دانشکده مهندسی

گروه مهندسی شیمی

برهمکنش بین مخمرهای ساپروفیتی و قارچ آسپرژیلوس فلاووس در کنترل آلودگی میوه پسته به آفلاتوکسین

پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی

مریم السادات روحانی یزدی

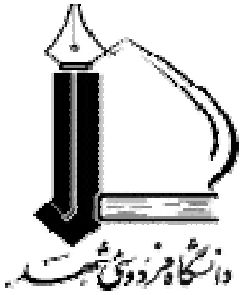
استاد راهنما ۱

جناب آقای دکتر محمد تقی حامد موسویان

استاد راهنما ۲

جناب آقای دکتر محمد مرادی

۱۳۹۱



دانشکده مهندسی

گروه مهندسی شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی(صنایع غذایی) مریم السادات روحانی یزدی

تحت عنوان

برهمکنش بین مخمرهای ساپروفیتی و قارچ آسپرژیلوس فلاووس در کنترل آلودگی میوه پسته به آفلاتوکسین

در تاریخ ۱۳۹۱/۰۷/۱۵ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای ۱ پایان نامه	جناب آقای دکتر محمد تقی حامد موسویان
۲- استاد راهنمای ۲ پایان نامه	جناب آقای دکتر محمد مرادی
۳- استاد داور خارجی	دکتر منصور مشرقی
۴- استاد داور داخلی و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر رضا قشلاقی

مدیر گروه مهندسی شیمی **دکتر مهدی پورافشاری چنار**

اینجانب مریم السادات روحانی یزدی دوره کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، نویسنده پایان نامه: برهمکنش بین مخمرهای ساپروفیتی و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی آلودگی میوه پسته به آفلاتوکسین تحت راهنمایی آقای دکتر محمد تقی حامد موسویان و آقای دکتر محمد مرادی متعهد می شوم:

- **تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.**
- **در استفاده از نتایج محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.**
- **مطالب مندرج درپایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.**
- **کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام دانشگاه فردوسی مشهد ویا Ferdowsi University of Mashhad به چاپ خواهد رسید.**
- **حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آوردن نتایج اصلی پایان نامه تاثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.**
- **در کلیه مراحل این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.**
- **در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.**

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر گردد.**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.**

متن این صفحه باید در ابتدای تمام نسخه های تکثیر شده وجود داشته باشد.

تاریخ

امضای دانشجو

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست مطالب	ج
فهرست اشکال	د
فهرست جداول	ذ
چکیده	۱
فصل اول: کلیات و بررسی منابع	۲
۱-۱- تعریف و تاریخچه مایکوتوکسین ها	۲
۱-۲- جنبه های اقتصادی مایکوتوکسین ها	۳
۱-۳- آسپرژیلوس	۴
۱-۴- تاریخچه کشف و شناسایی آفلاتوکسین	۶
۱-۵- عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین	۷
۱-۵-۱- خصوصیات قارچ	۷
۱-۵-۲- تاثیرگذاری سوبسترا روی تولید آفلاتوکسین	۸
۱-۵-۳- رطوبت محصول و رطوبت نسبی محیط	۹
۱-۵-۴- حرارت و زمان	۹
۱-۵-۵- مرحله رشد بذر	۱۰
۱-۵-۶- اکسیژن و دی اکسیدکربن	۱۰
۱-۵-۷- تداخل میکروبی	۱۱
۱-۶- روش های سنجش و اندازه گیری آفلاتوکسین	۱۲
۱-۶-۱- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)	۱۲
۱-۶-۲- کروماتوگرافی گازی (GC)	۱۳
۱-۶-۳- رادیو ایمونو اسی (RIA)	۱۳
۱-۶-۴- الایزا (ELISA)	۱۴
۱-۶-۵- کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC)	۱۴
۱-۷- کنترل آفلاتوکسین	۱۵
۱-۷-۱- روش های شیمیایی	۱۵
۱-۷-۲- روش های فیزیکی	۱۷
۱-۷-۳- روش های زراعی	۱۸
۱-۷-۴- روش های بیولوژیکی	۱۹
۱-۸- تاریخچه و اهمیت کنترل بیولوژیک	۲۳

