جهاددانشگاهی واحد مشهد

عنوان طرح:

بررسی تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس گونه PTCC (1637) و مخمر ساکارومایسس سرویزیه PTCC (5177) بر سمیت زدایی آفلاتوکسین B_1 در شرایط *in vitro*

کد طرح: ۱۱-۲۰۹۵

گروه پژوهشی: گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی

مسئول طرح: رضا کاراژیان

مرداد ۱۳۹۳

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات طرح:

عنوان طرح :	بررسی تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس گونه PTCC(1637) و مخمر ساکارومایسس سرویزیه PTCC (5177) بر سمیت زدایی آفلاتوکسین B_1 در شرایط *in vitro*
کد	۲۰۹۵-۱۱
مسئول طرح:	رضا کاراژیان، کارشناس ارشد مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی
محل اجراء:	گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، جهاددانشگاهی واحد مشهد
همکاران طرح:	معصومه مهربان سنگ آتش، فائزه تجلی، محسن مجتهدی، محمد صادق
تاریخ تهیه گزارش	مرداد ۱۳۹۳

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات مسئول و همکاران طرح

نام و نام خانوادگی	رشته تحصیلی	میزان تحصیلات	مسئولیت در طرح	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
رضا کاراژیان	مهندسی کشاورزی – علوم و صنایع غذایی	کارشناسی ارشد	مجری	۶۰۰
معصومه مهربان سنگ آتش	مهندسی کشاورزی – علوم و صنایع غذایی	دکترای تخصصی	همکار	۱۰۰
فائزه تجلی	مهندسی شیمی – بیوتکنولوژی	کارشناسی ارشد	همکار	۱۰۰
محسن مجتهدی	مهندسی کشاورزی – تغذیه نشخوار کنندگان	دکترای تخصصی	همکار	۱۰۰
محمد صادق	مهندسی کشاورزی – علوم و صنایع غذایی	کارشناسی ارشد	همکار	۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده:

آفلاتوکسین ها متابولیت های ثانویه ناشی از رشد کپک ها در محصولات غذایی می باشند. امروزه ترکیبات آفلاتوکسین B_1 و آفلاتوکسین M_1، به دلیل سرطان زایی در خوراک گاوهای شیرده و همچنین در شیر و محصولات لبنی، به شدت کنترل می گردند. سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 و آفلاتوکسین B_1 در شیر خام و خوراک دام را به ترتیب ۰/۵ ppb و ۲۰ ppb تعیین کرده است. در حالیکه اتحادیه اروپا حداکثر مقدار مجاز این توکسین ها را به ترتیب ۰/۰۵ ppb و ۱۰ ppb تعیین کرده است. در ایران نیز مقرراتی برای حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 در محصولات لبنی مختلف وضع شده است که طبق آن، مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر حداکثر ۰/۰۵ ppb در نظر گرفته شده است.

از آنجایی که شیر و فراورده‌های آن به عنوان یکی از سالم‌ترین و پرمصرف‌ترین فراورده‌های غذایی برای انسان خصوصاً کودکان و نوجوانان و افراد سالخورده مطرح می‌باشد، حضورآفلاتوکسین M_1 در این فراورده‌ها در مقادیر بالاتر از حد استاندارد، برای مصرف کننده مخاطره‌آمیز است. استفاده بسیاری از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای حذف مایکوتوکسین‌ها از مواد غذایی آلوده بدلیل مشکلات مربوط به مباحث ایمنی و امکان از دست رفتن کیفیت تغذیه ای محصول، کارایی کم و هزینه بالای آن‌ها محدود شده است. به نظر می‌رسد که بر طبق نتایج آزمایشاتی که تاکنون وجود دارند، میکروارگانیسم‌ها که عمده ترین ارگانیسم‌های زنده می‌باشند می‌توانند برای تجزیه مایکوتوکسین‌ها به کار روند.

در این تحقیق تأثیر باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه GG (PTCC1637) و مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5177) بر سمیت زدایی و جذب توکسین آفلاتوکسین B_1 در شرایط *in vitro* (محیط شکمبه گاو) بررسی گردید. به این منظور از میکروارگانیسم های مورد نظر تیمارهای مختلف (زنده، تیمار شده با اتوکلاو، تیمار شده با حرارت

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰۰°C و تیمار شده با اسید) تهیه شد و به مقدار 10^8 CFU/mL از آن ها به محیط شکمبه گاو افزوده شد. سم آفلاتوکسین B_1 در مقادیر مختلف (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ppb) نیز به محیط شکمبه افزوده شدند و به مدت زمان ۲ ساعت در دمای ۳۷ °c اینکوباتور گذاری شد. سپس میزان سم باقیمانده در محیط در زمان های ۱ و ۲ ساعت اینکوباسیون توسط روش الایزا با استفاده از کیت یوروپروکسیما اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که میکروارگانیسم های یاد شده در حالت تیمار اتوکلاو شده بیشترین میزان حذف سم را (۸۲/۶٪) داشته اند. همچنین مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در جذب سم از محیط شکمبه توانایی بیشتری را دارد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان اینکوباسیون میزان جذب سم به طور معنی داری (۷۸٪) افزایش یافته است. همچنین با افزایش غلظت سم در محیط کشت توانایی میکروارگانیسم ها در جذب سم افزایش می یابد. این نتایج بیانگر این مطلب است که عمده جذب توکسین توسط دیواره سلولی میکروارگانیسم ها انجام می شود و به همین دلیل میکروارگانیسم در حالت غیر زنده خود توانایی جذب بالاتری را دارد و این به دلیل ترکیب مانوپروتئینی دیواره سلول مخمر و نیز ترکیبات پروتئینی و پلی ساکاریدی دیواره سلول باکتری است که در جذب سم موثر هستند.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B_1، محیط کشت شکمبه، سمیت زدایی، باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمر

Archive of SID

www.SID.ir

پیشگفتار:

مایکوتوکسین ها متابولیت‌های سمی تولید شده توسط قارچ‌ها هستند که به صورت عمده توسط قارچ‌های ساپروفیت در حال رشد روی بعضی از مواد غذایی شامل خوراک دام و همچنین بوسیله تعدادی از پاتوژن‌های گیاهی تولید می‌شوند و به‌طور بالقوه برای انسان و دام خطرناک هستند. از اوایل سال ۱۹۶۰ مایکوتوکسین‌ها مسئول بسیاری از بیماری‌ها شناخته شده‌اند.

آفلاتوکسین ها مهمترین مایکوتوکسین‌هایی هستند که تاکنون شناخته شده‌اند و جزء سمی‌ترین مایکوتوکسین‌های مورد مطالعه هستند. آلودگی مایکوتوکسین در مواد غذایی تهدید بزرگی برای سلامت انسان، حیوانات و تجارت بین المللی محسوب می‌شود. بر طبق نظر سازمان خواروبار و کشاورزی ایالات متحده، تخمین زده می‌شود که ۲۵٪ محصولات غذایی جهان در هر سال تحت تاثیر مایکوتوکسین‌ها از بین می‌روند.

در اوایل دهه ۱۹۵۰ و نیز در سال های ۱۹۵۹ و ۱۹۶۰ میلادی در حیواناتی از قبیل سگ و بوقلمون بیماری های کشنده ای اتفاق افتاد که مشخص شد علت آن در اثر مصرف خوراک آلوده به سموم قارچی بوده است در نتیجه آن جلوگیری از آلودگی خوراک به مایکوتوکسین ها و همچنین حذف آن اهمیت زیادی پیدا کرد.

این کشف منجر به رشد آگاهی در مورد سموم قارچی و همچنین آلودگی‌های غذایی ناشی از آن‌ها که باعث بیماری و حتی مرگ در انسان و دیگر پستانداران می‌گردد، شد. دانشمندان پی بردند که آفلاتوکسین‌ها بیشتر توسط سویه‌های خاصی از *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و بعضی از سایر گونه‌ها چون *آسپرژیلوس نومیوس* و *آسپرژیلوس نایجر* تولید می‌شوند. به علاوه، در این مطالعات چهار نوع آفلاتوکسین اصلی به نام‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 شناسایی شدند. علاوه براین، دو نوع متابولیت تولید شده از آن‌ها به نام‌های M_1 و M_2 که باعث آلودگی مستقیم غذای انسان و خوراک حیوانات می‌شوند، معرفی گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

هنگامی که گاو شیری غذای آلوده به آفلاتوکسینB_1 را مصرف می‌کند، این نوع آفلاتوکسین به آفلاتوکسینM_1 متابولیزه می‌شود که قسمتی از آن از طریق شیر دفع می‌گردد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که سرطان‌زایی آفلاتوکسینM_1 نسبت به B_1 کمتر است. با توجه به اهمیت آفلاتوکسین‌ها، در سال ۱۹۹۷، ۶۶ کشور پیشنهادی را درباره تعیین محدوده مجاز آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی مطرح کردند. بر این اساس در ایالات متحده امریکا و نیز اتحادیه اروپا حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسینM_1 در شیر نوشیدنی و شیر مورد استفاده به عنوان غذای کودک به ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ قسمت در بیلیون تعیین شد.

تحقیقات نشان داده است که بهترین روش سم زدایی مواد غذایی و خوراک آلوده به مایکوتوکسین ها استفاده از سویه های موثر میکروبی است به خصوص باکتری های اسید لاکتیک و مخمرها نقش عمده ای را در این زمینه ایفا می کنند.

دستگاه گوارش همه علف خواران بالغ حاوی جمعیت هایی از باکتری هـــا، تک یاخته هـــا و قارچ هـــای بی هوازی اســـت که نقـــش عمده ای در هیدرولیز مواد خوراکـــی دارند و علاوه بر آن همزیســـتی مسالمت آمیزی با حیوان میزبان دارند. در سال های اخیر، مواد افزودنی متعددی جهت بهبود شرایط تخمیر در شکمبه و افزایش تولید حیوانات نشخوار کننده مورد استفاده قرار گرفته است. این ترکیبات شامل بازدارنده های تولید متان، آنتی بیوتیک ها، پروبیوتیک ها، عوامل رشد و آنزیم ها می باشند.

تحقیقات نشان داده است که افزودن باکتری های پروبیوتیک در تغذیه دام ها دارای مزایای متعددی از قبیل جلوگیری از عفونت ها، فعالیت ضد سرطانی، اثر بر سیستم ایمنی و ایجاد مهار کننده جهت اتصال سایر باکتری ها به دیواره روده هستند. افزودن مخمرها نیز باعث تثبیت باکتری های موجود در روده می شوند و توکسین ها را جذب می کنند.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول: کلیات تحقیق	۱
۱-۱- آفلاتوکسین B1	۲
۱-۲- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین B1	۳
۱-۳- اثر آفلاتوکسین‌ها بر سلامت انسان و دام	۳
۱-۴- روش های کاهش یا حذف آفلاتوکسین	۶
۱-۴-۱ روش های فیزیکی	۶
۱-۴-۱-۱- حرارت	۶
۱-۴-۱-۲- ماکروویو	۷
۱-۴-۱-۳- اشعه گاما	۸
۱-۴-۱-۴- اشعه ماوراء بنفش و نور مرئی	۸
۱-۴-۲- روش های شیمیائی	۸
۱-۴-۲-۱-واکنش مواد شیمیایی با سم آفلاتوکسین و تخریب آن	۸
۱-۴-۲-۲- کلر	۹
۱-۴-۲-۳-پراکسید هیدروژن	۹
۱-۴-۲-۴- بی سولفیت سدیم	۱۰
۱-۴-۲-۵-آمونیاک	۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۴-۲-۶- اوزن ۱۱
۱-۴-۲-۷- بازها ۱۱
۱-۴-۲-۸- اسیدها ۱۱
۱-۵- مواد جاذب سم آفلاتوکسین ۱۳
۱-۶- عوامل بیولوژیکی کاهش دهنده آفلاتوکسین ۱۴
۱-۷- بررسی وضعیت محیط شکمبه دام ۱۸
۱-۸- استفاده از فرآورده های میکروبی در تغذیه گوساله های شیر خوار ۲۰
۱-۹- استقرار باکتری ها در شکمبه ۲۲
۱-۱۰- تقسیم بندی پروبیوتیک ها ۲۳
۱-۱۰-۱- پروبیوتیک های باکتریایی ۲۳
۱-۱۰-۲-پروبیوتیک های غیر باکتریایی ۲۳
۱-۱۰-۲-۱- ساکارومایسس سرویزیه ۲۳
۱-۱۰-۲-۲-آسپرژیلوس اوریزا ۲۴
۱-۱۱- علت استفاده از پروبیوتیک ها در تغذیه دام ۲۴
۱-۱۱-۱- اثرات پروبیوتیک های باکتریایی بر روده ۲۴
۱-۱۱-۲- جلوگیری از عفونت های روده ای ۲۴
۱-۱۱-۳- تشکیل کلنی در اپیتلیال روده ۲۵
۱-۱۱-۴- تولید متابولیتهای بازدارنده ۲۵
۱-۱۱-۵- فعالیت ضد سرطانی ۲۶
۱-۱۱-۶- اثر بر کلسترول خون ۲۶

Archive of SID
www.SID.ir

۱-۱۱-۷- اثر بر سیستم ایمنی ۲۶

فصل دوم: پیشینه تحقیق ۲۸

۲-۱- کاربرد باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در کاهش سم آفلاتوکسین ۲۹

۲-۲- کاربرد مخمر ساکارومایسس سرویزیه در کاهش سم آفلاتوکسین ۳۳

۲-۳- اثر پروبیوتیک های غیر باکتریایی بر متابولیسم شکمبه ۳۵

۲-۳-۱- اثر آسپرژیلوس اوریزا ا و ساکارومایسس سرویزیه بر جمعیت میکروبی شکمبه ۳۵

فصل سوم :روش اجرای تحقیق ۳۷

۳-۱- مواد شیمیایی و محیط کشت ها ۳۸

۳-۲- تجهیزات ۳۹

۳-۳- روش‌ها ۴۱

۳-۳-۱- تهیه محلول¬های آفلاتوکسین B1 ۴۱

۳-۳-۲- تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۴۱

۳-۳-۳- تهیه محلول بافر فسفات ۴۱

۳-۳-۴- تهیه و آماده¬سازی سوش های میکروبی ۴۲

۳-۳-۵- تهیه سوسپانسیون باکتری ۴۲

۳-۳-۶- تهیه سوسپانسیون مخمر ۴۳

۳-۳-۷- جداسازی سلول‌ها ۴۳

۳-۳-۸- آماده سازی محیط شکمبه دام ۴۳

۳-۳-۹- آماده سازی تیمارهای میکروارگانیسم های مورد استفاده ۴۴

۳-۳-۹-۱- میکروارگانیسم زنده ۴۴

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۳-۹-۲- میکروارگانیسم اتوکلاو شده ۴۴
۳-۳-۹-۳- میکروارگانیسم جوشانده شده ۴۵
۳-۳-۹-۴- میکروارگانیسم تیمار اسیدی شده ۴۵
۳-۳-۱۰- اندازه¬گیری میزان آفلاتوکسین B1 به روش الایزا ۴۵
۳-۳-۱۰-۱- اصول الایزای آفلاتوکسین B1 ۴۶
۳-۳-۱۰-۲- آماده سازی نمونه ۴۶
۳-۳-۱۰-۳- آماده سازی معرف‌ها ۴۶
۳-۳-۱۰-۴- شیوه سنجش ۴۷
۳-۳-۱۰-۵- اندازه گیری دانسیته نوری نمونه ها ۵۰
۳-۳-۱۰-۶- رسم منحنی کالیبراسیون ۵۰
۳-۴- آنالیز آماری ۵۱
فصل چهارم: یافته های تحقیق ۵۲
۴-۱- بررسی اثر غلظت سم بر میزان جذب آفلاتوکسین B1 توسط میکروارگانیسم ها ۵۳
۴-۲- بررسی اثر تیمار میکروارگانیسم بر میزان جذب آفلاتوکسین B1 در محیط شکمبه ۵۳
۴-۳- مقایسه اثر حالت میکروارگانیسم ها (باکتری و مخمر) در جذب سم از محیط شکمبه ۵۴
۴-۴- بررسی اثر زمان در جذب سم از محیط شکمبه توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه ۵۵
۴-۵- اثر غلظت سم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسین B1 از محیط شکمبه ۵۶
۴-۶- اثر غلظت و نوع میکروارگانیسم (مخمر و باکتری) در کاهش سم آفلاتوکسین B1 از محیط شکمبه ۵۷
۴-۷- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه ۵۸
۴-۸- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و غلظت سم برکاهش میزان آفلاتوکسین B_1 ۵۹

Archive of SID
www.SID.ir

فصل پنجم: تجزیه و تحلیل یافته های تحقیق ۶۱

۵-۱- اثر غلظت سم و تیمار میکروارگانیسم بر میزان جذب آفلاتوکسین B1 در محیط شکمبه ۶۲

۵-۲- بررسی اثر زمان در جذب سم از محیط شکمبه توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه ۶۴

فصل ششم: نتیجه گیری و پیشنهادات ۶۶

۶-۱- نتیجه گیری ۶۷

۶-۲- پیشنهادات ۶۷

منابع و مأخذ

چکیده لاتین

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱- نقطه ذوب چهار آفلاتوکسین اصلی	۹

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین B_1	۵
شکل ۳- ۱- تصویر دستگاه الایزا	۴۹
شکل ۳- ۲- شماتیک الایزای رقابتی	۴۹
شکل ۳- ۳- تصویر تغییرات رنگ کیت آفلاتوکسین **B_1** در مراحل آزمون الایزا	۵۰
شکل ۳- ۴- منحنی کالیبراسیون	۵۱
شکل ۴-۱- بررسی اثر غلظت سم بر میزان جذب آفلاتوکسینB_1 توسط میکروارگانیسم ها	۵۳
شکل ۴-۲- بررسی اثر تیمار میکروارگانیسم بر میزان جذب آفلاتوکسینB_1 در محیط شکمبه	۵۴
شکل۴-۳- مقایسه اثر حالت میکروارگانیسم ها (باکتری و مخمر) در جذب سم از محیط شکمبه	۵۷
شکل۴-۴- بررسی اثر زمان در جذب سم از محیط شکمبه توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه	۵۸
شکل ۴-۵- اثر غلظت سم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسینB_1 از محیط شکمبه	۵۹
شکل ۴-۶- اثر غلظت و نوع میکروارگانیسم (مخمر و باکتری) در کاهش سم آفلاتوکسینB_1 از محیط شکمبه	۶۰
شکل ۴-۷- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسینB_1 از محیط شکمبه	۶۱
شکل ۴-۸- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و غلظت سم برکاهش میزان آفلاتوکسینB_1	۶۲

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول:

کلیات تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

آفلاتوکسین:

آفلاتوکسین‌ها از نقطه نظر شیمیایی مشتقات فورانوکومارین محسوب می‌شوند که توسط روش پلی‌کتید تولید می‌شوند و شامل دو گروه دیفوروکومارو سیکلوپنتانن (B_1, B_2, M_1) و دیفوروکومارولاکتون (G_2, G_1) می‌باشند که به عنوان گروه یک ترکیبات سرطان‌زا طبقه بندی شده‌اند. این ترکیبات هتروسیکلیک وزن مولکولی پایینی داشته و بر اساس منشأ اولیه، R_f و نور فلورسانسی که در حضور اشعه فرابنفش دارند به چهار گروه اصلی B_1، B_2، G_1 و G_2 تقسیم می‌شوند. آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 در طول موج ۴۲۵ نانومتر و G_1 و G_2 در طول موج ۴۵۰ نانومتر اشعه فرابنفش به ترتیب به رنگ آبی و سبزـ زرد فلورسانس تولید می‌کنند.

آفلاتوکسین‌ها در حضور اشعه فرابنفش به شدت از خود نور ساطع می‌کنند. در حضور رطوبت و دمای بالا تجزیه می‌شوند. آفلاتوکسین B_1 و آفلاتوکسین G_1 درحضور اسیدهای معدنی به آفلاتوکسین B_2 و آفلاتوکسین G_2 تبدیل می‌شوند. محصولات حاصل از هیدروژناسیون آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 به ترتیب، آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2 می‌باشند. آفلاتوکسین‌ها به مقدار زیادی در متانول حل می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها نسبت به گرما مقاومند و بعد از تشکیل شدن به سختی تخریب می‌شوند.

ترتیب سمیت آن‌ها به این ترتیب است : $B_1>G_1>B_2>G_2$ (۲۸)

۱-۱- آفلاتوکسین B_1:

آفلاتوکسین B_1 جزء سمی‌ترین و سرطان‌زاترین آفلاتوکسین‌ها می‌باشد بنابراین تحقیقات بیشتری روی آفلاتوکسین B_1 انجام شده است. ارتباط مثبت بین مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین و وقوع زیاد سرطان کبد در جوامع آسیایی و آفریقایی منجر به طبقه بندی

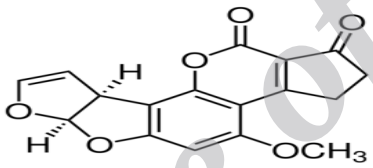
Archive of SID

www.SID.ir

آفلاتوکسینB_1 به عنوان گروه اول ترکیبات سرطان‌زا توسط آژانس بین المللی تحقیق روی سرطان شده است (۱۰).

۱-۲- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین B_1:

در حقیقت بیشتر گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* که سمی هستند عمدتا آفلاتوکسینB_1 و مقادیر کمتری آفلاتوکسینB_2, G_1 وG_2 تولید می‌کنند. یک ترکیب با فلورسانس بنفش-آبی آفلاتوکسینB نامیده شد. این ترکیب کریستالیزه شد و فرمول تجربی $C_{17}H_{12}O_6$ را نشان داد و وزن مولکولی آن مساوی ۳۱۲/۰۶۳ می‌باشد (شکل ۱) (۷۶).



