ترشحی با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) اندازه‌گیری شد.

نتایج: عصاره آبی برگ چریش فاقد هر گونه تأثیر معنی‌دار بر رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس بود. تولید آفلاتوکسین در نمونه‌های کنترل (بدون مجاورت با عصاره) در روز ۸ به حداکثر رسید و سپس تا روز ۱۲ در حد ثابت باقی ماند. مهار بیوسنتز آفلاتوکسین در مجاورت چریش از نوع وابسته به زمان و دوز بود. در نمونه‌های مجاور شده با عصاره، در فاصله زمانی ۲ روز تغییری در تولید آفلاتوکسین نسبت به کنترل مشاهده نشد. غلظت ۱۲/۵ و ۵۰ درصد عصاره در روز ۴ و روزهای ۶ تا ۱۲، منجر به کاهش تولید آفلاتوکسین شد که این کاهش در سطح $P < 0.05$ با نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت.

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

کل واژگان: آفلاتوکسین B_1 ، چریش، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، کروماتوگرافی لایه نازک، زمان انکوباسیون.

مقدمه:

نوع آفلاتوکسین B_1 و B_2 (فلورسانس آبی) و G_1 و G_2 (فلورسانس سبز) قابل شناسایی است. آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 اشکال هیدروکسیله آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 در شیر هستند (۳).

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

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

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

بر اساس رنگ فلورسانس بر روی صفحه سیلیکاژل، چهار

روی (۱۰ میلی گرم)، بورات سدیم (۲ میلی گرم)، سولفات آهن (۲ میلی گرم)، کلرید منگنز (۲ میلی گرم) و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد. محیط پس از تهیه، به میزان ۵۰ میلی لیتر در ارلن های ۳۰۰ میلی لیتری تقسیم شد و اتوکلاو گردید. در شرایط استریل غلظت های ۰/۲، ۰/۸، ۳/۱۲، ۱۲/۵ و ۵۰ درصد حجمی / حجمی از عصاره آبی برگ چریش، همراه با سوسپانسیون اسپور قارچ به ارلن ها اضافه شد. حجم نهایی تمام ارلن ها با بافر فسفات پتاسیم استریل در سطح ۱۰۰ میلی لیتر قرار گرفت. آزمایش در هر غلظت عصاره به صورت سه تایی انجام شد. ارلن های محیط کشت در انکوباتور شیکر دار در دمای 28 ± 1 درجه سانتی گراد قرار گرفت و دور آن در سطح ۱۲۰ دور در دقیقه تنظیم شد. کشت ها در شش دوره زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز مورد بررسی قرار گرفتند.

- سنجش وزن خشک قارچ: جهت تعیین میزان رشد قارچ، وزن خشک میسلیمیوم از طریق قرار دادن وزن مشخصی از میسلیوم قارچ در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت تعیین گردید.

- سنجش آفلاتوکسین B₁ میسلیمیوم و محیط کشت:

وزن مشخصی از میسلیوم توسط ازت مایع منجمد گردید و با کمک شن ریزه شسته شده با اسید به همراه کلروفرم در دو مرحله عصاره گیری شد. عصاره حاصل، از سولفات سدیم بدون آب عبور داده شد و پس از انجام تغلیظ توسط دستگاه روتاری، نمونه ها تا مرحله سنجش در دمای ۲۰- درجه قرار گرفت. آفلاتوکسین موجود در نمونه های محیط کشت نیز در حضور کلروفرم با استفاده از کیف دکانتور و دستگاه شیکردکانتور عصاره گیری گردید.