۱-۹- ملاحظات اکولوژیکی در کنترل بیولوژیک ۲۴
۱-۱۰- کاربرد مخلوط آنتاگونیست ها ۲۵
۱-۱۱- تلفیق عوامل بیوکنترل با سموم شیمیایی ۲۵
۱-۱۲- تولید انبوه عوامل بیوکنترل ۲۶

فصل دوم : مواد و روش ها ۲۷
۲-۱- نمونه برداری ۲۷
۲-۲- جداسازی ۲۷
۲-۲-۱- جداسازی قارچ آسپرژیلوس فلاووس از خاک ۲۷
۲-۲-۲- جداسازی مخمر از خاک ۲۸
۲-۳- خالص سازی جدایه ها ۲۸
۲-۳-۱- خالص سازی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۲۸
۲-۳-۲- خالص سازی مخمر ۲۹
۲-۴- نگهداری جدایه ها ۲۹
۲-۴-۱- نگهداری قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۲۹
۲-۴-۲- نگهداری مخمر ۲۹
۲-۵- بررسی برهمکنش قارچ و آنتاگونیست ۲۹
۲-۵-۱- بررسی کشت متقابل مخمرهای آنتاگونیست بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۲۹
۲-۵-۲- بررسی تولید ترکیبات فرار مخمرهای آنتاگونیست بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۳۰
۲-۵-۳ کاربرد روش آمونیاک در بررسی قدرت جدایه ها در بازداری از تولید آفلاتوکسین ۳۰
۲-۵-۴- برهمکنش بر روی پوست سبز پسته ۳۱
۲-۵-۵- برهمکنش بر روی خاک باغ پسته ۳۳
۲-۵-۶- برهمکنش بر روی برگ درخت پسته ۳۴
۲-۶- بررسی تاثیر جدایه های مخمری در تولید آفلاتوکسین ۳۵

فصل سوم : بحث و نتیجه گیری ۳۷
۳-۱- جداسازی و شناسایی آسپرژیلوس فلاووس ۳۷
۳-۲- جداسازی مخمر ۳۹
۳-۳- بررسی نتایج آزمون های آنتاگونیستی ۳۹
۳-۳-۱- بررسی نتایج کشت متقابل مخمرهای آنتاگونیست بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۳۹
۳-۳-۲- بررسی نتایج تولید ترکیبات فرار مخمرهای آنتاگونیست بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۴۱
۳-۳-۳-بررسی نتایج آزمون آمونیاک جهت تشخیص قدرت جدایه های مخمری در بازداری از تولید آفلاتوکسین ۴۲

۳-۳-۴- بررسی نتایج برهمکنش بر روی پوست سبز پسته ۴۴
۳-۳-۵- بررسی نتایج برهمکنش بر روی خاک باغ پسته ۴۷
۳-۳-۶- بررسی نتایج برهمکنش بر روی برگ درخت پسته ۵۰
۳-۴- بررسی نتایج تاثیر جدایه های مخمری در تولید آفلاتوکسین ۵۳

فصل چهارم : جمع بندی **۵۵**
مراجع ۵۷

فهرست اشکال

شکل ۳-۱ : الف : رنگ کلنی قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت AFPA، ب : رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت PDA ۳۸

شکل ۳-۲ : الف : کنیدیوم های کروی، ب : سلول پایه، ج : وزیکل با دو ردیف استریگما ۳۸

شکل ۳-۳ : الف : شاهد رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط CA، ب : بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در کشت متقابل ۴۰

شکل ۳-۴ : الف : شاهد رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط CA، ب : بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در آزمون تولید ترکیبات فرار مخمر ۴۰

شکل ۳-۵ : درصد بازدارندگی مخمرها از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در آزمون کشت متقابل ۴۲

شکل۳-۶ : درصد بازدارندگی متابولیت فرار مخمرها در رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس ۴۲

شکل ۳-۷ : کاربرد روش آمونیاک جهت تشخیص قدرت جدایه های مخمری در بازداری از تولید آفلاتوکسین، الف : شاهد قارچ آسپرژیلوس فلاووس، ب : مخمر Y۴۳، ج : مخمر Y۴۱، ح : مخمر Y۳۹، خ : مخمر Y۱۰، د : مخمر Y ۹ ۴۳