شکل۱-۱- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین B_1

آزمایشات مربوط به خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بیوشیمیایی آفلاتوکسینB_1 نشان می دهد که این مولکول دو ناحیه مهم برای ایجاد فعالیت سمی دارد اولین ناحیه پیوند مضاعف بین کربن های ۸ و۹ در حلقه فورفوران است اثر متقابل بین پروتئین ها و DNA با مولکول آفلاتوکسین در این قسمت اتفاق می افتد. قسمت دوم حلقه لاکتون میباشد که به آسانی قابل هیدرولیز است. بنابراین فرآیندهای که برای تخریب آفلاتوکسین اعمال می شوند باید روی بند مضاعف در حلقه لاکتون اثر کنند و یا شکافی در حلقه لاکتون بوجود بیاورند. پس از باز شدن حلقه لاکتون واکنش های دیگر اتفاق می افتد (۷۶).

۱-۳- اثر آفلاتوکسین‌ها بر سلامت انسان و دام:

انسان همواره در معرض غذاهای آلوده به آفلاتوکسین‌ها می باشد زیرا جلوگیری کامل از آلودگی مواد غذایی به آفلاتوکسین‌ها کار بسیار مشکلی است. هرچند توزیع و فروش مواد غذایی که آلودگی بالایی به آفلاتوکسین‌ها نشان می‌دهند در

Archive of SID

www.SID.ir

کشورهای پیشرفته ممنوع است، اما ابتلا به سرطان همچنان یکی از اثرات زیان‌بار حضور سطوح پایینی از آفلاتوکسین‌ها در یک دوره طولانی در مواد غذایی است. در سال ۱۹۹۳، آژانس بین‌المللی تحقیقاتی سرطان[1]، آفلاتوکسین B_1 را در گروه نوع اول عوامل سرطان‌زای انسانی و آفلاتوکسین M_1 را در گروه نوع دوم طبقه‌بندی کرد.

مطالعات اپیدمیولوژی انجام شده در آسیا و آفریقا از وجود ارتباطی مثبت بین آفلاتوکسین‌ها و سرطان کبدی حکایت داشت. میزان سمیت و دامنه تأثیر آفلاتوکسین‌ها در انسان به عواملی از قبیل سن، جنس، وضعیت تغذیه و یا همزمانی آن‌ها با سایر بیماری‌ها نظیر هپاتیت ویروسی بستگی دارد. به طور کلی، مردان نسبت به زنان به آفلاتوکسین حساس‌ترند. بافت هدف آفلاتوکسین‌ها کبد می‌باشد. علاوه براین، باعث تضعیف شدید سیستم ایمنی نیز می‌شوند و به عنوان عامل اصلی ایجاد کننده بیماری‌های عفونی در مایکوتوکسیکوزهای ثانویه به حساب می‌آیند. شواهد مربوط به سرطان‌زایی آفلاتوکسین‌ها در انسان بر پایه نتایجی است که از تغذیه حیوانات آزمایشگاهی با غذای آلوده به دست آمده است. مسمومیت حاد با آفلاتوکسین در حیوانات آزمایشگاهی به خوبی به اثبات رسیده است. به عنوان نمونه ۵ درصد از جوجه اردک‌های یک روزه بعد از دریافت یک دز از آفلاتوکسین در سطح ۰/۷۳ میلی گرم آفلاتوکسین B_1، ۱/۱۸ میلی گرم آفلاتوکسین G_1، ۱/۷۶ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_2 و ۲/۸۳ میلی گرم آفلاتوکسین G_2 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از بین رفتند. دلیل اصلی مرگ آنها نارسایی کبدی تشخیص داده شد. وجود سطح پایینی از آفلاتوکسین‌ها در یک دوره طولانی در غذا معمولاً منجر به سرطان کبد با تأثیرات جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی می‌شود (۳۷).

در مورد بعضی از حیوانات از جمله موش صحرایی و قزل‌آلای رنگین کمان آفلاتوکسین B_1 سرطان‌زاترین ترکیب محسوب می‌شود. همچنین در دهه اخیر

[1] Internatinal Agency for Research on Cancer (IARC)

Archive of SID

www.SID.ir

مشخص شده که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند باعث ایجاد هپاتیت X در سگ شوند. بعضی از حیوانات از قبیل جوجه اردک یک روزه و سگ بالغ حساسیت فوق‌العاده‌ای به مسمومیت حاد با آفلاتوکسین دارند.

LD_{50} آفلاتوکسین‌ها برای اردک و سگ ۰/۵ و۰/۳۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد. مسمومیت کبدی با آفلاتوکسین M_1 در جوجه اردک و موش علایم یکسان و خفیف‌تری نسبت به آفلاتوکسین B_1 ایجاد می‌کنند (۱۷).

افزون بر این، وقوع بیماری آفلاتوکسیکوزیس حاد در انسان در بسیاری از بخش‌های جهان به ویژه کشورهای جهان سوم گزارش شده که باعث بروز تهوع، دردهای شکمی، ادم ریوی، تشنج، حضور چربی در کبد، کلیه‌ها و قلب، ورم مغزی، اغما و مرگ می‌شود. نتایج مطالعات متعدد ثابت کرده‌اند که نوزادان نیز ممکن است در معرض اثرات سمی آفلاتوکسین‌ها قرار گیرند. چنانچه مادران از مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین‌ها استفاده نمایند، آفلاتوکسین M_1 در شیر آن‌ها ظاهر می‌شود که می‌تواند خطر بالقوه‌ای برای سلامت نوزادان محسوب شود (۱۲).

حساسیت حیوانات به آفلاتوکسین‌ها و بروز آفلاتوکسیکوزیس به مقدار نسبتاً زیادی به جنس، سن، گونه و تغذیه آن‌ها بستگی دارد. نشانه‌های کلینیکی آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات شامل عملکرد بد روده‌ای- معده‌ای، کم‌خونی و زردی است. نتایج مطالعات حاکی از این است که آفلاتوکسین‌های B_1، G_1 و M_1 باعث انواع گوناگونی از سرطان در گونه‌های مختلف حیوانی می‌شوند (۱۲).

به علت اثرات سمی و سرطان زایی ثابت شده آفلاتوکسین ها جستجو و تخریب آن ها در ماده غذایی حائز اهمیت است. در ارتباط با اثر سمی آفلاتوکسین مشخص شده است حیواناتی که حدود ۰/۵ میلی گرم بر کیلو گرم از وزن بدن خود آفلاتوکسین B_1 دریافت کرده اند پس از ۷۲ ساعت می میرند و همچنین تمام حیوانات مورد آزمایش دچار ناراحتی های کبدی شده اند. حداکثر میزان مجاز آفلاتوکسین در غذاهای انسانی که توسط

Archive of SID

www.SID.ir

سازمان خواروبار و کشاورزی ایالات متحده تعیین شده است PPb ۲۰ و در غذاهای حیوانی PPb ۱۰۰ تا ppb۳۰۰ است (۱۷).

میزان آفلاتوکسین M_1 مجاز موجود در فراورده های لبنی که توسط سازمان خواروبار و کشاورزی ایالات متحده مشخص شده است PPb ۰/۵ می باشد. برای داشتن محصولی سالم و عاری از سموم قارچی مساله از دو جنبه قابل بررسی است: یکی شناخت شرایط تولید آفلاتوکسین و روش های پیشگیری از تولید آن و دیگری شناخت روش های سالم سازی محصول آلوده به این سموم است. از مهمترین عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین می توان درجه حرارت، میزان رطوبت، غلظت اکسیژن، نوع سوبسترا، pH ماده غذایی، اثرات متقابل میکروبی، وجود یا عدم وجود مواد بازدارنده نظیر اسید های آلی و صدمات مکانیسمی را نام برد (۱۶، ۱۹).

با توجه به ساختمان آفلاتوکسین اساس تعدادی از فرایندهایی که برای تخریب آفلاتوکسین اعمال می شوند بر باند مضاعف در حلقه لاکتون اثر کرده و موجب ایجاد شکاف در این حلقه می شوند.

۱-۴- روش های کاهش یا حذف آفلاتوکسین:

بطور کلی روش های کاهش یا حذف آفلاتوکسین که می توانند مورد استفاده قرارگیرند عبارتند از:

۱-۴-۱ روش های فیزیکی:

آفلاتوکسین ها پس از جذب انرژی برانگیخته شده و ممکن است تبدیل به محصولات غیر سمی و یا با سمیت کمتر بشوند لذا یک منبع انرژی مناسب و یا شرایط فرایندی که می تواند بطور موثر سبب شکستن مولکول آفلاتوکسین شود برای سم زدائی از محصولات مناسب است این منبع انرژی ممکن است موارد زیر باشد:

۱-۴-۱-۱- حرارت:

Archive of SID

www.SID.ir

آفلاتوکسین در مقابل حرارت کاملا مقاوم است پیر و لاینسل مشاهده کردند که آفلاتوکسین B_1 در روغن نارگیل و پنبه دانه تا درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتی گراد مقاوم است هر چند مقدار رطوبت محصول حرارت داده شده یک فاکتور عمده و حضور رطوبت می تواند موجب تاثیر حرارت در تخریب آفلاتوکسین گردد. من و همکارانش (۲۰۰۲) مطالعه ای در خصوص تاثیر حرارت و رطوبت بر روی آفلاتوکسین دانه های روغنی داشته اند آنها مشاهده کردندکه افزایش رطوبت زمانی که درجه حرارت ثابت نگاه داشته شود موجب تخریب آفلاتوکسین خواهد بود. بطور مثال حرارت دادن ماده اولیه حاوی ۳۰ درصد رطوبت برای ۲/۵ ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی گراد موجب تخریب تقریبا ۸۵ درصد از آفلاتوکسین موجود خواهد بود در حالی که در همان ماده اولیه ۶/۶ درصد رطوبت و اعمال ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت به مدت ۲/۵ ساعت درحدود ۵۰ درصد آفلاتوکسین تخریب خواهد شد. چنانچه آفلاتوکسین ها تا نقطه ذوبشان حرارت ببینند تخریب خواهند شد. جدول ۱ نقطه ذوب چهار آفلاتوکسین اصلی را نشان میدهد (۱۷).

جدول ۱- نقطه ذوب چهار آفلاتوکسین اصلی

آفلاتوکسین	فرمول	وزن مولکولی	نقطه ذوب c
B_1	C17H12O6	312	268-269
B_2	C17H14O6	313	286-289
G_1	C17H12O7	328	244-246
G_2	C17H14O7	330	237-240

۱-۴-۱-۲- ماکروویو:

بو دادن نمونه های آلوده با ماکروویو (با قدرت ۶ کیلو وات به مدت ۴ دقیقه) ۹۵ درصد از توکسین را از بین می برد بررسی ها نشان داده است که استفاده از ماکروویو خانگی با سطح انرژی ۰/۷ کیلو وات به مدت ۸/۵ دقیقه ۲۰ درصد از آفلاتوکسین B_1 و ۴۰ درصد از آفلاتوکسین G_1 را در دانه های آلوده تخریب می کند (۱۷).

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۴-۱-۳- اشعه گاما:

نتایج آزمایشات مختلف نشانگر این است که دوزهای حدود یک مگا راد جهت تخریب آفلاتوکسین ها در مایعات کافی است اما در مواد غذائی جامد دوزهای بالاتری لازم هستند. ضمنا تشکیل مواد سمی دیگر در نتیجه تخریب آفلاتوکسین B_1 توسط اشعه گاما باعث محدودیت استفاده از این اشعه گردیده است انواع آفلاتوکسین های B_1,B_2,G_1,G_2 نسبت به اشعه گاما حساس بوده وتغییراتی در ساختمان آنها ایجاد میشود اشعه در دوزهای پایین سبب کاهش سم و در دوز های بالا موجب توقف تولید آفلاتوکسین میگردد طبق آزمایشات انجام شده استفاده از ۱۰۰ کیلو راد اشعه بعد از گذشت مدت ده روز حدود ۶۰ درصد از رشد قارچ و تولید اسپور جلوگیری می کند ولی در دوزهای ۲۰۰ تا ۴۰۰ کیلو راد اشعه گاما *آسپرژیلوس فلاووس* فوق العاده ناچیزی در محیط وجود داشته است (۳۷).

۱-۴-۱-۴- اشعه ماوراء بنفش و نور مرئی:

آفلاتوکسین ها حساس به نور ماورائ بنفش هستند نتایج بررسی های مختلف نشان داده است که آفلاتوکسین B_1 در pH زیر ۳ یا بالای ۱۰ نسبت به اشعه ماورائ بنفش حساس است. اکسیژن نیز به این اشعه کمک می کند تا از طریق ایجاد رادیکال آزاد آفلاتوکسین را تخریب نماید. در اثر تابش این اشعه حدود ۱۲ ترکیب ناشی از تخریب آفلاتوکسین B_1 حاصل می شود که برخی از آنها سمی هستند آفلاتوکسین ها نسبت به نور مرئی حساس هستند اما درصد کمی از آنها پس از قرار گرفتن در معرض نور فلورسانس یا نور سفید از بین می روند سمیت ترکیباتی که در اثر تخریب آفلاتوکسین ها در اثر نور مرئی تشکیل می گردد مشخص نیست (۳۷).

۱-۴-۲- روش های شیمیائی:

۱-۴-۲-۱-واکنش مواد شیمیایی با سم آفلاتوکسین و تخریب آن:

تعدادی از ترکیبات شیمیائی قادر به انجام واکنش با آفلاتوکسین ها و تخریب آنها هستند نظیر محلول حاوی ۷۵٪ متانل, ۵٪ دی متیل آمین هیدروکلراید، آلدئیدها، پراکسید بنزویل،

Archive of SID

www.SID.ir

ید، پرمنگنات پتاسیم و فرمالدئید. بارن و چانگ (۱۹۸۴) نشان داده اند که بوتیل هیدروکسی آنیزول[2]در غلظت ۱ppm خاصیت بازدارندگی از رشد و تولید آفلاتوکسین بوسیله اسپورهای *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را دارد. و در غلظت ۲۵۰ppm این ترکیب خاصیت بازدارندگی از رشد و تولید آفلاتوکسین بوسیله میسلیا را دارد (۱۷).

فانگ و همکارانش (۱۹۸۲) نشان دادند که BHA خاصییت بازدارندگی از رشد و تولید آفلاتوکسین بوسیله *آسپرژیلوس فلاووس* را نیز در غلظت۰/۰۲٪ دارد (۳۷).

روش های شیمیائی تخریب آفلاتوکسین در مواد غذائی کاربردی تر هستند برخی از مواد شیمیائی که قادر به تخریب آفلاتوکسین B_1 میباشند عبارتند از عوامل حاوی کلر نظیر هیپوکلریت سدیم و عوامل اکسید کننده مثل هیدروژن پراکسید، ازن، بی سولفیت سدیم و عوامل هیدرولتیک مثل اسیدها و بازها این مواد شیمیائی پیوند مضاعف حلقه انتهائی فوران را اکسید می کنند و یا حلقه لاکتون را هیدرولیز و اکسید می نمایند. بطور کلی مهمترین عوامل شیمیائی عبارتند از:

۱-۴-۲-۲- کلر:

کلر مایع برای شستشوی مواد اولیه مثل میوه ها بکار میرود در حالیکه کلر گازی خاصیت رنگبری و اکسید کنندگی دارد کلرینه کردن با سدیم هیپوکلریت در غلظت های ۰/۲ و ۱ و ۵ و ۱۱٪ همراه با ۳٪ اسید پرکلریک یا ۱۰٪ کلر گازی قادر خواهد بود کل آفلاتوکسین B_1 را از بین ببرد. در این میان PH محصول بسیار موثر است در شرایط اسیدی آفلاتوکسین B_1 تبدیل به ۸ و۹ دی هیدروکسی آفلاتوکسین B_1 و ۹ و۸ دی کلرو آفلاتوکسین B_1 می شود که ماده اخیر سرطان زا است در صورت پیدایش این ماده به کمک ۵٪ استن آنرا می توان از بین برد تحقیقات نشان می دهند که مواد غذائی کلرینه شده سالم و قابل مصرف هستند (۶۷).

۱-۴-۲-۳-پراکسید هیدروژن:

[2] BHA

Archive of SID

www.SID.ir

تعدادی از ترکیبات اکسید کننده ممکن است آفلاتوکسین را تخریب نمایند هر چند تعداد محدودی از آنها برای استفاده در مواد غذائی یا تغذیه مناسب هستند پراکسید هیدروژن به علت کارائی زیاد، قیمت ارزان و دسترسی آسان ماده مناسبی برای تخریب آفلاتوکسین B_1 است غلظت ۰/۵ و ۰/۳٪ از پراکسید هیدروژن قادر خواهد بود از رشد قارچ های سمی در انبار جلوگیری نماید (۳۹).

۱-۴-۲-۴- بی سولفیت سدیم:

استفاده از بی سولفیت سدیم به عنوان ماده افزودنی و نگهدارنده درآشامیدنی ها مورد قبول است از این ترکیب ممکن است در مواد غذائی به دلایل مختلفی استفاده شود به عنوان باز دارنده واکنش های آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک قهوه ای شدن به عنوان آنتی اکسیدان و به مواد کاهش دهنده و جلوگیری کننده از رشد میکروارگانیسم ها علاوه بر این موارد نشان داده شده است که بی سولفیت موجب تخریب آفلاتوکسین های B_1 و G_1 نیز میشود. محیط مایع حاوی ۰/۰۵ مولار سولفیت سدیم[۳] در PH=5.5 در دمای ۲۵°C ۵۰ درصد آفلاتوکسین B_1 و G_1 را پس از ۱۶۳ تا ۱۲۷ ساعت تخریب می کند (۲۶).

بی سولفیت سدیم بعنوان یک افزودنی در صنایع کاربرد دارد و غلظت های کم آن (۰/۵ و ۰/۱٪) نسبت به آمونیاک و یا هیدروکسید سدیم در تخریب آفلاتوکسین B_1 در غلات بهتر عمل می کند بنظر می رسد که بی سولفیت سدیم با هر دو ناحیه فعال ملکول آفلاتوکسینB_1 واکنش دهد (ایجاد شکاف در حلقه لاکتون یا حلقه انتهائی فوران و یا هر دو). در استفاده از سولفیت یا بی سولفیت به منظور تخریب آفلاتوکسین B_1 در عمل دانه ها را در محلول بی سولفیت غوطه ور کرده و در انتها خشک می کنند

۱-۴-۲-۵-آمونیاک:

یکی از روش های تخریب آفلاتوکسین در مواد غذائی و همچنین پسته استفاده از ترکیبات قلیائی مثل آمونیاک است آمونیاک چه بصورت گازی و چه فرم محلول می تواند برای

[3] K_2SO_3

Archive of SID

www.SID.ir

سالم سازی مواد غذائی از آفلاتوکسین بکار رود و به کمک آن می توان بیش از ۹۵ درصد سم موجود را تخریب کرد آزمایش ها نشان داده اند که مواد غذائی فرآیند شده با آمونیاک هیچگونه اثر سمی ندارند. ترکیبات آمونیاکی بنظر می رسد موثرترین و اقتصادی ترین ترکیبات برای کاهش آفلاتوکسین در انواع مواد غذائی بوده اند. تشریح تاثیر مواد آمونیاکی در تخریب آفلاتوکسین ها گزارش شده است (۷۸).

۱-۴-۲-۶- اوزن:

اوزن یک ماده با خاصیت اکسیدکنندگی قوی و واکنش پذیری بالا به دلیل باند C=C غیر اشباع خود است. گزارش کرده اند که اوزن آفلاتوکسین را در پنبه دانه و نارگیل کاهش می دهد. تحقیقات همچنین نشان داده است که آفلاتوکسین B_1 و G_1 حساس به ازون می باشند و به سادگی با ۱/۱mg/l از ازون به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اطاق خاصیت سرطان زایی این سم غیر فعال می گردد. ازون در محل پیوند مضاعف ۹ و ۸ حلقه فوران با مولکول آفلاتوکسین B_1 واکنش میدهد. غذاهایی که با اوزن فرآیند شده اند سالم بوده و اثرات سمی و سرطان زائی ندارند. آفلاتوکسین های B_1 و G_1 نسبت به اوزن مقاومت زیادی نشان می دهند، این روش برای سالم سازی بسیاری از محصولات مناسب به نظر می رسد ولی هزینه آن زیاد است (۲۷).

۱-۴-۲-۷- بازها:

انجام فرآیند به کمک بازها سبب هیدرولیز حلقه لاکتون می شود. در یک آزمایش حرارت دادن پسته شامی با رطوبت ۳۰ درصد همراه با ۲۰ درصد هیدروکسید سدیم محلول در ۱۰۰°C به مدت ۹۰ دقیقه غلظت آفلاتوکسین را از ppb ۱۱۱ به ppb ۱۷ کاهش داد (۹۱).

۱-۴-۲-۸- اسیدها:

انجام فرآیند با اسیدها سبب هیدراسیون آفلاتوکسین B_1 در محل پیوند اولفینیک ۸ و۹ در حلقه انتهائی فوران و شکل گیری آفلاتوکسین B_{2a} می شود که سمیت آن کمتر از ۰/۰۵٪ سمیت B_1 است واکنش مشابهی در تبدیل G_1 به G_{2a} اتفاق می افتد. به دلیل آنکه ممکن

Archive of SID

www.SID.ir

است اسید قوی روی کیفیت ماده غذائی اثر منفی داشته باشد و همچنین به دلیل اینکه آفلاتوکسین B_{2a} خود سمی است. استفاده از اسید قوی چندان مناسب نیست. استفاده از اسید هیدروکلریک ۳ مولار در دما و فشار بالا به مدت ۱۲ ساعت سبب تخریب آفلاتوکسین B_1 بدون شکل گیری ترکیبات سمی می شود. بطور کلی آفلاتوکسین ها به وسیله محلول های قوی اسیدی تخریب میگردند. دانشمندان نشان دادند که ۶ ساعت زمان و اعمال ۱۰۰°C نیاز است تا ۹۵٪ آفلاتوکسین B_1 در محیط مایع در pH=۳ به فرم هیدروکسی آن تبدیل گردد بنابراین چنین شرایطی را ما نمی توانیم در سم زدائی محصولات کشاورزی پیاده کنیم (۹۱).

همچنین بررسی ها نشان داده است که ppm ۵۰ سوربات پتاسیم خاصیت بازدارندگی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* را داشته است. تحقیقات بعدی نشان داده است که ۰/۱ تا ۰/۱۵٪ سوربات پتاسیم از رشد و تولید آفلاتوکسین بوسیله *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* کاملا جلوگیری کرده است. بنابراین سطوح ۰/۱ تا ۰/۲٪ سوربات پتاسیم مورد نیاز است تا بازدارندگی از تولید آفلاتوکسین حاصل شود (۹۱).