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

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

یافته ها:

نتایج حاصله در مورد رشد قارچ آسپیرژیلوس پارازیتیکوس در

جینی از دیگر اثرات مهم این سم است (۴ و ۲). بیوسنتز آفلاتوکسین در قارچهای مولد با مشارکت واحدهای استات و مالونات شروع می شود. چندین دسته ژنی در تنظیم و کنترل آنزیم های مسیر بیوسنتز سم دخالت دارند (۵). بدلیل اهمیت آفلاتوکسین B₁، مطالعات زیادی در مورد تأثیر مهارتی ترکیبات مختلف بر تولید آن انجام گرفته است. دی کلروس (۶)، سلنیت (۷)، نیترازاها (۸)، اکسیژن (۹)، سولفیت پتاسیم (۱۰)، بی فلاوونوئیدها (۱۱)، بلاستی سیدین A (۱۲) و آفلاستاتین A (۱۳) از جمله مهار کننده های مهم تولید آفلاتوکسین هستند. یکی از ترکیبات مهارتی که در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، گیاه چریش می باشد. اجزای مختلف چریش نظیر میوه، دانه، برگ و روغن، اثرات متعددی را دارا هستند. از جمله، عصاره آبی برگ چریش، تولید آفلاتوکسین را در محیط کشت به مقدار زیادی مهار می کند در حالی که تأثیر چندانی بر رشد قارچ مولد سم ندارد (۱۴ و ۱۵). در تحقیق حاضر تأثیر پارامتر زمان بر رشد قارچ آسپیرژیلوس پارازیتیکوس و تولید آفلاتوکسین توسط آن در مجاورت غلظت های مختلف گیاه چریش بررسی شده است.

روش کار:

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

- تهیه عصاره آبی برگ چریش: برگ گیاه چریش بصورت تازه از موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع تهیه گردید. ۵۰ گرم برگ پس از شستشو، توسط دستگاه هموژنایزر در مجاورت یک لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با pH 7، عصاره گیری شد. عصاره حاصل توسط سانتریفوژ یخچال دار در $7000 \times g$ رسوب گیری شد و صاف شده آن با عبور از صافی های ۰/۲۲ میکرون توسط کیف سارتریوس، استریل گردید.

- روش کشت: از محیط سوکروز فقیر از املاح (SLS) برای کشت قارچ استفاده شد. این محیط حاوی سوکروز (۸۵ گرم)، آسپاراژین (۱۰ گرم)، سولفات آمونیوم (۳/۵ گرم)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۱۰ گرم)، کلرید کلسیم (۷۵ میلی گرم)، سولفات

تا ۱۰ و سپس کاهش آن در روز ۱۲ بود. نسبت آفلاتوکسین ترشچی به داخل سلولی در روز ۴ (۹ به ۱) بسیار بالاتر از دیگر دوره‌های زمانی بود. سنجش میزان ترشح سم توسط قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* در نمونه‌های مجاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه چریش، تقریباً الگوی نمونه‌های کنترل را نشان داد (جدول ۲).

بحث:

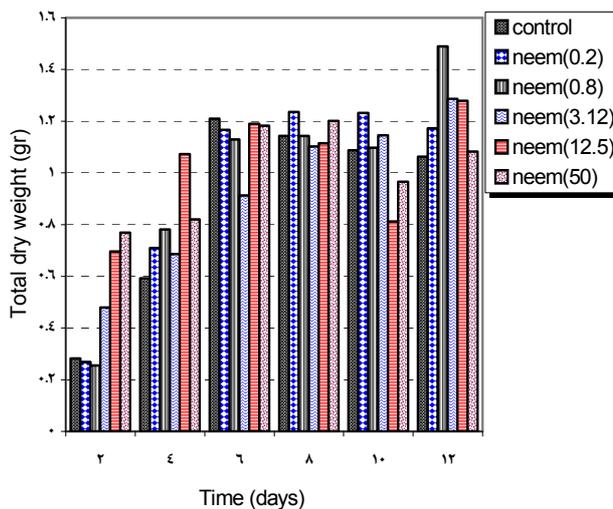
آفلاتوکسین‌ها گروه بسیار با اهمیتی از زنبیوتیک‌ها هستند که همانند سایر متابولیت‌های ثانویه قارچی، فاقد هر گونه نقش شناخته شده در رشد ارگانیسم‌های مولد خود بوده و در شرایط خاص محیطی تولید می‌شوند. این سموم دارای اثرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی در انسان و حیوانات هستند. اعضاء گروه *آسپرژیلوس فلاووس* بدلیل توانایی تولید انواع آفلاتوکسین توجه بسیاری از محققین را بخود جلب کرده‌اند. در این میان دو گونه *فلاووس* و *پارازیتیکوس* در شرایط مساعد بسرعت بر روی مواد غذایی و یا محیط‌های صنعتی آزمایشگاه رشد می‌کنند و آفلاتوکسین تولید می‌نمایند (۱۶ و ۱۷ و ۴ و ۱).