شکل ۳-۸ : تاثیر مایه زنی پوست سبز پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه مخمری ۴۶

شکل ۳-۹ : تاثیر مایه زنی پوست سبز پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زاد مایه قارچی ۴۷

شکل ۳-۱۰ : تاثیر مایه زنی خاک باغ پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه مخمری ۴۹

شکل ۳-۱۱ : تاثیر مایه زنی پوست سبز پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه قارچی ۵۰

شکل ۳-۱۲ : تاثیر مایه زنی برگ درخت پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه مخمری ۵۲

شکل ۳-۱۳ : تاثیر مایه زنی برگ درخت پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه قارچی ۵۳

فهرست جداول

جدول ۲-۱ : شماتیک کلی از تیمارهای مورد استفاده و غلظت و حجم سوسپانسیون مخمر و قارچ استفاده شده در اسپری روی نمونه ها ۳۲

جدول ۳-۱ : جدایه های مخمری بر اساس زمان، منطقه جمع آوری و محل جداسازی ۳۹

جدول ۳-۲ : تاثیر مایه زنی پوست سبز پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه قارچی و مخمری ۴۵

جدول ۳-۳ : تاثیر مایه زنی خاک باغ پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه قارچی و مخمری ۴۸

جدول ۳-۴ : تاثیر مایه زنی برگ درخت پسته با جدایه های مخمری و قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی میزان زادمایه قارچی و مخمری ۵۱

جدول ۳-۵ : تاثیر جدایه های مخمری در بازدارندگی از تولید آفلاتوکسین ۵۴

چکیده

آلودگی میوه پسته به گونه های زهرابه زای آسپرژیلوس فلاووس یکی از معضلات جامعه بشری در امر سلامت و امنیت مواد غذایی انسان و دام می باشد. به منظور ارزیابی کنترل بیولوژیکی قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا ، طی تابستان سال ۱۳۹۰ از خاک سطحی مناطق مختلف استان کرمان و خراسان رضوی نمونه برداری صورت گرفت. در این بررسی از ۱۸۶ نمونه خاکی که کشت گردید، مجموعا ۶۰ جدایه مخمری جداسازی گردید و با توجه به نتایج حاصل از آزمون های کشت متقابل و ترکیبات فرار و غیرفرار، در نهایت پنج جدایه مخمری که دارای خاصیت آنتاگونیستی بیشتری بودند، انتخاب گردیدند. نتایج نشان دهنده توانایی بالقوه مخمرها در کاهش رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین توسط این قارچ بودند. به طوری که در بین پنج جدایه مخمری که خاصیت آنتاگونیستی بالاتری را داشتند، بعد از آزمون کشت متقابل مشخص گردید که جدایه Y۴۳ با ۵۷/۷۷ درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیشترین و جدایه Y۹ با ۳۸/۸۹ درصد کمترین بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را داشتند. در آزمون تولید ترشحات فرار توسط مخمر بر روی رشد قارچ، جدایه Y۴۱ با ۸۱/۱۱ درصد بازدارندگی بیشترین و جدایه Y۱۰ با ۵۶/۶۶ درصد کمترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشتند. همچنین در بررسی مخمرها در برهمکنش بر روی پوست سبز پسته جدایه Y۴۳ بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ و جدایه Y۱۰ کمترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشتند و در برهمکنش بر روی خاک باغ پسته مشخص گردید که جدایه Y۴۳ بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ و جدایه Y۹ کمترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشتند و در مرحله آزمون روی برگ درخت پسته مشخص گردید که جدایه Y۴۳ بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ و جدایه Y۱۰ کمترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشتند.