سطوح تجاری سوربات اغلب ۰/۳٪ یا کمتر است بر اساس مطالعات بولمن در pH=۵ اثر سوربات بهتر مشاهده شده است اسید پروپیونیک در غلظت ۸۵٪ خاصیت بازدارندگی بر روی *آسپرژیلوس فلاووس* در ذرت با ۲۰٪ رطوبت را نشان داده است (۱۹).

تحقیقات نشان داده اند که یک درصد پروبیونیک اسید از خاصیت توکسین زایی *آسپرژیلوس فلاووس* و *پارازیتیکوس* در ذرت انبار شده جلوگیری می کند (۹۹).

بوچمن و همکارانش (۱۹۸۵) گزارش کرده اند که ۰/۲ درصد اسید پروپیونیک کاملا رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را ممانعت می کند (۱۸).

اسید بنزوئیک وبنزوات ها اغلب در pH خیلی اسیدی موثرند و کمتر در pH تقریبا خنثی نظیر ۵ موثر می باشند. بنزوات ها اجازه مصرف در مواد غذایی در سطوح بیشتر از ۰/۱ درصد را ندارند این موارد اهمیت و کاربرد اسید بنزوئیک را در جلوگیری از آلودگی مواد

Archive of SID

www.SID.ir

غذایی به مایکوتوکسین ها محدود می کند. در مطالعات بیشتر بر روی اثر ترکیبات شیمیایی در کنترل سم آفلاتوکسین محققان نشان داده اند که افزایش غلظت اسید بنزوئیک و سدیم بنزوات از ۰/۲ تا ۰/۸ درصد تولید آفلاتوکسین را کاهش میدهد و در سطح ۰/۸ درصد هیچ آفلاتوکسینی تولید نشده است (۹۸).

محققان گزارش کرده اند که سطوح یک درصد اسید بنزوئیک و سدیم بنزوات در غذای حاوی ذرت موجب ۲۳/۲٪ باز دارندگی از تولید آفلاتوکسین شده است (۶۳).

اسید استیک بر علیه باکتری ها موثر است اما اثر کمتری بر مخمرها و کپک ها دارد. دهیدرواستیک اسید ماده ضد قارچ خوبی است و در pH=۵ از سدیم بنزوات موثرتر است. سدیم دی استات ترکیبی حاوی مقادیر مساوی اسید استیک و سدیم استات است. گلوب (۲۰۰۴) گزارش کرده است که سطوح سدیم استات بالای ۰/۰۵ درصد کاملا خاصیت بازدارندگی *آسپرژیلوس فلاووس* را در تست های محیط کشت نشان داده است (۴۱).

۱-۵- مواد جاذب سم آفلاتوکسین[۴]:

یک روش سم زدایی و غیر فعال سازی آفلاتوکسین استفاده از ترکیبات باند کننده یا عوامل چلات کننده اضافه شده به خوراک دام هستند که به عنوان یک روش برای کاهش سمیت مایکو توکسین ها از طریق ترکیب با مایکوتوکسین ها و کاهش جذب آن ها توسط روده می باشد. استفاده از مواد جاذب ترکیبات سمی به عنوان یک روش مناسب برای حفظ خوراک دام با سطوح پایین آفلاتوکسین می باشد. ترکیب جاذبی که همه ترکیبات نامطلوب را حذف نماید شناسایی نشده است. اما در حال حاضر نظریه هایی برای استفاده از ترکیبات باند کننده مایکو توکسین ها در خوراک وجود دارد (۱۵، ۳۸).

ماسیمانگو و همکارانش (۲۰۰۴) مشاهده کردند که آفلاتوکسین B_1 در محیط مایع زمانی که خاک جاذب اضافه می گردد توسط بنتونیت جذب می گردد. حذف بنتونیت موجب

[4] Toxin Binder

Archive of SID

www.SID.ir

برداشتن آفلاتوکسین از محیط مایع می گردد اندازه ذرات خاک بنتونیت و اعمال حرارت در تاثیر بنتونیت برای جذب آفلاتوکسین موثر می باشد (۶۳).

زئولیت های طبیعی قادر به جذب آفلاتوکسین موجود در یک محلول و یا در غذاهای دام می باشند. بیش از ۴۰ نوع زئولیت طبیعی و ۱۰۰ نوع زئولیت مصنوعی وجود دارد که از نظر خواص با یکدیگر متفاوت هستند با توجه به اینکه اضافه کردن زئولیت تا سطح ۴۰ درصد جیره غذائی دامها هیچ گونه اثر سوئی نداشته است، استفاده یک تا ۵٪ زئولیت در جیره غذائی دامها معمول بوده و مخصوصا در تغذیه طیور در سطح وسیعی کاربرد دارد (۸۷).

در تحقیقی اثر کلرور سدیم را در از بین بردن قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار داده اند. کلرور سدیم در غلظت ۲۰٪ فقط باعث جوانه زدن اسپورها شده و رشد قارچ را متوقف می کند. با بکارگیری ترکیبی از ۲٪ اسید استیک و ۵٪ کلرور سدیم، قارچ حتی پس از ۷۰ ساعت رشدی نداشته است در صورتیکه کلرور سدیم به تنهائی با غلظت ۱۵٪ بر روی دانه پسته فقط رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* را کند و به تاخیر می اندازد (۶۷).

سایر مواد مورد استفاده جاذب مایکوتوکسین ها شامل مواد جاذب غیر قابل هضم همانند سیلیکات، کربن فعال شده، کربوهیدرات های پیچیده و دیگر ترکیبات هستند. سیلیکات ها آفلاتوکسین و برخی دیگر انواع مایکوتوکسین ها مانند استریگماتوکسین که ساختار شیمیایی مشابه با آفلاتوکسین دارد را جذب و از دسترس خارج می نمایند. تعداد زیادی ترکیبات سیلیکاته مختلف وجود دارد که در باند کردن آفلاتوکسین ها متفاوت عمل می کنند. اصلاح شیمیایی سیلیکات ها می تواند توانایی آن ها را در باند کردن ترکیبات سمی (مایکو توکسین ها) افزایش دهد (۱۱).

۱-۶- عوامل بیولوژیکی کاهش دهنده آفلاتوکسین:

Archive of SID

www.SID.ir

می توان با استفاده از روشهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی سم آفلاتوکسین را کاهش داد. روشهای فیزیکی مانند گرما، اشعه فرابنفش، تابش یونیزه کننده می باشد که خیلی موثر نیستند. روشهای شیمیایی با افزودن مواد کلرینه کننده، اکسید کننده، هیدرولیتیک صورت می گیرد که نیازمند تجهیزات گران بوده و ممکن است کیفیت محصول کاهش داده و اثرات نامطلوبی بر سلامتی ایجاد کنند. همچنین محدودیت هایی مانند زمان طولانی تخریب (بیشتر از ۷۲ ساعت)، تخریب ناقص از دیگر معایب روشهای فیزیکی و شیمیایی است. بیشتر محققین معتقدند که بهترین روش سم زدایی مواد غذایی آلوده به مایکوتوکسین، استفاده از گونه های موثر میکروبی است که دارای خصوصیت کاهش آفلاتوکسین تحت شرایط آسان و راحت بوده بدون اینکه نیازی به استفاده از مواد شیمیایی مضر باشد (۱۲، ۶۹، ۹۴).

در این راستا، تحقیقاتی بر گونه های باکتری های اسید لاکتیک، گونه های پروبیوتیک، قارچ های موثر، گونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* انجام شده است. از گونه های باکتریایی می توان به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس جی جی*[5]، *مایکروباکتریوم ها*[6]، *کورینه باکتریوم ها*[7]، *ردوکوکوس اریتروپولیس*[8]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[9]، *لاکتوباسیلوس سویه LC705*[10] و *بیفیدوباکتریوم*[11] ها اشاره کرد. برخی از باکتری ها از جمله *ردوکوکوس، نوکاردیا*[12] و *مایکوباکتریوم ها* قادرند آفلاتوکسین را بوسیله فعالیت آنزیمی تخریب نمایند. اما برخی گونه های دیگر مانند باکتری های لاکتوباسیلوس و مخمر از جمله مخمر *ساکاروکایسس سرویزیه*[13] آفلاتوکسین موجود در محیط را بر اساس پدیده اتصال به دیواره سلولی کاهش می دهند. سازوکار خروج

[5] *rhamnosus GG*
[6] *Mycobacterium*
[7] *corynebacteriom*
[8] *Rhodococcus erythropolis*
[9] *Lactobacillus rhamnosus*
[10] *Lactobacillus LC705*
[11] *Bifido Bacterium*
[12] *Rhodococcus Nocardia*
[13] Sacharomyses Servesea

Archive of SID

www.SID.ir

آفلاتوکسین بوسیله روش هـای میکروبـــی هنوز کاملا واضح و روشن نیست. غلظت های باکتریایی بالاتراز $۱۰^{۹}$cell/ml جهت کاهش موثر آفلاتوکسین B_1 لازم اســـت. تعـــداد کل مولکول هایی که می توانند بـه یـک بـاکتری زنـده متـصل شوند بیشتر از $۱۰^{۷}$ تخمین زده شده است (۹،۳۱، ۹۶).

در بررسی روش های مختلف حذف سموم قارچی، فیلیپس و همکاران (۱۹۹۵) به این نتیجه رسیدند که مایکوتوکسین ها ممکن است توسط میکروارگانیسم ها تخریب شوند. در بررسی های بیشتر دانشمندان توانستند از میکروارگانیسم‌هایی مانند مخمرها، کپک‌ها، اکتینومیست‌ها، باکتری‌ها، خزه و جلبک‌ها جهت از بین بردن آفلاتوکسین استفاده نمایند (۷۵).

انواعی از باکتری ها، مخمرها و کپک ها می توانند موجب تغییر و حذف آفلاتوکسین از محیط مایع شوند. بیش از ۱۰۰۰ میکروارگانیسم این قابلیت را دارند که موجب تخریب و یا تغییر آفلاتوکسین B_1 شوند. سیگلر و همکارانش (۲۰۰۰) نشان دادند که یکی از این ارگانیسم ها *فلاوباکتریوم اورانتیاکم* [۱۴] است. این محققان مشاهده کردند که آفلاتوکسین موجود در شیر آلوده (۹/۹mg/ml آفلاتوکسینM_1) کاملا به وسیله ۷×۱۰^{۷}cell/ml سلول *فلاوبا کتریوم اورانتیاکم* بعد از ۴ ساعت در دمای $۳۰C^{\circ}$ حذف شده است. مکانیسم اثر این باکتری هنوز مشخص نیست ولی به علت تولید آنزیم های پروتئولتیک و لیپولیتیک توسط این میکروارگانیسم تغییرات نامطلوبی در طعم غذا ایجاد می شود که از لحاظ مصرف کننده چندان مناسب نیستند (۲۱).

حسن و همکارانش (۱۹۹۵) مطالعاتی در خصوص بازدارندگی گونه های اسید لاکتیک باکتری ها از رشد و تولید آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس* داشته اند. پیمارسین یا ناتامایسین ترکیبات آنتی بیوتیک و ضد قارچی است که خاصیت ضد مایکوتوکسینی دارد در بعضی از کشور های اروپائی استفاده از آن مجاز شناخته شده است اما کاربرد آن در

[14] *Flavobacterium Aurantiacum*

Archive of SID

www.SID.ir

آمریکا محدود بوده و فقط همراه برش های پنیر استفاده می شود. تحقیقات نشان داده است که سطوح ۱ppm تا ۵۰ppm این ترکیب خاصیت ممانعت کنندگی رشد و بازدارندگی تولید آفلاتوکسین را دارد (۴۶).

در تحقیقی قابلیت اتصال فیزیکی و حذف آفلاتوکسین B_1 توسط ۲۰ گونه نژاد از باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک و بیفیدوباکتریوم مورد مطالعه قرارگرفت. لاکتوباسیلوس‌ها ۱۷/۳ تا ۵۶/۷٪ از آفلاتوکسین B_1 را حذف نمودند، در حالی که نژادهای بیفیدوباکتریوم توانستند به ۱۸ تا ۴۸/۷٪ آفلاتوکسین B_1 متصل شوند. نژادهای لاکتوکوکوس نیز ۵/۶ تا ۴۱/۱٪ از آفلاتوکسین را حذف نمودند (۷۴).

همچنین *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[15] زیر گونه بولگاریکوس نژاد *CH-2* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[16] نژاد *TS-36* قادر به حذف آفلاتوکسین M_1 از شیر بازسازی شده و آلوده به توکسین و ماست تهیه شده از آن هستند. میزان اتصال آفلاتوکسین M_1 در ماست ۱۴/۳٪ بدست آمد (۸۲).

در تحقیقی *استرپتوکوکوس لاکتیس*[17] به محیط حاوی *آسپرژیلوس فلاووس* تلقیح شد. این عمل سبب گردید که سطح آفلاتوکسین به طور چشمگیری کاهش یابد. اثر *لاکتوباسیلوس کازئی*[18] نیز بر رشد آسپرژیلوس و تولید توکسین توسط آن بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که مهار رشد در صورتی رخ می‌دهد که *لاکتوباسیلوس کازئی* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* به طور همزمان کشت داده شوند و یا *لاکتوباسیلوس* قبل از افزایش کنیدی‌های *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تلقیح شود. علاوه بر این باکتری‌ها ممکن است از طریق رقابت، تولید آفلاتوکسین را متوقف و یا آن را متابولیزه و تبدیل به ماده‌ای با سمیت کمتر

[15] *Lactobacillus Delberuki ssp. Bulgaricus*
[16] *Stereptococcus Termophillus*
[17] *Stereptococcus Lactis*
[18] *Lactobacillus* Casei

Archive of SID

www.SID.ir

نمایند. برای مثال نوعی باکتری به نام *فلاوباکتریوم اورآنتیکوم (B-184 NRRL)* می‌تواند سبب تخریب آفلاتوکسین در محیط کشت شود. عمل سم‌زدایی این میکروارگانیسم در محیط شیر، روغن، ذرت، کره، بادام زمینی، سبوس و بادام به اثبات رسیده است (۵۸).

علاوه بر باکتری‌ها قارچ‌ها نیز ممکن است تولید آفلاتوکسین را متوقف سازند. به عنوان مثال *آسپرژیلوس نیجر* مهمترین عامل رقابت کننده بیولوژیک در تولید آفلاتوکسین توسط *آسپرژیلوس فلاووس* می‌باشد. همزیستی *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نیجر* در غلات و حبوبات و سایر تولیدات کشاورزی به طور مکرر گزارش شده است. رایزوپوس نیز قادر به تجزیه و تخریب آفلاتوکسین‌ها می‌باشد (۵۸).

۱-۷- بررسی وضعیت محیط شکمبه دام:

در بین حیوانات اهلی علفخوار، نشخوارکنندگان دارای بیشترین سهم در تبدیل مواد گیاهی غیر قابل استفاده انسان، به فرآورده های غذایی قابل استفاده و همچنین تأمین خوراک و سلامت بشر را دارا می باشند. این حیوانات ۷۰٪ کل پروتئین حیوانی قابل مصرف و ۱۰٪ الیاف طبیعی مورد استفاده انسان را تأمین می کنند. اگرچه قسمت عمده خوراک نشخوارکنندگان را دیواره سلول های گیاهی تشکیل می دهد ولی خود این حیوانات توانایی تولید آنزیم های لازم برای تجزیه سلولز و همی سلولز، که جزء اصلی این خوراک های الیافی هستند، را ندارند. به همین علت حیوانات نشخوارکننده برای دستیابی و استفاده از ترکیبات دیواره سلولی گیاهان، متکی به تخمیر این ترکیبات توسط میکروارگانیسم های مستقر در شکمبه خود هستند (۸۳، ۸۵).

دستگاه گوارش همه علف خواران بالغ حاوی جمعیت هایی از باکتری ها، تک یاخته ها و قارچ های بی هوازی است که نقش عمده ای در هیدرولیز مواد خوراکی

Archive of SID

www.SID.ir

دارند و علاوه بر آن همزیستی مسالمت آمیزی با حیوان میزبان دارند. در حیوانات نشخوارکننده، عمده تخمیر میکروبی در شکمبه و نگاری (که به عنوان پیش معده محسوب می شوند) صورت می گیرد، که علت آن وجود شرایط بی هوازی، دمای نسبتاً یکنواخت (۳۸°C تا ۴۰°C)، جریان نسبتاً ثابت آب و مواد گوارشی، جریان منظم مواد خوراکی با قابلیت تخمیر بالا، وجود بخش مایع و بخش‌جامد، بخش جامد، pH نسبتا پایدار (بین ۶ تا ۷) و کندتر بودن سرعت عبور مواد خوراکی نسبت به سرعت تکثیر میکروارگانیسم ها می باشد. تمامی این حالات، شرایط مناسبی برای انتقال، استقرار و رشد و تکثیر میکروارگانیسم ها و در نتیجه تخمیر میکروبی مواد خوراکی را در شکمبه فراهم کرده است (۴۸).

شکمبه نوزاد نشخوارکنندگان، عاری از میکروارگانیسم بوده و در این مرحله محتویات آن را موکوس، بزاق و سلول های کنده شده دستگاه گوارش تشکیل می دهد. پس از تولد به سرعت میکروارگانیسم ها در شکمبه استقرار پیدا می کنند. باکتری های بی هوازی از روز دوم پس از تولد در شکمبه غالب می شوند وباکتری های سلولولیتیک و متان زا در حدود روز چهارم ظاهر می شوند. قارچ های بی هوازی نیز از حدود ۸ تا ۱۰ روز پس از تولد، و تک یاخته های مژک دار در خلال هفته دوم و سوم در شکمبه ظاهر می شوند (۳۴، ۱۰۰).

زمانی که نوزاد نشخوارکننده از شیر گرفته می شود و عمل نشخوارکردن در آن کامل می گردد، تراکم میکروارگانیسم ها در شکمبه همانند نشخوارکننده بالغ می شود به طوری که در هر میلی‌لیترازمایع شکمبه حدود 10^9 تا 10^{11} عدد باکتری، 10^4 تا 10^6تک یاخته و 10^3 تا 10^5 عدد قارچ یافت می شود.

جمعیت میکروبی شکمبه همواره ثابت و یکنواخت نیست بلکه عوامل فیزیولوژیکی مانند سن دام، رفتارهای تغذیه ای، سطح تولید، سلامت دام، ماهیت و روابط بین جمعیت های میکروبی مختلف و همچنین عوامل خارجی از قبیل ترکیب شیمیایی جیره غذایی،

Archive of SID

www.SID.ir

ماهیت جیره، مقدار خوراک، تعداد دفعات خوراک، تغییر جیره غذایی، تغییر فصل، تغییرات در طول شـــبانه روز و عوامل جغرافیایی، نسبت و تراکم گروه های مختلف میکروارگانیسم های شکمبه را تحت تاثیر قرار می دهند (۸۵).

از طـــرف دیگـــر اختلاف های معنـــی داری در تعـــداد و نوع گونه های میکروبی موجود در شکمبه نشخوارکنندگان با توجه بـــه تفاوت های ژنتیکی و محیطـــی گزارش گردیده است، که این امر می تواند توانایی هضم و تخمیر خوراک مصرفی توســـط حیوان را تحت تأثیر قرار دهد (۴۷).

در سال های اخیر، مواد افزودنی متعددی جهت بهبود شرایط تخمیر در شکمبه و افزایش تولید حیوانات نشخوار کننده مورد استفاده قرار گرفته است. این ترکیبات شامل بازدارنده های تولید متان، آنتی بیوتیک ها، پروبیوتیک ها، عوامل رشد و آنزیم ها می باشند (۵۷).

نگرانی های موجود در استفاده از آنتی بیوتیک ها و سایر مواد شیمیایی در تغذیه دام باعث شده است که اغلب پژوهشگران به ارزیابی اثر افزودنی های دیگر از جمله پروبیوتیک ها روی عملکرد حیوانات در دهه اخیر روی آورند. مهمترین ویژگی پروبیوتیک ها آن است که ضمن کاهش میکروب بیماری زا در دستگاه گوارش و بهبود ضریب تبدیل غذایی در حیوان، باقی مانده بافتی نداشته و بر خلاف آنتی بیوتیک ها مقاومت میکروبی ایجاد نمی کنند.

۱-۸- استفاده از فرآورده های میکروبی در تغذیه گوساله های شیر خوار:

فرآورده های میکروبی یا پروبیوتیک ها از کلمه یونانی پروبیوس که در لغت به معنای حمایت از حیات است گرفته شده است. این عبارت برای توصیف افزودنیهای زنده میکروبی که به خوراک افزوده می شوند بکار می رود که قادرند با ایجاد یک تعادل میکروبی در جمعیت فلور روده و پیشگیری از عفونت های گوارشی اثر مثبتی روی بهبود عملکرد حیوان و افزایش رشد دام و طیور داشته باشند (۱).

Archive of SID

www.SID.ir

از مهمترین مزایای این فرآورده ها این است که پس از وارد شدن به سیستم گوارشی دام و طیور در بافتهای بدن باقی نمانده و بر خلاف آنتی بیوتیکها هیچ گونه مقاومت میکروبی پس از مصرف آن ایجاد نمی شود. هدف از استفاده این فرآورده ها متاثر کردن فعالیت میکروبی دستگاه گوارش یا به عبارت دیگر بهبود وضعیت سلامتی، رشد و عملکرد حیوان می باشد. اولین میکروارگانیسم هایی که به طور رایج در خوراک دام استفاده شده اند، شامل باکتریهای لاکتوباسیل، انتروکوکوس، استرپتوکوکوس، بیفیدوباکتریوم و گونه های باسیلوس بودند. از قارچها و مخمرها هم به عنوان پروبیوتیک از دهه گذشته استفاده شده است. در سال ۱۹۸۹ به جای واژه پروبیوتیک از واژه تغذیه مستقیم میکروبی استفاده شد که در آن منبعی از میکروارگانیسم های زنده قابل زیست همانند باکتری ها، قارچها و مخمرها وجود داشت. هر یک از افزودنی های میکروبی فوق از مکانیسم خاصی برخوردار بوده و اثرات مخصوص به خود را دارند. افزودنی های باکتریایی بر روده اثر گذاشته و سبب برقراری میکروفلور خوش خیم می شوند و با این عمل از جمعیت میکروبهای مضر همانند اشریشیاکلی و سالمونلا کاسته می شود. افزودنیهای غیر باکتریایی یعنی قارچها و مخمرها بیشتر در تغذیه گاوهای شیری، پرواری و گوساله های شیرخوار استفاده شده اند. این مواد بیشتر بر روی تخمیر شکمبه اثر گذاشته و سبب تغییر الگوی آن در جهت استفاده از متابولیت های موجود در شکمبه می شوند (۶).