بدلیل اهمیت آفلاتوکسین‌ها بویژه AFB_1 ، ترکیبات زیادی از نظر اثرات مہار کنندگی بر تولید آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۸). در این میان نتایج تحقیقات اولیه نشان داد که گیاه چریش یکی از مہار کنندگان پر قدرت تولید آفلاتوکسین در قارچ‌های مولد می‌باشد (۱۵، ۱۴). در تحقیق حاضر، تاثیر پارامتر زمان بر رشد قارچ مولد سم *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و تولید آفلاتوکسین توسط آن در مجاورت عصاره آبی برگ گیاه چریش بررسی گردید.

بررسی وزن خشک میسلیمی قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* نشان داد که هم در نمونه‌های کنترل و هم نمونه‌های مجاور شده با عصاره، رشد قارچ تا روز ۶ افزایش می‌یابد و پس از آن تا روز ۱۲ در حد ثابتی باقی می‌ماند. بنابراین پارامتر زمان نیز تأثیری بر فرایند رشد قارچ در حضور عصاره آبی برگ گیاه چریش ندارد. عدم تأثیر عصاره برگ چریش بر رشد قارچ مولد، آن را از نظر بررسی اثرات مہار کنندگی بر تولید آفلاتوکسین بسیار مناسب می‌گرداند (نمودار ۱). این مسئله توسط سایر محققین نیز منحصراً در دوره زمانی ۴ روز نشان داده شده است (۱۴ و ۱۵).

سنجش آفلاتوکسین B_1 نمونه‌های کنترل نشان داد که بیشترین میزان تولید سم بین روزهای ۴ و ۶ کشت می‌باشد و

نمودار ۱ نشان داده شده است. بر این اساس، در نمونه‌های کنترل (فاقد عصاره)، وزن خشک قارچ تا روز ۶ افزایش یافت و سپس تا روز ۱۲ در حد تقریباً ثابتی باقی ماند. در نمونه‌های مجاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره برگ چریش و در همه دوره‌های زمانی، همین الگو مشاهده شد. در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که پارامتر زمان فاقد تاثیر معنی‌دار بر رشد *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* در مجاورت این عصاره می‌باشد.



نمودار ۱- تأثیر پارامتر زمان بر میزان رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* NRRL2999 در مجاورت عصاره آبی برگ گیاه چریش

در مورد سطح آفلاتوکسین B_1 میسلیمی در نمونه‌های کنترل، نتایج نشان داد که میزان تولید سم از روز ۲ تا روز ۸ سیر صعودی داشت و پس از آن تا روز ۱۲ در حد ثابت باقی ماند. آنالیز آماری نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطح آفلاتوکسین B_1 در دوره‌های زمانی ۱۲-۶ روز با روز ۲ بود ($P < 0.05$). سنجش میزان آفلاتوکسین B_1 نمونه‌های مجاور شده با غلظت‌های مختلف عصاره به شرح ذیل گزارش گردید. در روز ۲ تولید سم نسبت به نمونه‌های کنترل تغییری نداشت. در روز ۴، در غلظت‌های ۵۰-۳/۱۲ درصد، تولید سم نسبت به کنترل کاهش یافت. در دوره‌های زمانی ۱۲-۶ روز نیز تولید آفلاتوکسین B_1 توسط قارچ مولد در مجاورت تمامی غلظت‌های عصاره کاهش داشت. این کاهش بویژه در غلظت ۵۰ درصد عصاره بیش از ۸۰ درصد گزارش گردید و در سطح کمتر از ۰/۰۵ نسبت به نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۱). نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری آفلاتوکسین B_1 ترشچی در نمونه‌های کنترل نشان دهنده افزایش میزان ترشح آن از روز ۲