کلمات کلیدی:

آسپرژیلوس فلاووس، مخمر، آفلاتوکسین، کنترل بیولوژیک

فصل اول : کلیات و بررسی منابع

۱-۱- تعریف و تاریخچه مایکوتوکسین ها

واژه مایکوتوکسین[۱] از لغت یونانی مایک[۲] به معنی قارچ و توکسیکیوم[۳] به معنی سم گرفته شده است [۱, ۲]. مایکوتوکسین ها گروهی از ترکیبات سمی طبیعی هستند که توسط گونه های متعددی از قارچ ها تولید می گردند. علم مایکوتوکسیکولوژی با کشف آفلاتوکسین ها در سال ۱۹۶۰ در انگلستان توسعه شگرفی پیدا کرد و از آن زمان توجه و تحقیق روی مایکوتوکسین ها و بخصوص آفلاتوکسین ها بطور عموم گسترش یافت[۳, ۴] .

مردمی که غله آلوده به ارگوت[۴] ناشی از قارچ های *Claviceps fusiformis* و *Claviceps purpurea* را مصرف کرده بودند، مبتلا به این بیماری شدند [۵-۷].

در بین مایکوتوکسین ها، آفلاتوکسین ها جزء مهمترین سموم قارچی بوده که سرطان زایی آنها برای جوامع علمی به اثبات رسیده و در این زمینه گزارش های فراوانی منتشر گردیده است [۸]. به عنوان آخرین شاهد که در جهت ارتباط بین سموم قارچی و بیماری های انسانی وجود دارد، A.T.A[۵]می باشد. این مسمومیت را

---

[1]-Mycotoxin

[2]-Myke

[3]-Toxicum

[4]-Ergote

[5]- Alimentary toxin Aleukia

به نام های *Endemic panmyelo toxicusis* و *Septic agina* می نامند. علائم و نشانه های این بیماری در آمریکا چندین بار گزارش شده است [۹].

۱-۲- جنبه های اقتصادی مایکوتوکسین ها

سالانه ۱۸ درصد از محصولات کشاورزی به ارزش میلیاردها دلار دستخوش آلودگی عوامل بیماری زا قرار گرفته و نابود می شوند که بخش اعظمی از این خسارت مربوط به قارچ ها می شود. اینکه برآورد کنیم میزان زیان وارده به محصولات از طریق مایکوتوکسین ها تا چه حد است، کار عملی نیست ولی تسلسلی که از ضایعات در زنجیره اقتصادی یک کشور بوجود می آید، قابل پیشگیری است [۱۰]. این ضایعات به قرار زیر هستند:

- محصولات توکسین دار کیفیت مرغوبی نداشته و به قیمت نازلتری ارائه می شوند [۱۰].
- به جای استفاده از آنها در غذای انسان و دام، به عنوان کود یا سوخت به کار می روند [۱۰].
- حیوانی که از مواد آلوده و سم دار تغذیه می کند به عارضه مایکوتوکسیکوزیس دچار می شود که یا از بین رفته و یا از نظر اقتصادی بازده خوبی نخواهد داشت [۱۰].
- برای کاهش آلودگی های ناشی از مایکوتوکسین ها، تولیدکنندگان مجبور به صرف هزینه های اضافی بازدید، تجهیز آزمایشگاه های تجزیه مایکوتوکسین ها، خریداری ماشین آلات و تجهیز انبارهای خود، کاربرد سموم قارچ کش و احتمالا سمی هستند [۱۰].
- بازارهای فروش اعم از داخلی و خارجی تهدید می شوند [۱۱].
- هزینه های مربوط به نگهداری طولانی مدت و یا تمیز کردن محموله های بازگشتی از هزینه های اضافی است [۱۰].
- میزان ارزی که برای فروش فرآورده های صادراتی در نظر گرفته شده، چنانچه آلوده به مایکوتوکسین باشند به دفعات کاهش می یابد و این امر بخصوص برای کشورهایی که بنیان اقتصادی آنها بر صادرات کالاهای کشاورزی و حساس به آلودگی هاداستوار است، ضربه سنگینی خواهد بود [۱۰].
- هزینه های مربوط به آموزش و تربیت افراد در زمینه های مربوط به بررسی مایکوتوکسین ها نیز سرآمد دیگر هزینه ها است [۱۰].
- مصرف محصولات آلوده به طور مستقیم یا غیرمستقیم، حیات انسان و دام را به مخاطره می اندازد که آن هم هزینه هایی دربردارد [۳].
- کمبود ناشی از آلودگی ها، افزایش قیمت آن دسته از فرآورده ها را موجب می شود [۱۰].