با بهبود وضعیت الگوی تخمیر بر میزان تولید و رشد افزوده می شود. همچنین مخمرها بر ابقاء آهن، روی، مس و پتاسیم اثر مثبتی دارند و در کاهش روزهای بیماری موثر هستند. باوجود آزمایشات متعدد بر روی پروبیوتیک ها نتایج حاصل از تحقیقات در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه ای بر روی عملکرد حیوانات متفاوت بوده است. تعدادی از پژوهشها بهبود در افزایش وزن، تولید شیر و افزایش کل قابلیت هضم را نشان داده اند، اما پژوهشهای دیگر چنین اثراتی را نشان نداده اند. استفاده از پروبیوتیک ها در گوساله های شیرخوار در چند سال گذشته مورد توجه قرار گرفته است. در واقع هدف کلی از استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

از فرآورده های میکروبی پرورش بهتر و دست یابی به عملکرد بالاتر و سلامتی گوساله در دوران شیر خوارگی است (۱).

پرورش موفق گوساله های شیرخوار از زمان تولد تا زمان از شیر گیری مستلزم توجه به عوامل مربوط به سلامتی مادر، گوساله، تمیزی محیط پرورش، خوراندن آغوز با رعایت استاندارد ها و تغذیه مناسب بعد از دادن آغوز می باشد. مرگ و میر و بیماری در این دوره از مشکلات مهم گاوداری صنعتی می باشد، به طوری که با عدم رعایت توصیه ها تلفات افزایش و سود به حداقل می رسد. اکثر بیماریها در گوساله های شیر خوار در چند هفته اول شایع می باشد و دلیل آن عدم مصرف آغوز مناسب و فضای نامناسب پرورشی است. بطور میانگین یک گاو شیری در حدود چهار دوره شیردهی در گله تولید شیر می کند، با در نظر گرفتن مرگ و میر گوساله ها و سایر تلفات باید ۳۰٪ از گله شیری هر ساله با تلیسه های خوب جایگزین شود. اگر ۵۰٪ از تمام گوساله های تازه متولد شده ماده باشند، بایستی حدود ۷۵٪ از این تعداد گوساله برای حفظ گله پرورش یابند.

مرگ و میر در گوساله ها به عوامل مختلفی بستگی دارد، به طوری که سقط، مرده زایی و نقایص مادر زادی ۲ تا ۳٪ از مرگ و میرها را شامل می شود، اسهال حاد، ۷۵٪ از مرگ و میرها را در گوساله های نوزاد تشکیل می دهد. اسهال یکی از مهمترین بیماری های عفونی در پرورش گوساله محسوب می شود که خسارات زیادی بر سیستم پرورشی تحمیل می کند. میکروارگانیسم های متفاوتی در روزهای مختلف ماه های اول زندگی سبب بروز اسهال می شوند. به طوری که باکتری اشریشیاکلی در ۳ تا ۵ روزگی، کروناویروس در ۵ تا ۱۵ روزگی و سالمونلا در ۱۵ تا ۳۰ روزگی و کوکسیدوز از سنین بالای یک ماهگی تا یک سالگی گوساله ها را مبتلا می کند (۱).

۱-۹- استقرار باکتری ها در شکمبه:

شکمبه گوساله تازه متولد شده عاری از باکتری است، ولی با گذشت زمان تعدادی از باکتریهای هوازی وارد شکمبه می شوند. پس از مصرف خوراک، تعادل باکتری ها صورت

Archive of SID

www.SID.ir

می گیرد. تعداد کل باکتری ها در هر میلی لیتر مایع شکمبه معمولا تغییر نمی کند، ولی نوع باکتری ها با شروع مصرف ماده خشک تغییر می کند. این امر سبب تغییرات اساسی در باکتری های هوازی و جایگزینی باکتری های بی هوازی می شود. گوساله هایی که علوفه مصرف می کنند، باکتری های متفاوتی نسبت به گوساله هایی که غلات مصرف می کنند، دارند. برقراری باکتریها در شکمبه به طور مقدماتی با مصرف جیره خشک صورت می گیرد (۲۰).

۱-۱۰- تقسیم بندی پروبیوتیک ها:

۱-۱۰-۱- پروبیوتیک های باکتریایی:

باکتری های مورد استفاده در این فرآورده بیشتر باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک می باشند. با فعالیت این باکتری ها در روده اسید لاکتیک تولید می شود و در نتیجه pH محیط روده کاهش یافته و سبب توقف رشد باکتری های مضر از جمله باکتری ایکولای می شوند. باکتری هایی که خاصیت پروبیوتیکی دارند شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، بیفیدوباکتریوم، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* می باشد.

۱-۱۰-۲-پروبیوتیک های غیر باکتریایی:

پروبیوتیک های غیر باکتریایی خود به دو گروه مخمر و قارچ تقسیم می شوند. این دو پروبیوتیک از نظر فعالیتی، مشابه می باشند.

۱-۱۰-۲-۱- *ساکارومایسس سرویزیه*:

اساس کشت مخمر بر *ساکارومایسس سرویزیه* است. این ماده فرآورده خشک از مخمر و محیط کشت آن است. بعد از خشک کردن سلول های آن قابلیت احیاء شدن و ظرفیت

Archive of SID

www.SID.ir

تخمیر را دارند. *ساکارومیسس سرویزیه* به رنگ کرم و به صورت دانه های ریز می باشد و سلولهای قابل احیاء آن با واحدهای کلنی تشکیل شده بیان می شود.

۱-۱۰-۲-۲-*آسپرژیلوس اوریزا*:

آسپرژیلوس اوریزا یک فرآورده قارچی است، تهیه آن بر اساس *آسپرژیلوس نایجر* و گونه های پنیسلیوم است. پاسخ های حیوان به *آسپرژیلوس اوریزا و ساکارومایسس سرویزیه* عموما مشابه بوده است (۳۶).

۱-۱۱- علت استفاده از پروبیوتیک ها در تغذیه دام:

به دلیل وجود بیماری های شایع در گوساله های نوزاد و علاقه برای پیشگیری از ابتلاء به این گونه بیماری ها و افزایش بازده در تولید، از پروبیوتیک ها به عنوان افزودنی های کمکی در جهت حفظ فعالیت سیستم ایمنی و برای جلوگیری از بیماری هایی مانند اسهال و بهبود افزایش وزن استفاده می شود (۳۳).

۱-۱۱-۱- اثرات پروبیوتیک های باکتریایی بر روده:

مهمترین محل فعالیت پروبیوتیک های باکتریایی، روده است. باکتری های پروبیوتیکی به عنوان قوای کمکی وارد روده شده و در آنجا تکثیر، و محیط مناسب از نظر فعالیت هضمی و جذبی ایجاد می کنند.

۱-۱۱-۲- جلوگیری از عفونت های روده ای:

باکتری های پروبیوتیک با تولید اسید لاکتیک باعث افزایش اسیدیته در روده شده و به تبع سبب تخریب آنزیم های موثر در انتقال مواد به داخل سلول باکتری شده و پاتوژن ها را دچار تحول شدید می کند. در حضور اسید، پاتوژن ها یا باید از ورود یون هیدروژن به داخل سلول جلوگیری کنند و یا باید قادر به خارج کردن یون هیدروژن وارد شده باشند. ولی به دلیل عدم کارایی پاتوژن ها در این مورد یون هیدروژن در داخل سلول تراکم یافته و سبب افزایش اسیدیته می شود و در نهایت باکتری از بین می رود. با وجود اینکه پاتوژن

Archive of SID

www.SID.ir

ها به اسیدیته حساس هستند ولی باکتری های مولد اسید لاکتیک در این شرایط به رشد خود ادامه داده و اسید بیشتری تولید می کنند. بررسی اثر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر روی ۶۶ بچه خوک نشان داد که این باکتری به طور قابل توجهی سبب کاهش باکتری استافیلوکوکوس در خوک های مورد بررسی شده است. توان تولید اسید لاکتیک در گونه های مختلف باکتری های اسید لاکتیک مشابه نیست. به طوری که همه این باکتری ها اثر بازدارندگی بر رشد پاتوژن ها ندارند. *لاکتوباسیلوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از مهمترین باکتری های پروبیوتیکی هستند. *بیفیدوباکتر*ها نیز قادر به تولید اسید لاکتیک هستند، ولی بیشتر اثر آنها به واسطه تولید اسید استیک است. از میان اسیدهای کوتاه زنجیر، اسید استیک بیشترین اثر را بر باکتری های گرم منفی دارد (۶۶).

۱-۱۱-۳- تشکیل کلنی در اپیتلیال روده:

توانایی باکتری های مولد اسید لاکتیک برای مقابله با پاتوژن ها و مکان های تشکیل کلنی در روده اغلب به عنوان یک مکانیسم عمل برای این باکتری ها پیشنهاد شده است. کلنی شدن این باکتری ها در روده از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا این باکتری ها برای فعالیت خود باید به دیواره روده متصل شوند، به طوری که همبستگی مثبتی بین اتصال آنها به دیواره و کاهش بیماری های روده ای وجود دارد (۳۳).

۱-۱۱-۴- تولید متابولیتهای بازدارنده:

باکتری های مولد اسید لاکتیک علاوه بر تولید اسید لاکتیک، قادر به تولید متابولیت های دیگر بازدارنده رشد پاتوژن ها هستند. این متابولیت ها شامل پراکسید، دی استیل، آمونیوم،اسیدهای چرب و پروتئین های ضد میکروبی می باشند. این متابولیت ها تنها در pH پایین قادر به اثر گذاری بر پاتوژن ها می باشند. پراکسید هیدروژن قادر است از رشد باکتری های ایکولای، *سالمونلا تیفی موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* جلوگیری کند (۳۳).

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۱۱-۵- فعالیت ضد سرطانی:

اثرات ضد سرطانی باکتری های مولد اسید لاکتیک به اثبات رسیده است. فعالیت ضد سرطانی این باکتری ها ظاهرا در نتیجه تولید ترکیبات خاص توسط باکتری های مورد بحث می باشد. نشان داده شده که بکارگیری فراورده های لبنی کشت شده با لاکتوباسیلوس سبب کاهش فعالیت آنزیم های ایجاد کننده در کولون می شود. استفاده از این باکتری ها سبب کاهش فعالیت آنزیم های سرطان زا می شود. باکتری های مولد اسید لاکتیک سبب افزایش فعالیت ماکروفاژها شده و از این طریق قادر به کاهش سلول های سرطانی می شوند.

۱-۱۱-۶- اثر بر کلسترول خون:

اگر چه کم شدن کلسترول خون در حیوانات اهلی از اهمیت خاصی برخوردار نیست، ولی این مورد در انسان حائز اهمیت است. میکروفلور روده قادر است بر میزان کلسترول خون اثر بگذارد. حیوانات اهلی (دارای فلور میکروبی روده) نسبت به حیواناتی که عاری از فلور میکروبی هستند، در مدفوعشان کلسترول بیشتری وجود دارد. حیواناتی که عاری از فلور میکروبی هستند دو برابر حیوانات عادی در خونشان کلسترول وجود دارد. این مورد بیانگر آن است که فلور میکروبی در روده در جذب کلسترول از روده تداخل ایجاد می کنند. وجود باکتری های مولد اسید لاکتیک در روده سبب کاهش کلسترول خون می شود. این باکتری ها با تداخل در جذب کلسترول و مصرف آن سبب افزایش کلسترول مدفوع می شوند. در آزمایشات حیوانی ثابت شده است که شیر حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سبب کاهش کلسترول خون افراد مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین در موشها نیز این باکتری ها سبب کاهش کلسترول خون شده اند (۶۴).

۱-۱۱-۷- اثر بر سیستم ایمنی:

سیستم ایمنی در مهره داران شامل چندین ارگان و سلول است، که توانایی تشخیص پاتوژن ها را داشته و قادر به از بین بردن آنها می باشد. ارگانهای سیستم ایمنی شامل مغز

Archive of SID

www.SID.ir

استخوان، تیموس، طحال، گره های لنفاوی و سلول هلی ایمنی (لوکوسیت ها) می باشند. میکروارگانیسم های معینی قادرند سبب تقویت سیستم ایمنی شوند. تحریک سیستم ایمنی غیر فعال حداقل سودی است که از باکتری های مولد اسید لاکتیک حاصل می شود. *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* سبب بهبود وضعیت سیستم ایمنی غیر اکتسابی به واسطه افزایش فعالیت فاگوسیت در گرانولوسیت ها می شود (۲۳).

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم

پیشینه تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۱- کاربرد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در کاهش سم آفلاتوکسین:

باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (LGG) یک میکروارگانیسم مناسب دارای اثرات محافظتی جهت مصرف انسانی می‌باشد که قادر است به آفلاتوکسین B_1 متصل شود و بنابراین جذب سریع آن را از روده کاهش دهد. ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی موجود در سطح باکتری در اتصال به آفلاتوکسین اهمیت دارند و تیمار گرمایی نمی‌تواند این باند شدن را کاهش دهد (۴۳).

تحقیقات نشان داده است که اتصال آفلاتوکسین به باکتری فرآیند سریعی است که در فاصله زمانی ۲ تا ۳ ساعت به حداکثر مقدار خود خواهد رسید. حرارت دادن حتی در دمای $121C^{\circ}$ برای زمان ۲۰ دقیقه قدرت باند کردن را در باکتری افزایش خواهد داد. تیمار سلول‌های باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با اسیدکلریدریک ۲ مولار برای ۹۰ دقیقه در دمای اتاق، قدرت اتصال آفلاتوکسین را به‌حدود ۹۰٪ می رساند. به‌نظر می‌رسد که اتصال آفلاتوکسین B_1 توسط باکتری زنده و تیمار حرارتی شده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* یک پدیده خارج سلولی است (۵۵).

هاسکارد و همکاران (۲۰۰۰) در آزمایشی ۱۲ نژاد از باکتری‌های اسید لاکتیک را انتخاب کردند و توانایی آن‌ها را در حذف آفلاتوکسین B_1 در محیط کشت مایع از طریق اتصال فیزیکی مورد ارزیابی قرار دادند. این باکتری‌ها به شکل زنده و غیر زنده (تحت تیمار حرارت یا اسید) بودند. نتایج حاکی از آن بود که باکتری‌های غیر زنده به مقدار بیشتری آفلاتوکسین B_1 را به صورت متصل به خود نگه داشتند. واز بین باکتری‌های به‌کاربرده شده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه GG و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه LC–705 آفلاتوکسین B_1 را از محلول با بیشترین کارایی حذف نمودند. اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین B_1 با روش الایزای رقابتی غیر مستقیم انجام شد (۴۵).

پلتونن و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای باند کردن آفلاتوکسین B_1 از محلول‌های آلوده شده بوسیله ۲۰ گونه باکتری اسیدلاکتیک و بیفیدو باکتریوم را بررسی کردند. این

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌ها شامل ۱۲ گونه لاکتوباسیلوس، پنج گونه بیفیدوباکتریوم و ۳ گونه لاکتوکوکوس بود. باکتری‌ها و آفلاتوکسین B_1 به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در محلول اینکوباسیون شدند و مقدار آفلاتوکسین B_1 باند نشده بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه گیری شد. بین ۵/۶٪ تا ۵۹/۷٪ از آفلاتوکسین B_1 از محلول توسط این باکتری‌ها باند شده بودند (۷۴).

فاضلی و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی کاهش آفلاتوکسین B_1 از محیط کشت مایع توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی (*لاکتوباسیلوس کازیی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) جدا شده از محصولات لبنی و خمیر ترش ایرانی پرداختند. اثر زمان اینکوباسیون روی ظرفیت اتصال سوبه های باکتریایی به آفلاتوکسین B_1 بررسی شد. سنجش آفلاتوکسین B_1 با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با فاز معکوس انجام شد. نتایج نشان داد که همه سویه ها قادر به حذف آفلاتوکسین B_1 هستند. از طریق زمان اینکوباسیون کاهش آفلاتوکسین B_1 از ۲۵٪ به ۶۱٪ رسید. *لاکتوباسیلوس کازیی* در مقایسه با دیگر سویه ها اتصال قوی‌تری با آفلاتوکسین B_1 داشته به طوری که بعد از ۲۴ساعت توکسین آزاد در محیط مشاهده نشد (۳۲).

ال – نظامی و همکاران (۱۹۹۸) توانایی گونه‌های اسید لاکتیک جدا شده از لبنیات را برای حذف آفلاتوکسین B_1 از محیط کشت مایع مورد مطالعه قرار دادند. تعیین میزان آفلاتوکسین B_1 با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد. *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه GG و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه LC-705 قادر هستند که به طور قابل توجهی آفلاتوکسین B_1 را در مقایسه با دیگر گونه‌ها جدا کنند. حذف آفلاتوکسین B_1 توسط گونه‌های GG و LC-705 یک فرایند سریع است که تقریباً ۸۰٪ آفلاتوکسین B_1 را در زمان صفر ساعت جدا می‌کند (۲۹).

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس پژوهش‌های هاسکارد و همکاران (۲۰۰۱)، پلی‌ساکاریدها و پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی دو عنصر اصلی قابل انتظار برای اتصال موتاژن‌ها به باکتری های اسید لاکتیک هستند که هر دو این ترکیبات در جهت مؤثر واقع شدن در اتصال به موتاژن‌ها به شدت تحت تأثیر تیمار اسیدی و حرارتی قرار می‌گیرند. حرارت باعث دناتوره پروتئین یا تشکیل محصولات واکنش میلارد بین پلی‌ساکاریدها و پروتئین یا پپتیدها می‌شود. همچنین اسید می‌تواند پیوندهای گلیکوزیدیک را در پلی‌ساکاریدها بشکند و منومری آزاد شود که بعداً به آلدئید تبدیل گردد و در ادامه پیوندهای پپتیدی را شکسته و ترکیبات آمینواسیدی را آزاد کند. اگرچه لایه پپتیدوگلیکان کاملاً در این ارگانیسم‌ها ضخیم است، اما ممکن است در این حالت یک کاهش ضخامت در آن اتفاق افتد و کاهش در اتصالات عرضی و یا افزایش اندازه روزنه در آن دیده شود (۴۵).

آزمایش‌های انجام شده با آنزیم‌های پروناز E، لیپاز و ام-پریودات[19] بر اتصالات بین باکتری و آفلاتوکسین نشان داد که غالب اتصالات با ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی صورت می‌گیرند. آنزیم پریودات باعث اکسیداسیون گروه‌های هیدروکسیل به آلدئیدها و گروه‌های کربن- اسید شده که بیش‌ترین کاهش در اتصال آفلاتوکسین B_1 به باکتری ایجاد می‌کند و در واقع نشان می‌دهد که غالب اتصالات با ترکیبات کربوهیدراتی باکتری صورت می‌گیرد. البته در استفاده از آنزیم‌ها، آزادسازی آفلاتوکسین باند شده به باکتری به‌طور کامل کاهش نمی‌یابد که در واقع بیانگر درگیری ترکیبات دیگر است. با استفاده از آنزیم لیپاز مشخص شد که ترکیبات لیپیدی مؤثر نیستند. اتصال به باکتری به‌صورت AFB2 < AFB1> AFG1 > AFG2 می‌باشد که مرتبط با کاهش یافتن قطبیت ترکیبات و سازگار با واکنش‌های هیدروفوبیک بوده که در اتصال نقش اساسی ایفا می‌کنند (۴۵).

اگر یک سلول باکتریایی آفلاتوکسین بیشتری جذب نماید، مولکول آفلاتوکسین به مدت طولانی‌تر در سطح سلول باقی می‌ماند (۵۵).

[19] M- periodate

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین ممانعت رقابتی غیرمستقیم در الایزا نشان می‌دهد که ترکیبات سطحی در دیواره باکتری‌های لاکتیک اسید، در اتصال آفلاتوکسین درگیر هستند. آسیب‌دیدگی و یا ایجاد تخریب در دیواره سلولی باکتری در مقایسه با زمانی که باکتری کاملاً سالم است و مکان‌های اتصال در دسترس نیستند می‌تواند باعث آشکار شدن مکان‌های اتصال غیرقابل دسترس شده و ممکن است اجازه اتصال آفلاتوکسین B_1 را به دیواره سلولی و ترکیبات غشای پلاسمایی بدهد.

استفاده از تیمار اسیدی باعث تغییر شکل ساختاری سلول می شود. سلول از حالت یک پارچگی خارج شده، بنابراین اتصال آفلاتوکسین B_1 به ترکیبات درون سلولی میسر می شود. این موضوع در زمان استفاده از آنتی‌بادی جهت آنالیز آفلاتوکسین B_1 در باکتری تحت تیمار اسیدی مشخص شد، که از ورود آنتی‌بادی جلوگیری کرده زیرا اندازه مولکول آنتی‌بادی بزرگ بوده و قدرت عبور از دیواره سلولی باکتری و اتصال به مولکول آفلاتوکسین B_1 در دیواره داخلی ندارد (۶۹).

بر اساس مطالعات انجام شده، نتایج بین سلول زنده و غیرزنده نشان می‌دهد در ایجاد اتصالات، زنده‌مانی میکروارگانسیم چندان مؤثر نیست و همچنین در حالت تیمار اسیدی ممکن است میزانی از اتصالات به‌صورت درون‌سلولی باشد و در مقایسه با تیمارهای دیگر (حرارت)، سلول‌های باکتریایی درصد اتصال بالاتری از سم آفلاتوکسین را به خود نشان می‌دهند (۴۳).