جدول ۱- بررسی تأثیر پارامتر زمان بر الگوی بیوسنتز آفلاتوکسین B₁* در نمونه های کنترل و نمونه های حاوی عصاره برگ گیاه چریش در کشت های غوطه ور آسپیرژیلوس پارازیتیکوس ۲۹۹۹ NRRL

دوره زمانی (روز)		غلظت عصاره (%V/V)					
۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲		
۱۰۱۹/۷۷	۹۸۱/۹۹	۹۱۵/۰۶	۶۲۰/۳۶	۲۴۳/۳۲	۱۳۴/۰۸	کنترل	
±۱۰۲/۰۸	±۴۰/۶۰	±۸۵/۱۲	±۱۰۳/۹۱	±۹۰/۰۳	±۱۴/۳۲		
۵۷۲/۷۰	۷۶۹/۶۰	۶۵۳/۰۷	۴۷۳/۶۰	۳۸۶/۲۶	۱۴۷/۱۱	۰/۲	
±۱۱/۷۰	±۱۰۰/۱۲	±۳۵/۴۳	±۳۷/۸۴	±۷۲/۵۸	±۴۳/۵۳		
۴۹۱/۳۹	۶۰۱/۸۴	۵۹۶/۷۱	۵۰۹/۱۵	۳۳۵/۵۸	۱۵۳/۵۶	۰/۸	
±۸۳/۵۷	±۶۰/۸۰	±۱۱۸/۹۰	±۴۸/۱۴	±۸۲/۱۲	±۲۸/۱۱		
۲۹۵/۵۸	۲۷۹/۰۸	۳۵۶/۷۱	۴۸۳/۱۲	۲۵۷/۷۹	۸۴/۱۶	۳/۱۲	
±۴۲/۳۸	±۳۷/۴۹	±۲۵/۸۶	±۴۸/۱۰	±۷۴/۵۴	±۱۲/۷۰		
۲۵۰/۴۶	۱۷۹/۲۳	۲۳۰/۴۶	۲۱۸/۲۵	۱۳۷/۹۱	۷۸/۷۰	۱۲/۵	
±۴۶/۷۰	±۴۱/۱۰	±۹۲/۷۵	±۲۷/۷۱	±۱۰/۶۱	±۲۳/۳۷		
۱۷۹/۷۷	۱۵۰/۴۶	۸۲/۶۹	۱۰۳/۹۸	۱۰۷/۳۱	۴۹/۷۹	۵۰	
±۴۰/۸۷	±۴۶/۷۰	±۲۰/۳۲	±۳۱/۰۳	±۱۱/۴۷	±۵/۵۰		

*میزان AFB₁ بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک میسلیم می باشد.

جدول ۲- بررسی تأثیر پارامتر زمان بر الگوی ترشح آفلاتوکسین B₁* در نمونه های کنترل و نمونه های حاوی عصاره برگ گیاه چریش در کشت های غوطه ور آسپیرژیلوس پارازیتیکوس ۲۹۹۹ NRRL