۱-۳- آسپرژیلوس [۱]

جنس آسپرژیلوس، اولین بار توسط میشلی [۲] در سال ۱۷۲۹ توصیف شد [۱۲]. گرچه گونه های آسپرژیلوس به عنوان قارچ های انباری قلمداد میشوند، لیکن جدایه های آسپرژیلوس فلاووس قادر به تولید پکتیناز [۳] و کوتیناز [٤] نیز هستند [۳, ۱۳-۱۵]، بنابراین علاوه بر خاصیت پوده رستی، اندکی حالت تهاجمی دارند و قادرند در شرایط مناسب مزرعه، دانه های در حال رشد را نیز آلوده کرده و آفلاتوکسین تولید کنند. تنش وارده به گیاه بر اثر خشکی، حرارت موجود در مزرعه یا باغ یا عدم توازن مواد مغذی موجب آسیب پذیری گیاه در برابر آلودگی می شود [۱۶].

حشرات با فعالیت خود در میوه ها به خصوص میوه های زودرس (میوه هایی که پوسته سبز رویی آن ها زودتر از حد معمول شکاف می خورد) که منبع مناسب تری برای تغذیه و فعالیت آن ها هستند، علاوه بر استفاده از میوه شکاف خورده باعث پراکندگی بیشتر اسپور [۵] قارچ بر روی میوه های آسیب دیده می شوند و نهایتا منجر به افزایش آلودگی در باغ و مزرعه می گردند [۳, ۱۷]. تشکیل زهرابه های قارچی در زمان برداشت، تحت تاثیر عوامل زیست محیطی مانند دما، رطوبت ذخیره، سرعت خشک شدن، رطوبت محیط، صدمات مکانیکی به محصول و وسعت آلودگی محصول به مایه بیماری زا قرار دارد [۱۳].

تولید مثل غیرجنسی در این قارچ با رشد میسلیومی و تولید کنیدیوفور [۶] انجام می گیرد. کنیدیوفور غیر منشعب و در انتها کمی متورم است که وزیکول [۷] را تشکیل می دهد. کنیدیوم های بلاستیک فیالیدیک [۸] این قارچ گرد، تک سلولی و به شکل زنجیری روی سلول های اسپورزا (فیالیدها [۹]) قرار می گیرند. در محیط

---

[1]-Aspergillus

[2]- Micheli

[3]- Pectinase

[4]- Cutinase

[5]-Spore

[6]- Conidiophore

[7]- Vesicle

[8]- Blastic phialidic

[9]- Phialides

کشت مصنوعی و یا اندام آلوده مجموعه کنیدیوفورها و کنیدیوم های[1] این قارچ بسته به گونه های مختلف این جنس به رنگ سیاه، زرد و غیره ظاهر می شوند [۱۲]. برای حدود $\frac{1}{3}$ گونه های این جنس مرحله جنسی شناسایی شده است که بسته به گونه غیرجنسی، در جنس های مختلف قرار می گیرند. در مرحله جنسی، کلیستوتسیوم[2] بدون منفذ و زوائد خاص و دارای دیواره نازک به وجود می آید. آسک ها[3] کروی و بدون نظم خاصی در آسکوکارپ[4] پراکنده اند [۳]. از زمان میشلی تاکنون افراد مختلف بر اساس خصوصیات گوناگون طبقه بندی این جنس را بررسی کرده اند و بر اساس جمعیت زیاد این جنس و تنوع بسیار زیاد، خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنومی[5]، این جنس به چندین گونه و بخش تقسیم شده است، به طوریکه در آخرین طبقه بندی به هشت گونه و بیست و دو بخش تقسیم شده است. این طبقه بندی براساس روش های مولکولی، نوع متابولیت های ثانویه و خصوصیات مورفولوژیکی انجام شده است [۳].