طی یک بررسی دیگر توسط بشای و همکاران (۲۰۰۳) ملاحظه گردید که کمپلکس باکتری/ آفلاتوکسین می‌تواند به‌طور مؤثری از روده مرغ عبور کند بدون این‌که شکسته شود و یا در ارتباط با گونه باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، وقتی به آفلاتوکسین B_1 متصل شود، چسبندگی آن به لوله گوارش کاهش می‌یابد (۱۴).

اسید معده، آنزیم‌های رودهای و مخاط رودهای مزاحمتی بر اتصال آفلاتوکسین B_1 توسط گونه پروبیوتیک LGG ایجاد نمی‌کنند (۴۳).

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۲- کاربرد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در کاهش سم آفلاتوکسین:

مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* که تحت نام مخمر نانوایی شناخته شده است، یک مخمر ارزان قیمت و کم هزینه می باشد. تحقیقات نشان می دهد که این مخمر توانایی اتصال بیشتر از ۴۰٪ با آفلاتوکسین موجود در محیط به دیواره سلولی خود دارند (۹۴).

رهایی و همکاران (۱۳۸۷)، در بررسی توانایی گونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* جهت کاهش آفلاتوکسین موجود در پسته بر اساس اندازه گیری آفلاتوکسین نمونه های پسته در زمانهای ۸، ۳، ۵/۱ و ۱۲ ساعت پس از تثبیت سلولهای مخمر بر آن، مشاهده نمودند که متصل شدن آفلاتوکسین به دیواره سلولی مخمر فرآیند نسبتًا سریع است که در زمان اندکی (حدود ۳ ساعت بعد از تثبیت مخمر بر پسته آلوده) به حداکثر مقدار خود می رسد. پروتئین های دناتوره شده یا موجب تشکیل محصولات واکنش میلارد در دیواره سلولی شده و یا با انحلال بعضی از مانوپروتئین های موجود در دیواره سلولی، نفوذپذیری دیواره را افزایش می دهد که منجر به افزایش دسترسی مکان های اتصال مخفی دیواره می شود. همچنین در این پژوهش مشاهده شد که تیمار سلولهای گونه مخمر با اسید کلریدریک دو مولار برای ۹۰ دقیقه در دمای اتاق، قدرت اتصال آفلاتوکسین را به حدود ۶۰٪ می رساند. شرایط اسیدی در فرآیندی مشابه از طریق اثر روی پلی‌ساکارید ها و تبدیل به منومرها و شکسته شدن به آلدئید ها عمل می کند. توانایی اتصال به خصوص زمانی که مخمر تحت تیمار اسیدی قرار گرفته باشد به حداکثر مقدار خود می رسد (۳).

طبق پژوهشهای انجام شده توسط شتی و همکاران (۲۰۰۶)، مشخص شده است که در شرایط اسیدی، مقداری از اتصالات درون سلولی باشد. دیواره سلولی مخمر شبکه ای از بتا ۱ و ۳ گلوکان با زنجیره های جانبی بتا ۱ و ۶ گلوکان است که مانوپروتئین ها به وسیله پیوند کوالانسی به لایه داخلی گلوکان متصل شده اند و دارای مقدار اندکی کیتین می باشند. این ترکیبات جایگاه های قابل دسترس جهت اتصال ترکیبات مختلف به دیواره

Archive of SID

www.SID.ir

سلول از طریق پیوندهای هیدروژنی، یونی و هیدروفوبیک می باشند که عمدتا واکنش های هیدروفوبیک در این پیوندها نقش دارند. در واقع حتی در گونه های خشک شده ساکارومایسس چنین توانایی دیده شده است (۹۴).

پدیده اتصال آفلاتوکسین یک پدیده فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می افتد. ۷۵٪ قدرت اتصال مخمر مربوط به مواد استخراج شده از دیواره سلولی بوده و زمانی که الیگوساکارید-مانان تغییر یافته از دیواره مخمر مشتق می شود این مقدار به ۹۵٪ می رسد. مطالعات اخیر بیانگر این است که قسمت پلی ساکاریدی دیواره سلولی در اتصال سطحی آفلاتوکسین در گونه مخمر موثر واقع می شود (۹۴).

طبق نظریه کونی (۱۹۸۰)، مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* شدت آفلاتوکسیکوزیس را از طریق چلاته کردن یعنی اتصال به مولکول های آفلاتوکسین، کاهش می دهد و از لوله گوارشی حذف می کند (۲۴).

ماشه و دوگودا و (۱۹۹۶)، در طی مطالعه ای در شرایط *in vitro* مشاهده کردند که افزودن ۰/۰۵٪ مانوالیگوساکارید (استخراج شده از دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه) به خوراک آلوده با ۲۰۰µg/kg آفلاتوکسین، ۷۹٪ سم موجود را به خود متصل می کند (۶۰).

بر طبق آزمایشات مادریگال سانتیلان و همکارانش (۲۰۰۶)، جذب آفلاتوکسین توسط گونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* باعث هیچ گونه تغییر ساختاری در ریزسازواره نمی شود. این موضوع با توجه به مقایسه دانسیتوگرام های به دست آمده با توجه به دو سطح غلظت آفلاتوکسین B_1 استاندارد و میزان سم متصل به بیومس مخمر ساکارومایسس، به اثبات رسید (۵۹).

نتایج تحقیقات بتا و لاسزتیتی (۱۹۹۹) نشان داده است که در کاربرد سه تیمار مختلف بر مخمر، بالاترین توانایی اتصال آفلاتوکسین به مخمر، در شرایط اسیدی دیده می شود

Archive of SID

www.SID.ir

و بر اساس نمونه برداری در زمانهای مختلف مشاهده شد که فرایند اتصال آفلاتوکسین به مخمر نسبتًا سریع است، همچنین نتایج بین سلول زنده و غیر زنده (سلولهای تیمار حرارتی و اسیدی) به دست آمد که نشان می دهد در ایجاد اتصالات، زنده مانی ریزسازواره (مخمر) چندان موثر نیست (۱۲).

مطالعات نشان داده است که ترکیب مخمر/آفلاتوکسین می تواند به طور موثری از روده مرغ عبورکند بدون اینکه شکسته شود و یا در ارتباط با گونه باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، وقتی به آفلاتوکسین B_1 متصل شود، چسبندگی آن به لوله گوارش کاهش می یابد (۶۰).

نوسک و کاتز (۲۰۰۲) گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک حاوی *ساکارومایسس سرویزیه* و *انتروکوکوس فاسیوم* به جیره گاوهای شیرده باعث افزایش قابلیت هضم ماده خشک ذرت سیلو شده و یونجه می شود (۷۳).

بیچهمین و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که افزودن باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* (باکتری تولید کننده اسید لاکتیک) به همراه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در جیره گاوهای پرواری باعث بهبود هضم ماده خشک دانه ذرت نسبت به زمانی که *انتروکوکوس فاسیوم* به تنهایی اضافه شده بود گردید (۱۳).

۲-۳- اثر پروبیوتیک های غیر باکتریایی بر متابولیسم شکمبه:

پروبیوتیک های غیر باکتریایی شامل *ساکارومایسس سرویزیه* و *آسپرژیلوس اوریزا* می باشند. این دو مکمل اثرات تقریبا مشابهی بر عملکرد حیوان دارند و پارامترهای مشابهی در بررسی اثرات آن برحیوان مورد مطالعه قرار می گیرند.

۲-۳-۱- اثر *آسپرژیلوس اوریزا*[20] و *ساکارومایسس سرویزیه* بر جمعیت میکروبی شکمبه:

ساکارومایسس سرویزیه و *آسپرژیلوس اوریزا* قادرند سبب تغییرات در جمعیت میکروبی شکمبه شوند. این امر احتمالا به علت بهبود جریان پروتئین میکروبی به دئودنوم می باشد.

[20] *Aspergillus Oryza*

Archive of SID

www.SID.ir

این سوال مطرح است که آیا افزایش باکتری ها در نتیجه افزایش توده میکروبی است و یا اینکه افزایش در نسبت باکتری های زنده بدون تغییر در توده میکروبی است. فقط در یک مطالعه افزایش محتوای باکتری های زنده با دادن کشت مخمر گزارش شده است. معمولاً افزایش در جمعیت باکتریایی در باکتری های سلولوتیک و باکتری های مصرف کننده لاکتات مشاهده می شود، که افزاینده pH شکمبه می باشند. با افزایش توده میکروبی و حضور سوبسترا، رشد باکتری ها افزایش می یابد. توده میکروبی سبب بهبود هضم خوراک و تامین انرژی برای رشد باکتری ها و پروتو زآ و افزایش جریان پروتئین میکروبی به دئودنوم می شود.

نیوبولد (۱۹۹۸) با استفاده از یک تخمیر کننده مشابه شکمبه اثرات کشت مخمر را بر روی جمعیت میکروبی بررسی کرد. در این پژوهش از جمعیت پروتوزآ به طور معنی داری کاسته شده ولی جمعیت باکتری های سلولوتیک تا ۴۹٪ و محتوای باکتریایی تا ۲۵٪ و جمعیت باکتری های *سلنوموناس رومینتیوم* افزایش داشتند. اگر چه این مقادیر از نظر آماری معنی دار نبود. افزودن *آسپرژیلوس اوریزا* به جیره گاوهای شیری نشان داد که این مکمل سبب افزایش ۵۰٪ تا ۱۰۰٪ در جمعیت باکتری های شکمبه شده است، ولی اثری روی پروتوزآ دیده نشد (۷۰).

همچنین افزودن مکمل *ساکارومایسس سرویزیه* در گاوهای شیری سبب افزایش ۶۰٪ در جمعیت باکتری ها شده است.

در گاوهایی که کشت مخمر دریافت کرده بودند pH شکمبه، آمونیاک، استات، ایزووالرات و نسبت استات به پروپیونات کمتر و پروپیونات بیشتر از گاوهای کنترل بود. همچنین غلظت باکتری های بی هوازی و باکتری های سلولوتیک در گاوهای دریافت کننده کشت مخمر از گروه کنترل بیشتر بود (۸۴).

Archive of SID

www.SID.ir

فصل سوم

روش اجرای تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۱- مواد شیمیایی و محیط کشت ها

مواد مورد استفاده در این پروژه به شرح جدول ذیل(جدول ۲-۱) می باشد.

جدول ۳-۱- مواد مورد استفاده

نام ماده	شماره کاتالوگ	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
محیط کشت ام. آر.اس براث	۱۰۶۶۱		مرک آلمان
محیط کشت ام. آر.اس.آگار	۱۰۶۶۰		مرک آلمان.
محیط کشت ییست.مولد.براث			مرک آلمان.
محیط شکمبه			دامداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
کلرید سدیم	۶۴۰۰	NaCl	مرک آلمان
کلرید پتاسیم	۴۹۳۵	KCl	مرک آلمان
فسفات هیدروژن سدیم	۶۵۸۵	Na_2HPO_4	مرک آلمان
فسفات دی هیدروژن پتاسیم	۶۱۱۰۰۱	KH_2PO_4	مرک آلمان
اسید سولفوریک	۰۰۷۳۱	H_2SO_4	مرک آلمان
کلریدباریم	۱۳۱۱۰	$BaCl_2$	مرک آلمان
متانول	۱۰۶۰۰۸	CH_3OH	مرک آلمان
آفلاتوکسین B_1		$C_{17}H_{12}O_6$	سیگما آلمان
قرص رینگر	۱۵۵۲۵	--	مرک آلمان

نام ماده	شماره کاتالوگ	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
سویه میکروبی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (بصورت لیوفلیزه)	PTCC 1637	--	سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
سویه میکروبی *ساکارومایسس سرویزیه*	PTCC 5177		سازمان پژوهش‌های علمی و

Archive of SID

www.SID.ir

(بصورت لیوفلیزه)			صنعتی ایران
کیت الایزا	0N5215	--	یورو پروکسیما
الکل	--	CH_3OH	صنایع شیمیایی غدیر
تیترازول هیدروکسید سدیم	۰۹۹۵۹	NaOH	مرک آلمان

۳-۲- تجهیزات

تجهیزات مورد استفاده در این پروژه به شرح جدول ذیل (جدول۲-۲) می‌باشد.

جدول ۳- ۲- تجهیزات مورد استفاده

نام تجهیزات	مدل	شرکت سازنده
ارلن مایر	۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتری	زیماکس آلمان
مزور	۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتری	زیماکس آلمان
پی‌پت	۱۰ میلی‌لیتری	زیماکس آلمان
پی‌پت پاستور	-	-
دستگاه الایزا ریدر و واشر	بیوتک ELX808	ساخت آمریکا
بالون ژوژه	۱۰۰۰ میلی‌لیتری	-
لوله آزمایشگاهی	معمولی	-
میکروتیوپ	۱/۵ میلی‌لیتری	-
پلیت استریل	۸ سانتی‌متری یکبار مصرف	ساخت ایران
فالکون پلاستیکی	۵۰ میلی‌لیتری	-
نوک سمپلر	۰/۱ و ۱ میلی‌لیتری	-

Archive of SID

www.SID.ir

نام تجهیزات	مدل	شرکت سازنده
کرایوتیوپ	۵ میلی‌لیتری	–
ظروف شیشه‌ای درب‌دار	۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌لیتری	–
ترازوی دیجیتال	مدل MS303S با دقت ۰/۰۰۱ گرم.	–
کلنی‌کانتر	–	–
بن‌ماری	مدل Memmert	ساخت آلمان
اتوکلاو	Hitachi	ژاپن
pH متر	مدل جنوی(JENWA)	ساخت انگلستان
شیکر لوله	مدل ولپ(VELP)	ساخت ایتالیا
اینکوباتور یخچالدار	مدل ولپ	ساخت ایتالیا
سمپلر	متغیر ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر مدل اپندورف	ساخت آلمان
سمپلر	متغیر۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر مدل برند	ساخت آلمان
یخچال–فریزر	شرکت پارس	ساخت ایران
سانتریفوژ یخچالدار	مدل زیمنس TR25	ساخت آلمان
اینکوباتور شیکردار	مدل پارس آزما	ساخت ایران
اسپکتروفتومتر	مدل بیوکروم	ساخت انگلیس
ترمومتر	–	ساخت فرانسه
لام نئوبار	مدل اچ بی جی	ساخت آلمان
سل یکبار مصرف	–	ساخت ایتالیا

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۳- روش‌ها

۳-۳-۱- تهیه محلول‌های آفلاتوکسین B_1

پودر آفلاتوکسینB_1 از شرکت سیگمای آلمان خریداری شد. سپس با استفاده از استونیتریل محلول مادری با غلظت ۱۰۰µg/l تهیه گردید. به منظور آلوده کردن نمونه‌های مایع شکمبه، محلول‌های آفلاتوکسینB_1 با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰µg/l تهیه شد (۹۰).

۳-۳-۲- تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند

استانداردهای مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول اسید سولفوریک ۱٪ و کلرید باریم ۱٪ مطابق جدول ذیل (جدول۳-۳) برای بدست آوردن یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه می‌شود. در این پژوهش چون احتیاج به کدورت سلولی حدود 10^8CFU/ml باکتری بود، از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. محلول ۰/۵ مک فارلند از مخلوط کردن ۹/۹۵ml میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱٪ و ۰/۰۵ml کلریدباریم ۱٪ تهیه گردید. استاندارد ۱۰ مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی 1×10^8CFU/ml تا 2×10^8CFU/ml باکتری ایجاد می‌کند (۶۲).

جدول ۳-۳- تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند

متوسط سوسپانسیون باکتریایی (تعداد باکتری در هر ml میلی لیتر)	اسیدسولفوریک یک درصد (ml)	کلرید یک درصد (ml)	باریم مک فارلند
3×10^9	۹/۹۵	۰/۰۵	۰/۵

۳-۳-۳- تهیه محلول بافر فسفات

Archive of SID

www.SID.ir

برای تهیه محلول بافر فسفات مورد نیاز طبق دستورالعمل ۸g نمک کلرید سدیم، ۰/۲g کلرید پتاسیم، ۱/۴۴g فسفات مونو هیدروژن سدیم و ۰/۲۴g فسفات دی هیدروژن پتاسیم وزن گردید و در بالون ژوژه به حجم ۱۰۰۰ml رسید (۸۹).

۳-۳-۴- تهیه و آماده‌سازی سوش های میکروبی

باکتری لیوفلیزه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (PTCC1637) و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (PTCC 5177) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش کلکسیون میکروبی خریداری شد. آمپول‌های لیوفیلیزه حاوی سویه‌های استاندارد میکروارگانیسم‌های مورد نیاز طبق دستورالعمل تحت شرایط استریل از محلی بالای توده پنبه خراش داده شد سپس اطراف آمپول با گاز مرطوب شده با الکل ۷۰ درجه، کاملاً ضدعفونی گردید. آمپول احاطه شده توسط گاز، از محل خراش شکسته شد. توده پنبه را با یک پنس استریل خارج کرده، در شرایط استریل (زیر هود) و با کمک پیپت استریل ۰/۳ml تا ۰/۴ml از محیط مایع استریل ام.آر.اس براث برای باکتری و محیط کشت مایع استریل ییست. مولد. براث را به ماده خشک موجود در آمپول افزوده و پس از یکنواخت کردن، سوسپانسیون میکروبی حاصل گردید. سوسپانسیون حاصله را در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت در اینکوباتور قرار می‌دهیم.

لازم به ذکر است علاوه بر تعیین کدورت سوسپانسیون باکتریایی با اسپکتروفتومتر، میزان رشد باکتری و مخمر و تعداد آن‌ها، با استفاده از لام نئوبار و نیز شمارش پلیت استاندارد به کمک محیط های کشت MRS آگار و YMA محاسبه گردید (۸، ۵۴، ۲، ۴۰).

۳-۳-۵- تهیه سوسپانسیون باکتری

از سوسپانسیون میکروبی حاصله در محیط کشت ام آر اس براث به مقدار ۱ml انتقال داده شد و در ۳۷°C در اینکوباتور یخچالدار به مدت ۲۴ ساعت جهت تکثیر باکتری‌ها و رسیدن به مقدار دلخواه 10^9CFU/ml در فاز لگاریتمی با استفاده از محلول استاندارد شده

Archive of SID

www.SID.ir

مک فارلند به روش جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر از سوسپانسیون رقیق شده باکتری اینکوباسیون گردید. تعیین این تعداد باکتری توسط کشت بی‌هوازی باکتری‌ها بر روی محیط کشت MRS آگار به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C و شمارش تعداد باکتری های رشد یافته در آن انجام شد (۲۹،۷،۴۵،۵۰،۴۹،۶۵).

۳-۳-۶- تهیه سوسپانسیون مخمر

از سوسپانسیون مخمر حاصله در محیط کشت YMB به مقدار ۱ml انتقال داده شد و در ۲۶°C در اینکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت جهت تکثیر مخمرها و رسیدن به مقدار دلخواه 10^9CFU/ml که با استفاده از محلول استاندارد شده مک فارلند به روش جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۵۰nm، از سوسپانسیون رقیق شده مخمر اینکوباسیون شد. همچنین به روش کشت pour plate در محیط کشت YMA به مدت ۷۲ ساعت در ۲۵°C شمارش تعداد مخمر های رشد یافته در آن انجام شد (۷،۲۵،۳۵،۴۹،۵۲،۶۵).

۳-۳-۷- جداسازی سلول‌ها

محتویات محیط کشت‌های باکتری و مخمر را به لوله‌های سانتریفوژ انتقال داده و در دمای ۴°C با دور ۳۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و دو بار هم با محلول بافر فسفات شستشو داده می شوند و مجدد سانتریفوژ نموده و محلول رویی دور ریخته می شوند. رسوبات ته لوله سلول‌های باکتری و مخمر می‌باشند از این رسوبات که اصطلاحا پلت[21] گفته می شوند استفاده می کنیم (۵۴،۷۴،۴۲). با استفاده از این پلت ها سوسپانسیون میکروبی مک فارلند را طبق روش توضیح داده شده تهیه می شود.

۳-۳-۸- آماده سازی محیط شکمبه دام

[1] pellet

Archive of SID

www.SID.ir

محیط شکمبه مورد استفاده در این آزمایشات، قبل از خوراک دهی صبح و از شکمبه ۴ عدد گوساله نر فیستولا شده نژاد هلشتاین تهیه می گردد. دام هایی که برای این کار انتخاب می شوند بایستی تحت رژیم بر پایه مواد خشبی و علوفه ای باشند. محیط شکمبه فورا به ظروف عایق حرارت منتقل شده و در طی ۳۰ دقیقه بعد از نمونه برداری مورد استفاده قرار می گیرد. pH محیط شکمبه بین ۵/۷ تا ۶/۵ تغییر پیدا می کند. محیط شکمبه را در مقادیر مساوی (۲ml) به کرایوتیوب های استریل منتقل کرده و سویه‌های باکتریایی و مخمر مورد نظر در مقادیر مورد نظر ($۱۰^{۹}$CFU/ml) به محیط شکمبه گاو اضافه می‌شوند و سپس غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰µg/l) به آن اضافه می‌شود نمونه های شاهد شامل تیمارهایی هستند که فاقد سم و نیز تیمارهایی که فاقد میکروارگانیسم می باشند هستند. بنابراین تیمارها عبارتند از:

سم آفلاتوکسین در ۴ سطح (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در هر لیتر) میکروارگانیسم در ۹ سطح (لاکتوباسیلوس رامنوسوس و ساکارومایسس سرویزیه در مقدار $۱۰^{۹}$CFU/ml، ۲ سطح میکروارگانیسم تیمار اسیدی شده و ۴ سطح که تحت تیمار حرارتی قرار گرفته و یک سطح فاقد میکروارگانیسم) و زمان در ۲ سطح (۱ و ۲ ساعت) که تعداد کل تیمارها با در نظر گرفتن ۳ تکرار ۲۱۶ تیمار خواهد شد.

۳-۳-۹- آماده سازی تیمارهای میکروارگانیسم های مورد استفاده

۳-۳-۹-۱- میکروارگانیسم زنده

جهت این تیمار سوسپانسیون باکتری و مخمر را که قبلا به مقدار استاندارد $۱۰^{۹}$CFU/ml رسانده شده اند را به ۲ml محیط شکمبه اضافه کرده به طوری که مقدار نهایی میکروارگانیسم ها در محیط شکمبه $۱۰^{۸}$CFU/ml شود. بدین منظور ۰/۲ml سوسپانسیون میکروبی به محیط شکمبه اضافه می شود.