دوره زمانی (روز)		غلظت عصاره (%V/V)					
۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲		
۲۳۹۵/۷۷	۳۳۷۸/۱۳	۳۰۱۶/۴۱	۲۶۶۱/۷۵	۲۲۳۴/۷۶	۵۶۳/۴۷	کنترل	
±۳۰۲/۹۷	±۳۲۴/۴۲	±۲۸۵/۳۰	±۱۲/۴۳	±۱۵۴/۷۲	±۹۸/۳۰		
۱۱۸۴/۵۷	۱۸۱۱/۶۲	۲۱۵۸/۴۸	۲۵۶۱/۸۵	۲۷۱۰/۴۲	۸۷۷/۵۵	۰/۲	
±۱۶۲/۸۷	±۱۰۸/۰۱	±۱۵۸/۲۵	±۱۲/۴۳	±۳۳/۸۱	±۶۱/۱۶		
۱۰۰۱/۴۷	۱۶۹۷/۲۳	۲۴۵۰/۸۷	۲۵۷۱/۹۷	۲۷۹۲/۷۷	۸۴۶/۸۰	۰/۸	
±۱۵۲/۲۸	±۱۲۰/۴۲	±۳۶۷/۰۸	±۴۸/۸۵	±۱۲۴/۰۲	±۱۲۷/۹۵		
۱۰۴۰/۳۱	۷۷۱/۴۶	۱۹۱۳/۲۳	۲۰۴۱/۱۳	۱۸۱۳/۱۲	۶۷۸/۰۷	۳/۱۲	
±۲۰۷/۱۴	±۶۳/۹۲	±۱۷۴/۱۷	±۷۰/۷۵	±۱۲۸/۶۱	±۸۴/۵۸		
۹۰۶/۵۱	۱۱۴۵/۵۱	۹۴۶/۷۶	۱۶۲۳/۵۷	۱۳۳۶/۳۳	۴۶۸/۷۷	۱۲/۵	
±۹۴/۰۱	±۱۵/۱۸	±۶۶/۶۲	±۱۱/۹۹	±۵۶/۰۳	±۵۱/۲۴		
۲۶۹/۸۲	۲۰۶/۵۱	۲۴۰/۸۶	۲۳۲/۸۲	۳۰۵/۵۴	۸۶/۵۸	۵۰	
±۴۳/۵۴	±۴۶/۷۰	±۷۳/۵۳	±۶۵/۱۰	±۳۸/۰۹	±۲۵/۳۹		

*میزان AFB₁ بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک میسلیم می باشد.

تولید آن را در طول زمان متوقف نمی کنند. این موضوع نشان می دهد چنانچه غلظت AFB₁ در ابتدای مرحله بسته بندی یا ذخیره سازی در محدوده کمتر یا برابر استانداردهای اعلام شده توسط مراکز نظارتی باشد، با افزایش زمان نگهداری ماده غذایی تولید سم کماکان ادامه می یابد و به مقدار آن افزوده می شود. پس لازم است تعیین میزان آفلاتوکسین مواد غذایی پیش از

پس از آن از شدت افزایش سم کاسته می شود و در روزهای ۱۰ و ۱۲ به حد ثابت می رسد. بنابراین بنظر می رسد، میزان بیوسنتز سم وابسته به غلظت آن در سیتوپلاسم قارچ است و در غلظت معینی از AFB₁ داخل سلولی، واکنش های تنظیمی موجب ثبات تولید سم می گردد، اما هیچگاه متوقف نمی گردد. بنابراین قارچ های مولد AFB₁ در محیط زیست و بر روی مواد غذایی،

بدلیل اهمیت آفلاتوکسین‌ها در بهداشت عمومی و تأثیر عصاره برگ چریش در مهار تولید آن توسط قارچ‌های مولد، لازم است با تجزیه دقیق عصاره، ترکیبات مؤثر آن را شناسایی نمود و به منظور کنترل و مهار تولید آفلاتوکسین در مواد غذایی، راهکارهای مناسب را به کار بست. یکی از این راهکارها تعیین ژن‌های کد کننده ترکیبات مهار کننده تولید آفلاتوکسین در گیاه چریش است. سپس با انجام کلون این ژن‌ها در گیاهانی که محصول آنها برای تولید آفلاتوکسین توسط قارچ‌های مولد مناسب است، در صورت کلونیزه شدن این قارچ‌ها در مراحل کاشت، داشت، برداشت و ذخیره‌سازی بر روی این گیاهان و محصول آنها، تولید سم توسط قارچ‌ها تضعیف یا مهار می‌شود.

تشکر و قدردانی:

از آقای دکتر جایمند از بخش شیمی جابر بن حیان مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، آقای دکتر کریمی و آقای هادی‌زاده از بخش ریوی انستیتو پاستور ایران، آقای دکتر خاکسار از بخش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور ایران، آقای دکتر یادگاری از بخش قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، آقایان دکتر شوشتری و دکتر ملک آرا از بیمارستان حسینیه ارشاد وابسته به مدیریت درمان تأمین اجتماعی کرج صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