بر اساس مطالعات انجام شده چندین گروه در جنس آسپرژیلوس تعیین شده است که گروه فلاوی[6] در بین آنها از نظر تاثیر منفی که بر روی سلامت و اقتصاد محصولات کشاورزی می گذارد، حائز اهمیت می باشد [۱۸]. بر اساس بررسی های مولکولی و خصوصیات مورفولوژیکی همانند رنگ پرگنه، گونه های بخش فلاوی شامل *A.flavus*، *A.oryzae*، *A.sojae*، *A.tamari*، *A.parasiticus*، *A.bombycus*، *A.pseudotamarii*، *A.nomius*، *A.minisclerotigenus* و *A.arachidicolas* می باشند . *A. oryzae* و *A. sojae* از گذشته های دور در تولید غذاهای تخمیری درجنوب شرقی آسیا مورد استفاده قرار گرفته اند و در مقابل *A. flavus* و *A. parasiticus* با ترکیبات سرطان زا مواد غذایی را آلوده می کنند [۱۹-۲۱] و نیز از نظر مورفولوژیکی شبیه *A.flavus* است ولی مانند *A.Parasiticus* آفلاتوکسین B و G تولید می کند که در حال حاضر تعداد گزارش ها در مورد آلودگی منابع غذایی با این قارچ بسیار محدود است [۱۸]. با آنالیز ژن های مسئول متابولیتهای اولیه در استرین های *A.sojae* و *A.oryzae* مشخص شدکه *A. sojae* استرین اهلی شده *A. parasiticus* و

---

[1]- Conidium

[2]- Klystvtsyvm

[3]- Ascus

[4]-Ascocarpe

[5]-Genomics

[6]-Flavi

A. oryzae استرین اهلی شده *A. flavus* هستند [۲۲]. گونه *A. flavus* شایع ترین گونه تولید کننده آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی، از جمله پسته است و همچنین یک بیمارگر فرصت طلب انسانی و حیوانی در همه نقاط جهان محسوب می شود [۲۳].

۱-٤- تاریخچه کشف و شناسایی آفلاتوکسین

آفلاتوکسین ها یک گروه از توکسین های ساختاری می باشند که جزء متابولیت های ثانویه قارچی به شمار می روند به وسیله قارچ هایی چون آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس[۱]، آسپرژیلوس نومیوس [۲] تولید می شوند [۲۴].

واژه آفلاتوکسین[۳] از آسپرژیلوس فلاووس توکسین[۴] گرفته شده است. در سال ۱۹۶۰ متجاوز از صدهزار بوقلمون در مزارع ماکیان جنوب و شرق انگلستان در اثر ابتلا به عارضه ای نامعلوم از بین رفتند. مطالعات بعدی نشان داد که این مشکل تنها به بوقلمون ها محدود نمی شود، بلکه جوجه اردک ها و جوجه قرقاول ها هم تحت تاثیر این بیماری قرار گرفته و حساسیت بسیار نشان دادند. در همین ایام نیز در آمریکا شیوع یک ناراحتی کبدی در ماهی قزل آلا گزارش گردید [۱].

بلافاصله پس از این حوادث آزمایشگاه های متعددی در آمریکا و انگلستان بسیج شدند تا این عارضه را پیگیری و علت اصلی آن را مشخص کنند. علایم این عارضه در پرندگان عبارت بودند از بی اشتهایی، خواب آلودگی، ضعیف شدن بال ها، قوسی شدن گردن، تمایل گردن و پاها به عقب و مرگ پرنده در فاصله حداکثر یک هفته در ابتدا به علت مرگ و میر این حیوانات را مربوط به عوامل ویروسی می دانستند ولی با مطالعه این مرگ و میرها هیچ عامل ویروسی، باکتریایی و یا میکروارگانیسم جدید ردیابی نشد. سرانجام محققین متوجه احتمال وجود مواد سمی در ماده غذایی مصرف شده شدند [۱]. پیگیری موضوع نشان داد که محموله ای از بادام زمینی که مورد مصرف بوقلمون ها قرار گرفته بود کاملا آلوده و برای ماکیان سمی بوده و به وجود آورنده علایم یاد شده بودند [۱].

---

[1]-Aspergillus Parasitiscus

[2]- Aspergillus Nomius

[3]-Aflatoxin

[4]-Aspergillus Flavus toxin

درمیان مایکوتوکسین ها، آفلاتوکسین ها مهمترین آنها هستند و بیماری های ناشی از تغذیه مواد آلوده به آفلاتوکسین، خطرات قابل ملاحضه ای را برای انسان، دام و طیور به همراه دارد. آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس دو گونه مهم تولیدکننده آفلاتوکسین در بین گونه های مختلف آسپرژیلوس ها هستند [۲۵].