۳-۳-۹-۲- میکروارگانیسم اتوکلاو شده

Archive of SID

www.SID.ir

برای تهیه این تیمار سوسپانسیون باکتری و مخمر را که قبلا به مقدار استاندارد 10^9CFU/ml رسانده شده اند را به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C اتوکلاو کرده و سپس طبق روش گفته شده در مرحله قبل ۰/۲ml سوسپانسیون میکروبی به محیط شکمبه اضافه می شود (۹۲، ۲۹، ۲۵).

۳-۳-۹-۳- میکروارگانیسم جوشانده شده

برای تهیه این تیمار سوسپانسیون باکتری و مخمر را که قبلا به مقدار استاندارد 10^9CFU/ml رسانده شده اند را به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰°C حرارت داده و سپس طبق روش گفته شده در مرحله قبل ۰/۲ml سوسپانسیون میکروبی به محیط شکمبه اضافه می شود (۲۹، ۲۵).

۳-۳-۹-۴- میکروارگانیسم تیمار اسیدی شده

برای انجام تیمار اسیدی به پلت‌های میکروارگانیسم ها میزان ۱۰ml از اسید کلریدریک ۲ مولار اضافه می شود و به مدت ۱ ساعت در اینکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C با دور ۱۵۰rpm قرار داده می شوند تا اسید موثر واقع شود. سپس سوسپانسیون اسیدی شده را با دور ۳۴۰۰g و مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و با محلول بافر فسفات شستشو داده و سپس سوسپانسیون باکتریایی مک فارلند را از آن تهیه می شود. سپس طبق روش گفته شده در مرحله قبل ۰/۲ml سوسپانسیون میکروبی به محیط شکمبه اضافه می شود (۴، ۵۴، ۴۲).

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین B_1 باقیمانده در سوپرناتانت با روش الایزا انجام شد. کیت خریداری شده ساخت شرکت یوروپروکسیما [22] و روش به‌کار رفته برپایه الایزای رقابتی مستقیم بود.

۳-۳-۱۰- اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین B_1 به روش الایزا

[22] Euro Proxima

Archive of SID

www.SID.ir

مراحل کلی آزمون الایزا طبق دستورالعمل کیت الایزا شرکت یورو پروکسیما[۲۳] می‌باشد.

۳-۳-۱۰-۱- اصول الایزای آفلاتوکسین B_1 :

پلیت میکروتیتر کیت الایزا، ۱۲ نوار و هر نوار، ۸ چاهک دارد که با آنتی‌بادی‌های (پادتن‌ها) خرگوش تا lgG موش پوشش سطحی داده شده‌اند. در اولین مرحله انکوباسیون، آنتی‌بادی‌های خاص (آنتی-آفلاتوکسین موش)، آفلاتوکسین نشان‌دار شده[۲۴] با آنزیم (آنزیم مزدوج[۲۵]) و آفلاتوکسین B_1 استانداردها یا نمونه، به چاهک‌های پوشش داده شده، اضافه می‌شوند. آنتی‌بادی‌های خاص، به‌وسیله آنتی‌بادی‌های تثبیت شده خرگوش پیوند برقرار کرده و در همان زمان آفلاتوکسین‌های آزاد (در محلول استاندارد یا در نمونه) و آفلاتوکسین نشان‌دار شده با آنزیم، برای جایگاه‌های اتصال آنتی‌بادی خاص رقابت می‌کنند (ایمنواسی رقابتی آنزیمی). بعد از پایان زمان انکوباسیون یک ساعته، معرف‌های غیرپیوندی (آنزیم‌های نشان‌دار) در مرحله شستشو حذف می‌شوند. مقدار آنزیم مزدوج پیوندی با افزودن سوبسترای رنگ‌زا[۲۶] (تترامتیل بنزیدین، TMB) قابل رویت و اندازه‌گیری می‌شود. آنزیم پیوندی با تغییری که ایجاد می‌کند، باعث ایجاد محصول رنگی می‌شود. واکنش سوبسترا با افزودن اسید سولفوریک متوقف می‌شود. شدت رنگ در ۴۵۰ نانومتر به صورت فتومتری اندازه‌گیری شده و با غلظت آفلاتوکسین B_1 در نمونه، نسبت معکوس دارد.

۳-۳-۱۰-۲- آماده سازی نمونه:

۵۰µl از سوپرناتانت حاصل از سانتریفوژ، با ۱۵۰µl از بافر رقیق سازی، رقیق می‌شود تا یک محلول محتوی ۲۰٪ متانول بدست آید. ۵۰µl از سوپرناتانت رقیق شده را در حفره‌های مربوط به پلیت الایزا اضافه می‌کنیم.

۳-۳-۱۰-۳- آماده سازی معرف‌ها:

[1]Euro Proxima
[24]labelled
[25]conjugate
[26]chromogen

Archive of SID

www.SID.ir

قبل از آغاز آزمایش نمونه‌ها را به دمای محیط می‌رسانیم.

بافر شستشو: بافر شستشو ۲۰ برابر غلیظ است. قبل از هر بار استفاده لازم است رقیق‌سازی انجام شود تا محلول تازه مورد استفاده قرار بگیرد. برای هر استریپ، ۴۰ml بافر شستشوی رقیق‌شده استفاده می‌شود (۲ml بافر شستشوی غلیظ + ۳۸ml آب مقطر).

محلول سوبسترا/کروموژن: سوبسترا / محلول رنگی (آماده برای مصرف) به دلیل توانایی واکنش سریع، باید در دمای ۴°C نگهداری شود. قبل از اضافه کردن به داخل چاهک‌ها، محتویات آن را مخلوط می کنیم.

بافر رقیق سازی: بافر رقیق سازی ۴ برابر غلیظ شده است. قبل از رقیق سازی (۲۰ml بافر+۶۰ml آب مقطر)، بافر غلیظ بهتر است در دمای اتاق نگهداری شود و به طور کامل مخلوط شود. محتویات بافر غلیظ می‌تواند ته نشین شود.حفره‌ها را قبل از رقیق سازی با آب مقطر مخلوط می‌کنیم. بافر رقیق سازی بعد از استفاده ۴ مرتبه می‌تواند در یخچال نگهداری شود تا زمانیکه تاریخ انقضاء آن سر برسد.

محلول کونژوگه: ویال محتوی کونژوگه لیوفیلیزه را (آفلاتوکسین-HRP) با ۴ml از بافر رقیق سازی به طور کامل مخلوط می‌کنیم و تا زمان استفاده در جای تاریک نگهداری می‌کنیم.

محلول آنتی بادی: ویال محتوی آنتی بادی‌های لیوفیلیزه را با ۴ml از بافر رقیق سازی به طور کامل مخلوط می‌کنیم و تا زمان استفاده در جای تاریک نگهداری می‌کنیم.

۳-۳-۱۰-۴- شیوه سنجش:

۱- پس از آماده کردن نمونه‌ها و معرف‌ها، پلیت میکروتیتر برای استفاده آماده است.

۲- ۱۰۰µl بافر رقیق‌سازی استاندارد را در دو تکرار (در چاهک‌های A_1، A_2 و بلانک) اضافه می کنیم.

۵۰µl بافر رقیق‌سازی استاندارد را در دو تکرار (در چاهک‌های B_1، B_2 و Bmax) اضافه می کنیم.

Archive of SID

www.SID.ir

۵۰µl از هریک از محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین B_1 را در دو تکرار (در چاهک‌های $C_{1,2}$ تا $H_{1,2}$، ۰/۰۳۱۳، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ng/ml) اضافه می کنیم.

۳- ۵۰µl از هر محلول نمونه به حفره‌های باقیمانده در پلیت میکروتیتر در دو تکرار اضافه می‌کنیم (۴۰ نمونه، ۸۰ حفره).

۴- ۲۵µl از کونژوگه (آفلاتوکسین-HRP) به همه حفره ها به جز حفره‌های A_1 و A_2 اضافه می‌کنیم.

۵- ۲۵µl از محلول آنتی بادی به همه حفره ها به جز حفره‌های A_1 و A_2 اضافه می‌کنیم.

۶- پلیت میکروتیتر را کاملا می‌بندیم و برای چند ثانیه تکان می‌دهیم.

۷- برای مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای ۳۷°C اینکوباتور گذاری می‌کنیم.

۸- محلول را از پلیت میکروتیتر دور می‌ریزیم و ۳ مرتبه با بافر شستشو، شستشو می‌دهیم.

۹- ۱۰۰µl از محلول سوبسترا را به هر حفره تزریق می‌کنیم و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵°C) اینکوبه می‌کنیم.

۱۰- ۱۰۰µl از محلول متوقف کننده را به هر حفره اضافه می‌کنیم.

۱۱- مقادیر جذب را در ۴۵۰ نانومتر بلافاصله می‌خوانیم (۵۶).

شکل ۳- ۱- تصویر دستگاه الایزا

Archive of SID
www.SID.ir

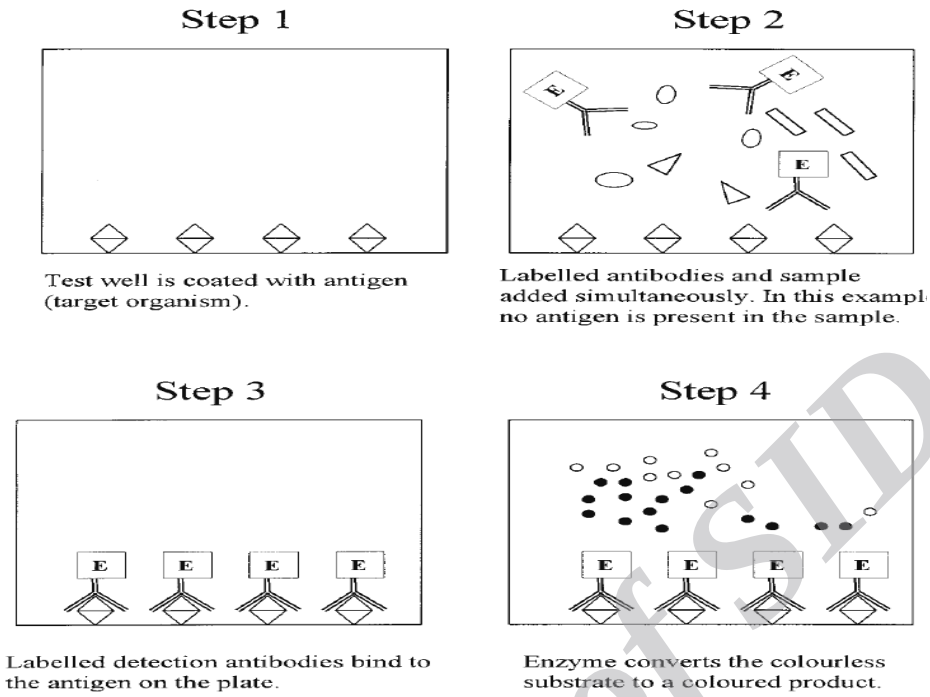
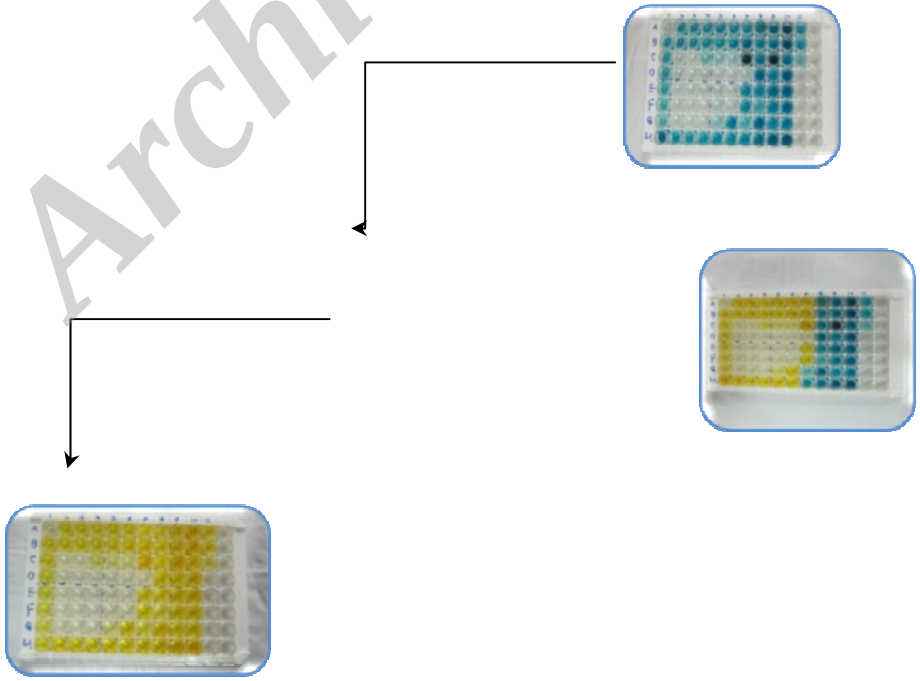


Fig. 11.2 The main steps of a competitive ELISA.

شکل ۳- ۲- شماتیک الایزای رقابتی



Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲- ۳- تصویر تغییرات رنگ کیت آفلاتوکسین B_1 در مراحل آزمون الایزا

۳-۳-۱۰-۵- اندازه گیری دانسیته نوری نمونه ها:

میانگین دانسیته نوری (OD) چاهک‌های A_1 و A_2 از OD تک‌تک چاهک‌های حاوی استانداردها و نمونه‌ها تفریق گردید. مقادیر OD شش استاندارد و نمونه (میانگین مقادیر دو تکرار) به میانگین مقدار OD استاندارد صفر(چاهک‌های B_1 و B_2) تقسیم گردید و در ۱۰۰ ضرب شد. بنابراین استاندارد صفر معادل ۱۰۰ درصد (ماکزیمم جذب) و مقادیر سایر OD ها براساس درصد ماکزیمم جذب بیان گردید.

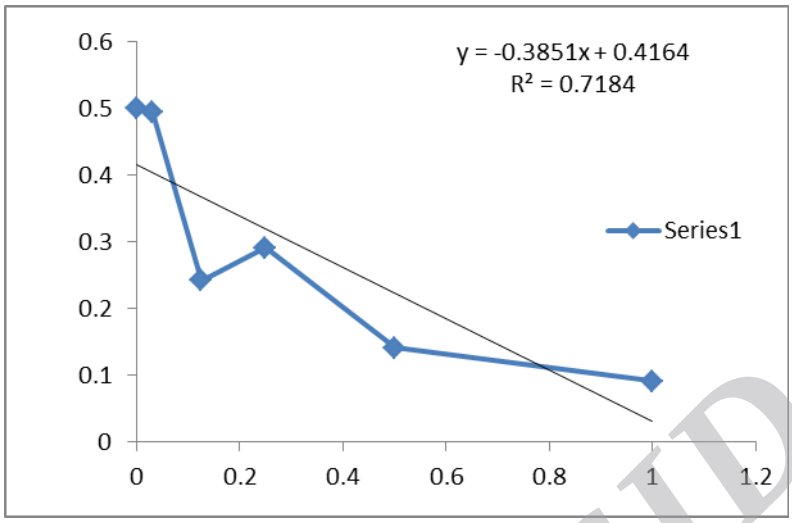
$$\text{درصد جذب ماکزیمم} = \frac{\text{OD استاندارد (یا نمونه)}}{\text{OD استاندارد صفر}} \times ۱۰۰$$

۳-۳-۱۰-۶- رسم منحنی کالیبراسیون

نتایج حاصل از آزمون الایزا به صورت درصد جذب گزارش می‌شود. برای تعیین مقدار آفلاتوکسین باقی‌مانده در سوپرناتانت هر یک از نمونه‌ها منحنی کالیبراسیون رسم شد؛ بدین منظور مقادیر (درصد جذب ماکزیمم) محاسبه شده برای استانداردها (برروی محور Y) در غلظت‌های معادل آفلاتوکسین B_1 (µg/ml) بر روی محور X، به صورت لگاریتمی رسم گردید. منحنی کالیبراسیون باید در محدوده ۶/۲۵ تا ۲۰۰µg/ml، خطی باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- ۴- منحنی کالیبراسیون

۳-۴- آنالیز آماری:

این پژوهش در مرحله *in vitro* در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای لحاظ شده شامل آفلاتوکسین B_1 در ۴ سطح و ۲ زمان مختلف اینکوباسیون روی میکروارگانیسم ها باکتری با ۴ تیمار (شاهد، باکتری زنده، باکتری اتوکلاو شده و باکتری اسیدی) و مخمر در ۴ سطح (شاهد، مخمر زنده، مخمر اتوکلاو شده و مخمر اسیدی) در محیط شکمبه انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری MSTAT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها بمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۹۵٪ انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2010 انجام گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل چهارم

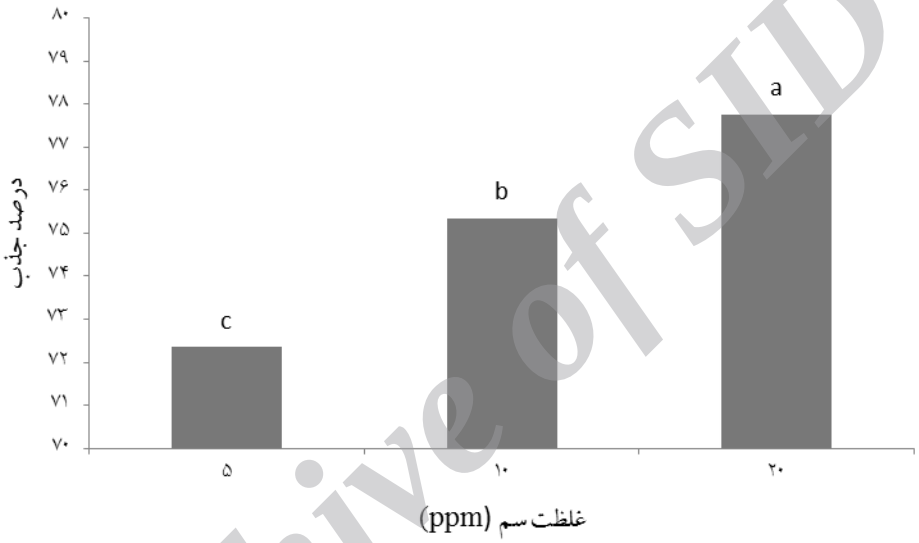
یافته های تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۱- بررسی اثر غلظت سم بر میزان جذب آفلاتوکسین B_1 توسط میکروارگانیسم ها

همان طور که در شکل ۴-۱ مشاهده می شود با افزایش غلظت آفلاتوکسین B_1 در مایع شکمبه میزان جذب سم توسط میکروارگانیسم ها (مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*) افزایش یافته است.



شکل۴-۱- بررسی اثر غلظت سم بر میزان جذب آفلاتوکسین B_1 توسط میکروارگانیسم ها

غلظت های مختلف سم اختلاف معنی داری در کاهش سم دارند ($p\leq ۰/۰۵$).

۴-۲- بررسی اثر تیمار میکروارگانیسم بر میزان جذب آفلاتوکسین B_1 در محیط شکمبه

همانطور که در شکل ۴-۲ مشاهده می شود میکروارگانیسم درحالت اتوکلاو شده (باکتری و مخمر) بیشترین تأثیر را در جذب آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه داشته است(۸۲/۶٪) و پس از آن حالت حرارت دیده میکروارگانیسم دارای بیشترین تأثیر (۷۹/۹٪) در حذف سم می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴-۲- بررسی اثر تیمار میکروارگانیسم بر میزان جذب آفلاتوکسین B_1 در محیط شکمبه

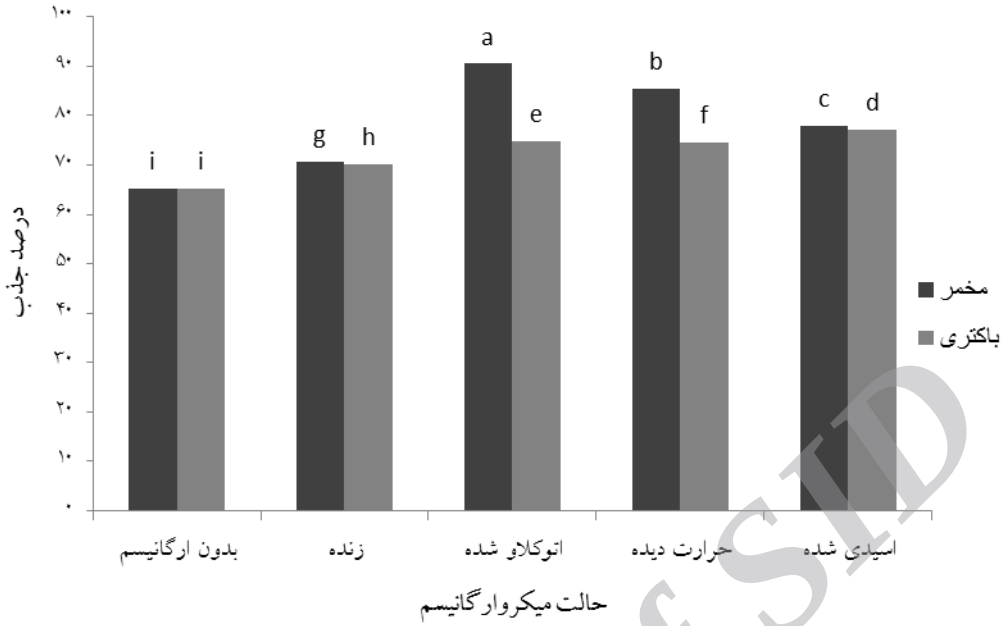
سایر حالت های میکروارگانیسم که بر روی سم موثر هستند به ترتیب تیمارهای اسیدی شده و تیمار باکتری زنده هستند و این اختلاف در جذب سم در حالت های مختلف میکروارگانیسم ها معنی دار می باشد.