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

از طرف دیگر ثبات تولید سم در قارچ، احتمالاً مربوط به کاهش میزان ترکیبات مؤثر در بیوسنتز سم در محیط نیست زیرا اولاً؛ مقادیر ترکیبات محیط کشت در حد اشباع است و ثانیاً میزان رشد قارچ نیز دستخوش کاهش در دوره‌های زمانی انتهایی نمی‌گردد. میزان تولید AFB₁ به هنگام مجاور شدن قارچ مولد با عصاره برگ چریش بویژه در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۵۰ درصد آن به شدت کاهش می‌یابد. این مهار تولید سم توسط Bhatnagar و همکاران (۱۵) و Allameh و همکاران (۱۴) در کشت‌های ۴ روزه مجاور شده با عصاره آبی برگ چریش نیز نشان داده شده است. بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره برگ چریش تولید سم را در مراحل خاصی از مسیر بیوسنتز کاهش می‌دهد.

نتایج حاصل از سنجش AFB₁ ترشح شده از سلول قارچ به محیط کشت، در نمونه‌های کنترل، نشان دهنده افزایش آن در دوره‌های زمانی ۴ و ۶ است که مطابق با حداکثر تولید سم در داخل سلول قارچی است. پس از ثابت شدن بیوسنتز در دوره‌های زمانی بعدی، میزان ترشح سم نیز کاهش یافته و در حد ثابتی است. بنابراین به نظر می‌رسد که مقدار ترشح سم با میزان تولید آن در داخل سلول‌های قارچی ارتباط مستقیم دارد.

منابع:

- 1- علامه، عبدالامیر و رزاقی ابیانه، مهدی، مایکوتوکسین‌ها، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه امام حسین (ع)، ۱۳۸۰، صفحه ۷۹-۱.
- 2- Richard JL. Mycotoxins and human disease. In: Anaissie, McGinnis, Pfaller, eds. Clinical Mycology. New York. Churcill Livingston; 2003;:389- 98.
- 3- Hussein SH, Brasel JM. Review: Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 2001; 167: 101-34.
- 4- D'Mello J, Felix P. Handbook of Plant and Fungal Toxicant. CRC Press. Boca Raton; 1997: 189- 255.
- 5- Brown MP, Brown- Jenco CS, Payne GA. Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis. Fungal Genet Biol 1999; 26: 81- 98.
- 6- Draughon FA. Control or supression of aflatoxin production with pesticides. South Coop Ser Bull 1983; 279: 81-6.
- 7- Badii F, Moss MO, Willson K. The effect of sodium biselenite on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* and the growth of other *Aspergilli*. Lett Appl Microbiol 1986; 2: 61-4.
- 8- Kachholz T, Demain AL. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. J Nat Prod 1983; 46: 499-506.
- 9- Shih N, Cassity TR, Chipley JR. Partial characterization of the mode of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis. Can J Microbiol 1977; 23: 1580-4.
- 10- Davis ND, Diener UL. Inhibition of aflatoxin synthesis by P- amino- benzoic acid, potassium sulfite and potassium flouride. Appl Microbiol 1967; 15: 1517-8.
- 11- Gonsalez E, Felicio JD, Pinto MM. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Brazilian J Med Biol Res 2001; 3 (11): 1453-6.
- 12- Sakuda S, Ono M, Ikeda H, et al. Blastocidin A as an inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J Antibiot 2000; 53(11): 1265-71.
- 13- Konda T, Sakuda M, Okamoto S, et al. Effect of aflastatin A, an inhibitor of aflatoxin production, on aflatoxin biosynthetic pathway and glucose metabolism in *Aspergillus parasiticus*. J Antibiot 2001; 54(8): 650-7.
- 14- Allameh A, Razzaghi abyaneh M, Shams M, et al. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins, and activities of fatty acid syntethase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S- transferase in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia 2001; 154(2): 79- 84.

- Microbiol 1998; 43: 141-58.
- 17- Cole RJ, Cox RH. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York: Academic Press; 1981: 87-165.
- 18- Zaik LA, Buchanan RL. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxin. J Food Prot 1987; 50(8): 691-708.
- 15- Bhatnagar D, McCormic SP. The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. J Am Oil Chem Soc 1988; 65: 1166-8.
- 16- Sweeny MY, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus Fusarium* and *Penicillium* species. J Food