۴-۳- مقایسه اثر حالت میکروارگانیسم ها (باکتری و مخمر) در جذب سم از محیط شکمبه:

همانطور که در شکل ۴-۳ مشاهده می شود میکروارگانیسم اتوکلاو شده دارای بیشترین مقدار جذب سم از محیط شکمبه می باشد و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در این حالت دارای بیشترین تأثیر جذب کنندگی می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۴-۳- مقایسه اثر حالت میکروارگانیسم ها (باکتری و مخمر) در جذب سم از محیط شکمبه

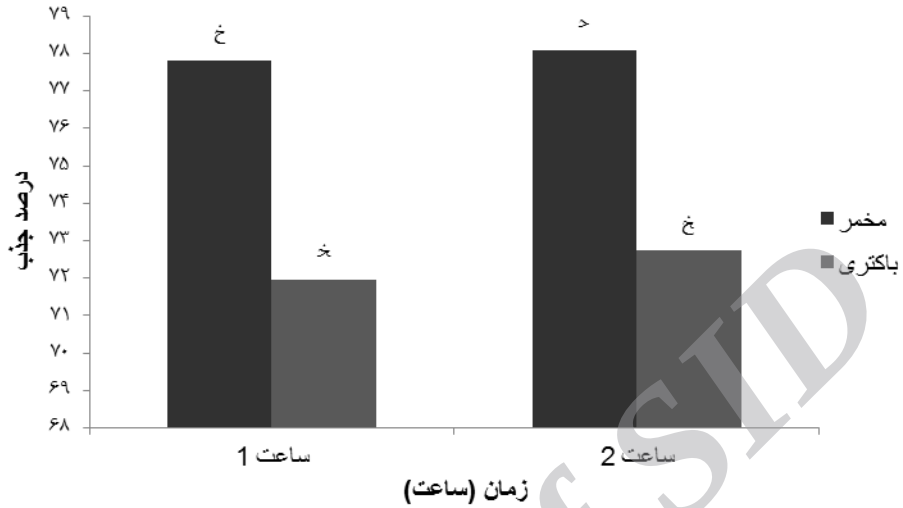
همانطور که در شکل ۴-۲ نیز مشاهده شد بیشترین تأثیر میکروارگانیسم های انتخاب شده در این تحقیق در جذب سم در حالت تیمار حرارتی با اتوکلاو می باشند و پس از آن تیمارهای حرارتی، اسیدی و میکروارگانیسم زنده به ترتیب دارای بیشترین تأثیر در جذب سم می باشند. همانطورکه در شکل ۴-۳ پیداست تیمارهای مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با تیمارهای باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* دارای اثر حذف سم و جذب کنندگی بیشتری هستند و این اثر حذف سم آنها در مقایسه با باکتری ها معنی دار است.

۴-۴- بررسی اثر زمان در جذب سم از محیط شکمبه توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه

همانطور که در شکل ۴-۴ ملاحظه می شود با افزایش زمان اینکوباسیون یا ماندگاری باکتری و مخمر در محیط شکمبه میزان جذب توکسین به طور معنی داری افزایش یافته است و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* تأثیر جذب کنندگی معنی داری داشته است.

Archive of SID

www.SID.ir



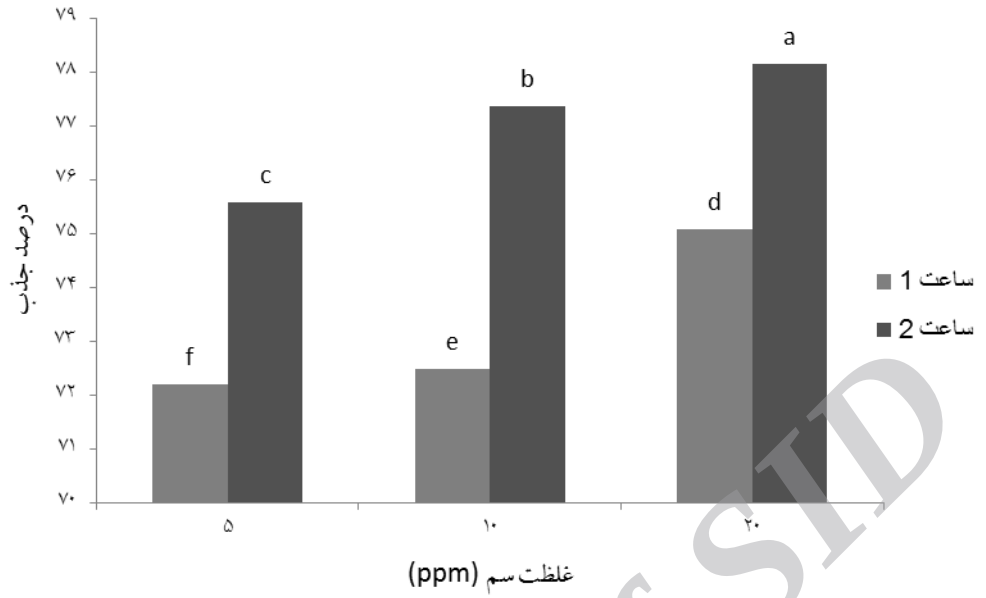
شکل۴-۴- بررسی اثر زمان در جذب سم از محیط شکمبه توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه

۴-۵- اثر غلظت سم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه

همانطور که در شکل ۴-۵ مشاهده می شود با افزایش غلظت سم آفلاتوکسین B_1 میزان جذب سم توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه در این تحقیق افزایش پیدا می کندبه طوری که غلظت ۲۰ppb بیشترین میزان جذب را داشته است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۵- اثر غلظت سم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه

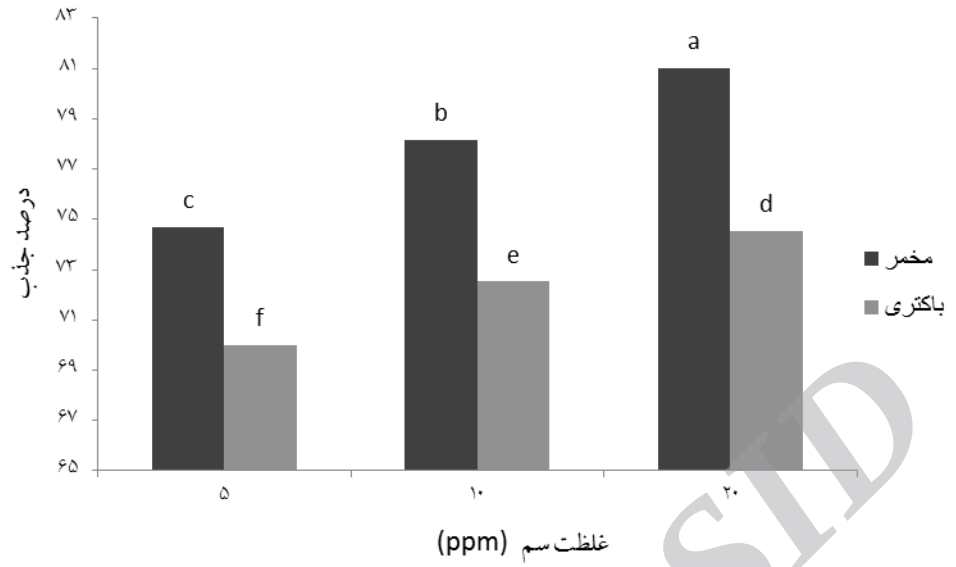
در طول مدت اینکوباسیون محیط شکمبه مشاهده می شود که در ساعت دوم اینکوباسیون میزان جذب سم در غلظت های مختلف افزایش معنی داری داشته است و با افزایش میزان غلظت سم مقدار سم جذب شده روند صعودی دارد.

۴-۶- اثر غلظت و نوع میکروارگانیسم (مخمر و باکتری) در کاهش سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه

همانطور که در شکل ۴-۶ مشاهده می شود در غلظت های مختلف سم قدرت جذب توکسین توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بیشتر از باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* می باشد و این اختلاف معنی دار است. در غلظت های بالاتر سم میزان اتصال سم به

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۶- اثر غلظت و نوع میکروارگانیسم (مخمر و باکتری) در کاهش سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه

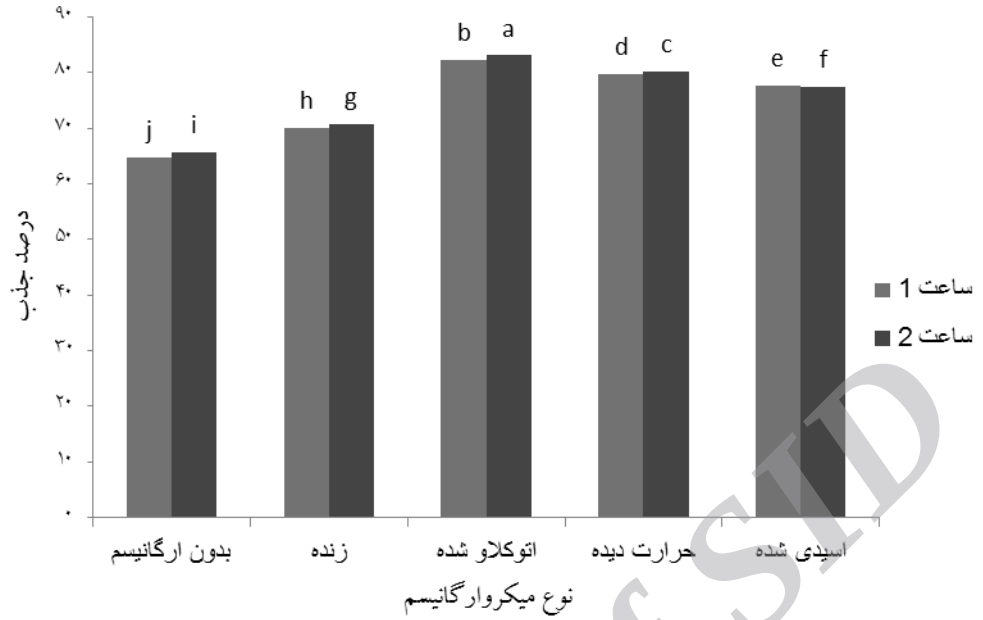
میکروارگانیسم ها به طور معنی داری افزایش یافته است و به همین ترتیب نیز درصد اتصال سم به مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نیز به طور معنی داری بیشتر است.

۴-۷- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه

همانطور که در شکل ۴-۷ مشاهده می شود تیمارهای مختلف مخمر و باکتری در زمان اینکوباسیون یک ساعت و ۲ ساعت اثرات متفاوتی در میزان جذب سم دارند و تیمار اتوکلاو شده میکروارگانیسم ها در ساعت دوم بیشترین میزان جذب توکسین را در محیط

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۷- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و زمان اینکوباسیون در کاهش سم آفلاتوکسینB_1 از محیط شکمبه

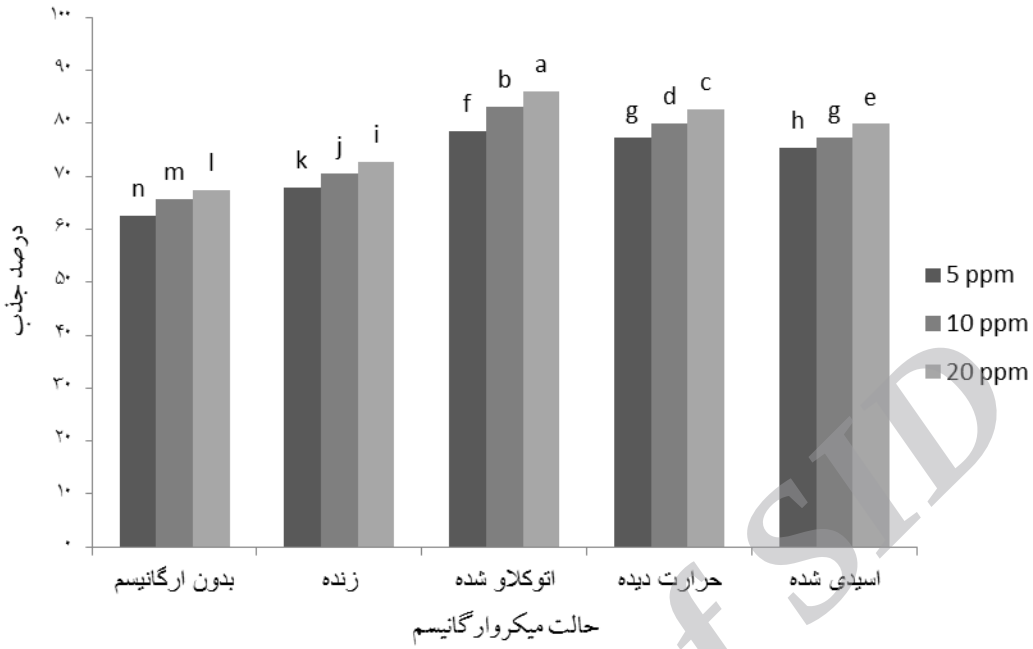
شکمبه داشته است و تفاوت آن با تیمارهای دیگر و زمان های اینکوباسیون معنی دار می باشد. همان طور که قبلا هم ذکر شد تیمارهای حرارت دیده میکروارگانیسم های مورد نظر در این تحقیق بعد از تیمار اتوکلاو دارای بیشترین میزان جذب هستند و بعد از آن تیمارهای اسیدی شده و نیز میکروارگانیسم زنده بدون تیمار قرار دارند همچنین میزان اتصال در ساعت دوم اینکوباسیون در مقایسه با ساعت اول اینکوباسیون به طور معنی داری بیشتر است.

۴-۸- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و غلظت سم برکاهش میزان آفلاتوکسینB_1

در شکل ۴-۸ اثر متقابل تیمارهای میکروارگانیسم ها و غلظت سم بر روی میزان جذب سم نشان داده شده است. همان طور که از شکل هم پیداست تیمار اتوکلاو شده میکروارگانیسم ها (باکتری و مخمر) دارای بیشترین تاثیر در جذب سم از محیط شکمبه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۸- اثر نوع تیمار میکروارگانیسم و غلظت سم برکاهش میزان آفلاتوکسین B_1

می باشند و با افزایش غلظت سم قدرت جذب سم توسط میکروارگانیسم ها نیز افزایش می یابد که در شکل های قبل هم اشاره شد و تیمار زنده میکروارگانیسم ها کمترین قابلیت جذب را نشان داده اند.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل پنجم

تجزیه و تحلیل یافته های تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

۵-۱- اثر غلظت سم و تیمار میکروارگانیسم بر میزان جذب آفلاتوکسینB_1 در محیط شکمبه

با افزایش غلظت آفلاتوکسینB_1 در مایع شکمبه میزان جذب سم توسط میکروارگانیسم ها (مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*) افزایش یافته است. غلظت های مختلف سم اختلاف معنی داری در کاهش سم دارند، همچنین بر اساس نتایج گزارش شده توسط ال- نظامی و همکاران (۱۹۹۸) مقدار سم جذب شده با افزایش میزان غلظت سم در محیط افزایش یافته است ولی این میزان جذب در مقادیر مختلف سم معنی دار نبوده است(۳۰). همچنین پیزولیتو و همکارانش (۲۰۱۱) نشان دادند که *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازیی* به ترتیب بهترین جذب کننده های سم در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ng/ml (µg/l) هستند (۷۷). همچنین رهنما وثوق و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که بیشترین مقدار جذب در کمترین و بیشترین میزان سم (۵، ۲۰µg/l) بوده است (۸۰). لین و براکت (۱۹۹۵) و سیگلر و همکاران (۱۹۹۶) نیز اظهار داشتند با افزایش مقدار توکسین درصد حذف آفلاتوکسین B_1 کاهش یافته است (۵۸ و ۲۲). مطالعات ال-نظامی و همکاران (۱۹۹۷) بر خلاف این یافته‌ها بود که بیان کردند مقدار آفلاتوکسین B_1 حذف شده با افزایش غلظت سم افزایش پیدا کرد اما درصد حذف تفاوت عمده ای نداشت (۲۹).

میکروارگانیسم درحالت اتوکلاو شده (باکتری و مخمر) بیشترین تأثیر را در جذب آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه داشته است(۸۲/۶٪) و پس از آن حالت حرارت دیده میکروارگانیسم دارای بیشترین تأثیر (۷۹/۹٪) در حذف سم می باشد.

سایر حالت های میکروارگانیسم که بر روی سم موثر هستند به ترتیب تیمارهای اسیدی شده و تیمار باکتری زنده هستند و این اختلاف در جذب سم در حالت های مختلف میکروارگانیسم ها معنی دار می باشد. بر طبق نظر ال- نظامی و همکاران (۱۹۹۸) و تی آگاراجا (۳۰ و ۹۷) مکانیسم حذف آفلاتوکسین B_1 توسط باکتری‌های اسید لاکتیک اشاره از طریق باند شدن آفلاتوکسین B_1 به دیواره سلولی یا اجزای دیواره سلولی باکتری ها می

Archive of SID

www.SID.ir

باشد و این روش بیش از تجزیه متابولیکی آن ها است. و این بر پایه مشاهداتی است که بیان می‌کنند زنده بودن باکتری شرط لازم برای حذف آفلاتوکسین B_1 نیست (۹۷). یافته‌های هاسکارد و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد اعمال بعضی از تیمارها (اسیدی و حرارتی) روی باکتری‌ها باعث افزایش عمده ای در توانایی باند شدن آفلاتوکسینB_1 توسط باکتری‌ها می‌شوند (۴۴). همچنین هاسکارد و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG و LC705 آفلاتوکسینB_1 را با بیشترین کارایی حذف کردند و باکتری‌های غیر زنده (کشته شده با حرارت یا اسید) بیشترین میزان اتصال آفلاتوکسین B_1 را داشتند و کمپلکس‌های ایجاد شده از پایداری بیشتری برخوردار بودند (۴۵).

در تناقض با این یافته‌ها لانکاپوترا و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که باکتری‌های زنده بیشتر از باکتری‌های کشته شده با حرارت موتاژن‌های غذایی (از جمله آفلاتوکسین B_1) را باند می‌کنند (۴۲).

رهنما وثوق و همکاران(۲۰۱۴) گزارش کردند که باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* کشته شده در اثر حرارت دارای اثر جذب کنندگی بالایی است اما بیشترین تأثیر در حذف سم از باکتری تیمار شده با اسید به میزان ۴۹/۶۲٪ دیده شده است(۸۱). ال- نظامی و همکاران (۱۹۹۸) تیاگاراها و هوسونو (۱۹۹۴) نیز گزارش کردند که باکتری تیمار شده حرارتی در جذب آفلاتوکسینB_1 از محیط کشت بیشترین اثر را داشته است(۳۰ و ۹۷) همچنین هاسکارد و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که تیمار حرارتی و اسیدی باکتری توانایی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را در جذب آفلاتوکسینB_1 از محیط کشت افزایش می دهد(۴۵). در مطالعه دیگری ال- نظامی و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که توانایی جذب در اثر تیمار اسیدی باکتری در محلول بافر فسفات به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است(۳۰).

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه شتی و همکاران (۲۰۰۷) مقادیر اتصال آفلاتوکسینB_1 با افزایش غلظت آفلاتوکسینB_1 در محیط به صورت خطی افزایش پیدا می کند و سلول های مخمر در غلظت های بالاتر آفلاتوکسینB_1 کارایی بیشتری از خود نشان می دهند(۹۴).

رهایی و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند که تیمار گونه های مخمر با اسید قدرت اتصال آنها با آفلاتوکسینB_1 را تا ۶۰٪ افزایش می دهد و همچنین حرارت دادن و دمای ۱۲۰°C به مدت ۲۰ دقیقه قدرت اتصال مخمر با آفلاتوکسین را تا ۵۵٪ افزایش می دهد(۴).

حرارت دادن باعث دناتوراسیون پروتئین ها یا تشکیل محصولات واکنش مایلارد در دیواره سلولی شده و یا با انحلال بعضی از مانوپروتئین های موجود در دیواره سلولی نفوذپذیری دیواره افزایش یافته و منجر به افزایش دسترسی مکان های مخفی دیواره سلولی می شود. همچنین شرایط اسیدی از طریق تأثیر روی پلی ساکاریدها و تبدیل مونومرها و شکسته شدن آنها به آلدئیدها عمل می کند و احتمال می رود که در شرایط اسیدی مقداری از واکنش ها درون سلولی باشند.

۵-۲- بررسی اثر زمان در جذب سم از محیط شکمبه توسط میکروارگانیسم های مورد مطالعه

با افزایش زمان اینکوباسیون یا ماندگاری باکتری و مخمر در محیط شکمبه میزان جذب توکسین به طور معنی داری افزایش یافته است و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* تأثیر جذب کنندگی معنی داری داشته است.

رهنما و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که با افزایش زمان اینکوباسیون لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط کشت میزان جذب آفلاتوکسین افزایش یافته و این اثر حذف تا زمان ۱۲ ساعت اینکوباسیون معنی دار است(۸۰). همچنین پلتونن و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که جذب آفلاتوکسینB_1 توسط *لاکتوباسیلوس آمیلوورانس* با افزایش زمان اینکوباسیون به مدت ۷۲ ساعت تا ۷۳٪ افزایش یافته است(۷۴). ال- نظامی و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که میزان آفلاتوکسین باند شده پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون

Archive of SID

www.SID.ir

لاکتوباسیلوس رامنوسوس سویه LC به طور قابل ملاحظه ای در مقایسه با زمان اولیه کاهش یافته است(۲۹).

صاحب قلم و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که بیشترین مقدار جذب آفلاتوکسین B_1 در زمان ۴ ساعت اینکوباسیون مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط کشت اتفاق افتاده است و به نظر می رسد که فرآیند جذب آفلاتوکسین توسط مخمر به سرعت انجام می شود به طوری که افزایش مدت زمان اینکوباسیون تا ۲۴ ساعت اثر معنی داری در جذب آفلاتوکسین از محیط کشت نداشته است(۸۸). همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که جذب آفلاتوکسین B_1 فرآیند سریعی است و بیشترین میزان کاهش سم در طی ۳ ساعت اینکوباسیون مشاهده شده است(۷۹).

Archive of SID

www.SID.ir

فصل ششم

نتیجه گیری و پیشنهادات

Archive of SID

www.SID.ir

۶-۱- نتیجه گیری:

در این تحقیق هدف بررسی اثر مخمر ساکارومایسس سرویزیه و باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر حذف سم آفلاتوکسین B_1 از محیط شکمبه دام می باشد. اندازه گیری میزان آفلاتوکسین B_1 توسط روش الایزا انجام شد.

یافته های این تحقیق بیان کننده این مطلب است که سلول های میکروارگانیسم ها به دلیل وجود ترکیبات دیواره سلولی شان توانایی جذب سموم را دارند. سلول های کشته شده میکروارگانیسم ها در جذب سم مؤثر تر می باشند. مخمر ساکارومایسس سرویزیه در حالت اتوکلاو شده و نیز کشته شده با حرارت دارای بیشترین توانایی جذب سم می باشند و می توان از سلول کشته شده مخمر و یا باکتری برای جذب و حذف سموم استفاده کرد.

۶-۲- پیشنهادات:

به عنوان یک راهکار مفید می توان گفت که از محصول کارخانجات تولید کننده خمیر مایه نان می توان در تهیه سلول های کشته شده مخمر توسط حرارت استفاده کرد و به عنوان یک محصول جانبی تولید شده توسط این کارخانجات و یا استفاده از پساب این کارخانجات که حاوی سلول های مخمر در حالت غیر زنده هستند جهت تولید سلول های مخمر خشک شده و کشته شده استفاده کرد تا در صنعت دامداری جهت کاهش سم آفلاتوکسین B_1 به خوراک دام به صورت پودر استفاده کرد همانگونه که در حال حاضر از محصولاتی از این قبیل تحت عنوان مایکوزورب استفاده می شود.

در مجموع یافته های این تحقیق نشان می دهد که از سلول های میکروارگانیسم ها می توان جهت کاهش سم آفلاتوکسین B_1 استفاده کرد و حتی می توان دیواره سلولی میکروارگانیسم ها را جداسازی کرده و از آن جهت حذف و کاهش سم استفاده کرد و به عنوان یک راهکار در صنعت خوراک دام استفاده از گلیکومانان دیواره سلولی مخمر می تواند برای کاهش سم آفلاتوکسین B_1 مفید و چاره سازباشد.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

منابع و مآخذ:

Archive of SID

www.SID.ir

۱- افشار، ن.، رجب، ا.، پروبیوتیک ها و کاربرد آنها در تغذیه دام و طیور. چاپ دوم. انتشارات نوربخش، تهران (۱۳۸۱).

۲- تاج آبادی ابراهیمی، م.، جعفری، پ.، هاشمی، م.، بهرامی، ه.، ۱۳۹۰. ارزیابی کاهش آفلاتوکسین B_1 در حضور لاکتوباسیل های جدا شده از ترخینه با روش الایزا، *مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی*. دوره سوم. شماره هشتم. ص ۴۸-۴۳.

۳- رهایی، سمیه.، رضوی، سید هادی و امام جمعه، زهرا.، ۱۳۸۷. بررسی توانایی گونه مخمر ساکارومایسس سروزیه جهت کاهش آفلاتوکسین موجود در پسته ، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۷، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹. ص ۸۸-۸۱.

۴- رهایی، سمیه.، بررسی قدرت آفلاتوکسین زدایی سویه های میکروبی تثبیت شده در پسته. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، دانشگاه تهران،۱۳۸۷.

۵-رهایی، سمیه.، رضوی، سید هادی و امام جمعه، زهرا.، ۱۳۸۷. بررسی توانایی گونه مخمر ساکارومایسس سروزیه جهت کاهش آفلاتوکسین موجود در پسته. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۷، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹. ص ۸۸-۸۱.

۶- کریمی ترشیزی، م.ا.، ۱۳۸۴.، جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری های اسید لاکتیک مناسب برای تولید پروبیوتیک در تغذیهٔ جوجه های گوشتی. رساله دکتری. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تربیت مدرس.

۷-مرتضوی، علی.، صادقی ماهونک، علی رضا. ۱۳۸۱. میکروبیولوژی غذایی.

۸-میردامادی، س.، رجبی، ا.، عزیز محسنی، ف.، مومن، ب.، ۱۳۸۶، تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های مختلف لاکتوباسیل، *مجله علوم و صنایع غذایی ایران*، دوره دوم، شماره سوم، ص ۵۷-۶۴.

9- Alberts, J. F., Engelbrecht, Y., Steyn, P. S., Holzapfel, W. H., 2006. Biological degradation of aflatoxin B_1 by Rhodococcus erythropolis cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 109: 121-129 .

10- Atroshi, F., Rizzo, A., Westermarck, T., Ali-Vehmas, T., 2002. Antioxidant nutrients and Mycotoxin. *Toxicology*. 180:151-167.

11- Avantaggiato, G., M. Solfrizzo, and A. Visconti., 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium Mycotoxin. *Food Additives and Contaminants* 22:379-388.

Archive of SID

www.SID.ir

12- Bata, A., Lasztity, R., 1999. Detoxification of Mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*. 10:223-228.

13- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., Leedle, J.A.Z., 2003. Effect of bacterial direct fed microbial and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science.* (81):1628-1640.

14- Beshay, B., 2003. Production of alkaline protease by Teredinobacter turnirae cells immobilized in Ca-alginate beads. *African Journal of Biotechnology*. 2. 3. 60 -65.

15- Bingham, A.K., T.D. Philips, and Bauer. 2003. Potential for dietary protection against the effects of aflatoxins in animals. *JAVMA*. 222:591-596.

16- Boutrif, E. 1998. Prevention of aflatoxin in pistachios. Fna/Ana 21,

17- Branen, L., Chang, B,. 1984. Effect of chemical compound on control of mycotoxin in food. *Journal of Food Protection*. 47, vol 8, page 637-642

18- Buchman N, Hald B. 1985. Analysis, occurrence and control of ochratoxin a residues in Danish pig kidneys. *Food Additives and Contaminants*. 2:193–199 .

19- Bullerman, L. 1984. Formation and control of Mycotoxin in food. *Journal of Food Protection*. 47(8): 637-642.

20- Chen, x ., Kelly , C .P. Saccharomyces spp. In Versalovic, J., Wilson, M. 2008. Therapeutic Microbiology: Probiotics and Realated Strategies. *American Society for Microbiology*. pp: 51-57.

21- Ciegler, A. Dimler, J., Beckwith, A. Vesonder, R. 2000. Effect of Biological treatment on aflatoxin B_1 Detection. *Journal of Agric. Food Chem.* 23 (2): 242–243.

22- Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E., and Hall, H. H.1996. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*. 14: 934–939.

23- Collado , M . C. and *et al*. 2007. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*. 40 (5): 629-636.

24- Cooney, D. O. 1980. Activated Charcoal: Antidotal and other medical uses, New York: Marecel Dekker. ISBN 0824769139.

Archive of SID

www.SID.ir

25- Devegowda, G., Arvind, B. R., Morton, M.G. 1996. Saccharomyces cerevisiae and mannanooligosacharides to counteract aflatoxicosis in broilers. Proc. Aust. Poul. Sci. Symp. Sydney. 8:103–106.

26- Doyle, M.P.1982. Physical, chemical and biological degradation of Mycotoxin in foods and agricultural commodities. *Journal of Foods Protection*. 45.

27- Dwarakanah, C.T., Rayner, E.T., Mann, G.E. and Dollear, F.G. (1968) Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 93.

28- Elmer, H., James, L. 2001. *Applied Dairy Microbiology*, 2nd Ed, Marcel Dekker, Inc, PP. 774.

29-El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J. 1997. Ability of dairy stains of lactic acid Bacteria to bind a common food Carcinogen, Aflatoxin B_1. *Food and Chemical Toxicology.* 36: 321-326.

30-El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998), Physico-chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Food Prot*. 61. 466-468.

31- El-Nezami, H., Mykkanen, H. & Haskard ,C. 2004. Lactic acid bacteria as a tool for enhancing food safety by removal of dietary toxins. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. 139: 397-406.

32- Fazeli, M., Hajmohammad A. M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M. R., Vaghari, E., Pouragahi, S. 2009. Aflatoxin B_1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of food protection*. 72 (1):189-192 (4).

33- Fiorillo, R.L. Effects of a lab-produced probiotic, a commercial probiotic, and a commercial prebiotic on broiler performance and fecal characteristics. MSc. Thesis (2002).

34- Fonty, G., and Ph. Gout. 1989. Establishment of microbial populations in the rumen. Utilization of an animal model to study the role of the different cellulolytic microorganisms *in vivo*. In: The role of protozoa and fungi in ruminant digestion. (Nolan, J. V., R. A. Leng and D. I. Demeyer, editors). Armidale NSW 2351, Australia: Penambul Books.

Archive of SID

www.SID.ir

35- Francis, A. R., Shetty, T. K., and Bhattacharya, R. K. 1988. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B_1, *in vitro* effect of trace elements. *Mutatation Research*. 199: 85–93.

36- Fuller, R. A review: 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*. 66: 365-378

37- Fung, A., Doyle, M.P. 1982. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxin in foods and agricultural commodities. *Journal of Foods Protection*. 45.

38- Garcia, A.R., E. Avila, R. R., and Peterson. V. M. 2003. Evaluation of two Mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Journal of Animal Science*. 47:691

39- Gazzar, F.E and Marth, E.H. 1988. Role of hydrogen peroxide in the prevention of growth and aflatoxin production by *aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*. 51: 4.

40- Gbassi, G.K., Vandamme T., Yolou, F.S., Marchioni, E. 2011. *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated Lactobacillus plantarum strains in a gastrointestinal tract model. *International Dairy Journal*, 21: 97-102.

41- Glab, J., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T. 2004. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mut. Res*. 559: 131-142.

42- Gratz, S. 2007. Aflatoxin Binding by probiotics:Experimental studies on Intestinal Aflatoxin Transport, Metabolism and Toxicology. Doctoral dissrtation ,School of public Health and Clinical Nutrition, Clinical Nutrition and Food and Health Research Centre,University of Kuopio.

43- Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, R. O., Mykkanen, H., and Turner , P.C. 2007. Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B_1 transport , metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 3958-3964.

44- Haskard, C., Binnion, Ch., Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*. 128: 39-49.

Archive of SID

www.SID.ir

45- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kakkaanpaa, P.E., Salminen, S., and Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B_1 by Lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*: 3086-3091.

46- Hassan, H.Z and Kawther, A. 2009. Effect of some Bacillus spp. isolates gathered from different locations on Aflatoxin B_1. *ARAB JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 12 (1): 109-120

47- Hidayat, H. K., Newbold, C. J., Stewart, C. S. 1993. The contribution of bacteria and protozoa to Ruminal forage fermentation in vitro as determined by microbial gas production. *Animal Feed Science and Technology*. 42: 193-208.

48- Hungate, R. E., G. D. Phillips, and A. McGregor. 1960; A comparison of the rumen fermentation in European and Zebu cattle. *Journal of Agriculture Science*. 54: 196-201.

49- Huwig, A., Freimund, S., Kapelli, O and Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett*. 122:179–188.

50- Khanafari, A., Marandi, R., Sanatei, S. 2008.Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and Microbial Methods. *Environ Health Science*. 5. 1. 19-24.

51- Khanafari, A., Soudi, H., Miraboulfathi, M. 2007. Biocontrol of *Aspergillus Flavus* and Aflatoxin B_1 production in corn. *Iran. J. Environ.Health.Sci.Eng*. 4.3. 163-168.

52- Jay, J.M. 1996. Modern Food Microbiology, 5th edition, New York, Chapman and Hall.

53- Klich, M.A., Thomas, S.H., Mellon, J.E., 1984. Field studies on the mode of entry of *Aspergilus flavus* in to cotton seeds. *Mycologia*. 76 (4): 665-669.

54- Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. 2004. Binding of Aflatoxin B_1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additive and contaminants*. 21 (2): 158-164.

55- Lee, Y.K., El-Nezami, H., Haskard, C.A., Gratz, S., Puong, K.Y., Salminen, S and Mykkanen, H. 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B_1 by viable and nonviable bacteria. *Journal of Food Protection*. 66: 426-430.

56- Lequin R (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51 (12): 2415–8.

57- Limin, K.J. 2001.Direct fed microbials for dairy cows and enzymes for lactating dairy cows: new theories and application. Newark, Delaware, USA.

Archive of SID

www.SID.ir

58- Line, J.E. and Brackett, R.E. 1995. Factor affecting aflatoxin B_1 removal by *Flavobacterium Aurantiacum*. *J. Food Prot*. 58. 91-94.

59- Madrigal-Santillan, E., Madrigal Bujaidar, E., Marquez-Marquez, R. and Reyes, A. 2006. Antigenotoxic effect of Saccharomyces cerevisiae on the damage produced in mice fed with aflatoxin B1 contaminated corn. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 2058-2063.

60- Mahesh, B. K. and Devegowda, G. 1996. Ability of aflatoxin binders to bind aflatoxin contaminated poultry feeds and liquid media in vitro. poster presented at the 12th Annual Symposium on Biotechnology in the feed industry, Lexington, Virginia.

61- Masimango, L.W. 2004. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M_1 in milk by sequestering agents of cows consuming Aflatoxin in feed. *Journal of Mycopathologia*. 157. 233-241.

62- Martin, A., Palomino, J.C. 2009. Nitrate Reductase Assay: Drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberclusis, Institute of Tropical Medicine, ycobacteriology Unit, Antwerp, Belgium.Procedure Manual,version 2

63- Masimango, N., Remacle, J., Ramaut, J.L. 1978. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B_1 from contaminated media. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 6 .1: 101-105.

64- Mohan, B., Kadirvel, R., Natarajan, A. and Bhaskaran. 1996. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *British Poultry Science*. 37: 395-401.

65-Mokarram, R.P., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi, M.B., Shahidi, F., 2009.The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*. 42:1040-1045.

66- Mulder, R.W.A.W., Havenaar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. 1997. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry.32 (5) 187-205.

67- Natarajan, K.R. 1975. Destruction of aflatoxin in peanut protein isolated by sodium hypochlorite. *Journal of the American oil chemistry society*. 52.

68- Natarajan, K.R. 2000. Destruction of aflatoxin in peanut protein isolated by sodium hypochlorite. *Journal of the American oil chemistry*. (52): 123-130.

Archive of SID

www.SID.ir

69- Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., and Ahokas, J. 1998. Ability of strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogenic, aflatoxin B_1. *Food and Chemical Toxicology.* 38: 321-326.

70- Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P. and Wallace, R. J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technolgy*. (114): 105-112.

71- Nocek, J. E., Kautz, W. P. 2002. Ruminal Supplementation of direct fed microbials on diurnal pH and in situ digestion in dairy cattle. *Journal of Animal Science*. 85:429-433.

72- Ortatatli, M. and Ogaz, H. 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res.Vet.sci*. 71:59-66.

73- Owino, J.H.O., Arotiba, O.A., Hendricks, N., Songa, E.A., Jahed, N., Waryo, T.T., Ngece, R.F., Baker, P.G.L., Iwuoha, E.I. 2008. Electrochemical Immunosensor Based on polythionine/Gold Nanoparticles for the Determination of Aflatoxin B_1. *Sensors.* 8: 8262-8274.

74- Peltonen, J., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. 2001. Aflatoxin B_1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 84. 2152-2156.

75- Phillips, T.D., Bashir Sarr, A., Grant, P.G. 1995. Selective chemisorptions and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Natural Toxins*. 3. 204-213.

76- Pitt, R.E. 1993. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *Journal of Food Protection.* 56. 139-146.

77- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcero, A.M. and Salvano, M.A. 2011. Binding of aflatoxin B_1 to lactic acid bacteria and saccharomyces cerevisiae in vitro: A useful model to determine the most efficient Microorganism, In Ramon G.Guevara-Gonzalez (Ed); Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology, (chapter 16), InTech press.

78- Polanski, A. J. O. L., Brekke, R. J., and Black, L. T. 1975 . High moisture corn-An extended preservation trial with ammonia. TRANSACTIONS of the ASAE. 21. 4. 773·-776.

Archive of SID

www.SID.ir

79- Rahaie, S., Razavi, S.H., and Emam Jomeh, Z. (2010). The ability of Saccharomyces cerevisiae strain in aflatoxin reduction in pistachio nuts. *Iranian Journal of Food Science and Technology (JFST)*. 7. 1. 81-88.

80- Rahnama Vosough, P., Mohamadi Sani, A., Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R. 2013. Assessing the ability of *Lactobacillus rhamnosus* GG to bind aflatoxin B_1 from ontaminated cottonseed. *BTAIJ*. 7. 1.

81- Rahnama Vosough, P., Mohamadi Sani, A., Mehraban, M. and Karazhyan, R. 2014. *In vitro* effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on reduction of aflatoxin B_1. *Nutrition & Food Science*. 44. 1. 32-40.

82- Rastogi, S.D., Wivedi, P.D., Khanna, S.K., Das, M. 2004. Detection of aflatoxin M_1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control.* 15. 287-290

83- Rezaeian, M. 1996. Assessment and distribution of anaerobic fungi in the ruminant gut. Ph.D. Thesis, University of Newcastle.

84- Romina, P., Pizzolitto, D. J., María, R., Armando, L. C., Dalcero A. M., and Mario A. S. 2003. Binding of Aflatoxin B_1 to Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae in vitro* :A Useful Model to Determine the Most Efficient Microorganism. *Journal of Food Protection*. 66. 3. 426- 430.

85- Russell. J.B. 1986. Ecology of rumen microorganism: Energy use, in: Aspect of digestive physiology in ruminants. (Dabson, A., and M. J. Dobson, eds.), Comstock publishing association, London.

86- Russell. J.B., H. J. Strovel, and Chen, G. 1988. Enrichment and isolation of a Ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied & Environmental Microbiology.* 54. 872-877.

87- Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Journal of Food Chmistry*. 23. 59- 57.

88- Sahebghalam, H., Mohamadi Sani, A. and Mehraban, M. 2013. Assessing the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to bind aflatoxin B_1 from contaminated medium. *Nutrition & Food Science*. 43. 4. 392-397.

Archive of SID

www.SID.ir

89-Sambrook, M., Fritsch, A., Maniatis, S. 1989. Molecular Coloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York, 2nd Ed, vol. 3.

90- Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O. 2004. Binding ability of aflatoxin M_1 to yoghurt Bacteria. *Ankara Univ vet Fat Derg*. 51. 195-198.

91- Shahani, A.A.M. 2007. Removal of Aflatoxin B_1 from contaminated feed by chemical compounds . *International Journal of Agriculture and Biology*. 1. 71-75.

92- Shahin, A.A.M. 2007.Removal of Aflatoxin B_1 from contaminated Liquid Media by Dairy Lactic acid Bacteria. *International Journal of Agriculture and Biology*. 1. 71-75.

93- Shetty, P.H. and Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*. 17. 48-55.

94- Shetty, P.H., Hald, B. and Jespersen, L. 2006. Surface binding of aflatoxin B_1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*. 113. 1. 41-46.

95- Sutic, M., and banina, A. 1990. Influence of aflatoxin B_1 on gas production by lactic acid bacteria. J. *environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 10:149-153.

96- Teniola, O. D., Addo, P.A., Brost, I. M., and Farber, P. 2005. Degradation of aflatoxin B_1 by cell extracts of Rhodococcus erythropolis and Mycobacterium fluoranthenivorans sp .Nov. DSM 44556. *International Journal of Food Microbiology*. 105. 111-117 .

97- Thyagaraja, N. and Hosono, A. (1994), Binding properties of lactic acid bacteria from ‘idly’towards foodborne mutagens. *Food Chem Toxicol*. 32. 805-809

98- Uraih, N. I., and Oluwafem, F. 2001. A Study on the impact of Aflatoxin on human reproduction. *African Journal of Reproductive Health*. 5. 1 106-110.

99- Vandegraft, I., Kabak, B., Gok, F. 2007. Detection of aflatoxin B_1 made by *Aspergillus Flavous & Aspergillus Parasiticus* in corn by Propionic acid. *Food Control*. 18. 59-62.

Archive of SID

www.SID.ir

100- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract:

Aflatoxins are secondary metabolites of molds that are grown in food products. Because of carcinogenic effect, today aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 are strictly controlled in the diet of lactating dairy cows as well as milk and dairy products. America Food and Drug Administration (FDA) have been set maximum permitted level of aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 in raw milk and feed 0.5 ppb, and 20 ppb respectively. While the Europe Union has been set maximum level of that toxin 0.5 ppb and 10 ppb.

In Iran considered regulations for maximum allowable amount for aflatoxin M_1 in difference dairy products. According that maximum allowable level of aflatoxin M_1 in milk is 0/5 ppb.

Since milk and milk products is introduced as one of the healthiest and most widely consumed food products for humans, especially children and the elderly, presence of aflatoxin M_1 in that products is dangerous for consuming. Use of physico-chemical methods for removal of mycotoxins from contaminated food are limited because of safety issues and potential problems related to loss of nutritional quality of the product, their high cost and low efficiency. According to some result tests it seems that microorganisms can be used for decomposition of mycotoxins.

In this study, Bacterial Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomycess cerevisiae* and detoxification and absorption of AflatoxinB_1 was evaluated. For this purpose, the various treatment of microorganism of interest (viable, autoclaved, boiled and acidified) in amount 10^8 CFU/ml was prepared and added to rumen medium. AflatoxinB_1 (0, 5, 10 and 20 ppb) also added and incubated at 37°C for 2 h. Remaining of AflatoxinB_1 in 1 and 2 hours in media was measured with ELISA europroxima kit. The results showed that autoclaved microorganisms have the maximum amount of toxin removal (82.6). Also *Saccharomycess cerevisiae* has more able to toxin adsorption compared with *Lactobacillus rhamnosus*. The results showed that toxin absorption increase about 78 percent with increasing incubation time. Ability of microorganism in toxin removal were increased when toxin concentration were incresed in rumen media. Result indicated that microorganism´s cell wall had the most toxin binder efficiency and non viable microorganisms were more able to bind toxin because of manno protein composition of yeast and protein and polysaccharide in bacteria cell wall that are effective in bindinf to Aflatoxin.

Key words: AflatoxinB_1, rumen medium, detoxification, lactic acid bacteria, yeasts

Archive of SID

www.SID.ir

IRAN REPUBLIC ISLAMIC
ACECR- Mashhad Branch

Final Report:

Evaluation effect of *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 and *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5177 on *invitro* aflatoxin B_1 detoxification.

Code: 2095-11

Funded by:

ACECR

Research group:

Food Quality and Safety Research Group
ACECR- Mashhad Branch

Principal investigator:

Reza Karazhyan
August 2014

Archive of SID

www.SID.ir