۱-۵- عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین

۱-۵-۱- خصوصیات قارچ

از قارچ های گروه آسپرژیلوس دو گونه *A.flavus* و *A.parasiticus* تولید کننده توکسین و *A.oryzae* و *A.tamarii* و *A.Sojae* بدون توکسین اند. پتانسیل دو گونه توکسی ژنتیک فوق در تولید آفلاتوکسین بستگی به بستر رشد و محیط غذایی آنها دارد [۲۶, ۲۷]. از یک مجموعه ای از قارچ های این گروه که ۴۳ سویه آسپرژیلوس مشکوک به تولید آفلاتوکسین بودند، توسط محققین موسسه محصولات گرمسیری لندن هفتاد و پنج درصد آنها تولید کننده آفلاتوکسین شناخته شدند. آنچه همگی بر آن متفق القولند اینست که بادام زمینی حساس ترین میزبان قارچ بوده و چنانچه در زراعت این گیاه تناوب رعایت نشود، آلودگی به حد اعلای خود می رسد. حال آنکه زراعت بادام زمینی بعد از چاودار، جو دوسر، خربزه و سیب زمینی آلودگی های بعدی کمتری را همراه داشته است. خلاصه ای از جدول اطلاعاتی تحقیقات انجام شده در شش کشور نشان می دهد که از ۱۳۹۰ جدایه گروه *A.flavus*، ۸۰۳ یا معادل ۶۰ درصد آنها تولیدکننده آفلاتوکسین هستند. از این اطلاعات چنین نتیجه می شود که سویه های توکسی ژنتیک قارچ در میکوفلور هوا، خاک، بذر و علوفه در سراسر دنیا پراکنده اند [۲۸].

جدایه های *A.flavus* از نظر تولید آفلاتوکسین و کمیت این تولید کاملا متفاوت هستند.آفلاتوکسین تولید شده توسط یک سویه حتی روی دو محیط مختلف غذایی هم متفاوت است. همچنین مقدار آفلاتوکسین ترشح شده توسط سویه های قارچ که از محیط های مختلف طبیعی جدا شده اند، تفاوت دارند [۲۸].

انتقال مکرر قارچ به محیط کشت های مصنوعی موجب کاهش قدرت تولید آفلاتوکسین در آن خواهد شد، حال آنکه استفاده از محیط غذایی طبیعی به این موضوع کمک کرده و درصد تولید آفلاتوکسین را بالا می برد. بعضی مواقع استفاده از محیط غذایی طبیعی به این موضوع کمک کرده و درصد تولید آفلاتوکسین را بالا می برد. بعضی مواقع استفاده از پاره ای مواد شیمیایی مانند یون های باریم تحریک کننده قارچ در تولید آفلاتوکسین بشمار می رود. در مورد ترکیبات مشتق آفلاتوکسین نیز تغییرات متعددی وجود دارد. بعضی از

سویه ها قادر به تولید آفلاتوکسین های گروه B، بعضی دیگر گروه G و پاره ای تولید کننده هر دو نوع آفلاتوکسین B و G هستند [۲۸].

۱-۵-۲- تاثیرگذاری سوبسترا روی تولید آفلاتوکسین

برای تهیه آفلاتوکسین به مقدار زیاد، محیط های غذایی متعددی در سطح آزمایشگاه بکار رفته است. در آزمایش هایی که بر اساس استفاده از محیط های غذایی مصنوعی بود، محصول آفلاتوکسین بدست آمده خیلی کم گزارش شده است، به همین دلیل محیط های غذایی مناسبترین محیط برای این منظور شناخته شده اند [۱۷, ۲۸]. عملا این محیط ها را در شرایط مرطوب استریل کرده، مایه زنی و برای مدت ۱۴-۵ روز در ۳۰-۲۵ درجه انکوبه می کنند [۲۸].

بررسی های متعددی در زمینه انتخاب بهترین محیط غذایی طبیعی برای این منظور بعمل آمده و در این راستا مواد مختلفی چون بادام زمینی،گندم، ذرت، چاودار، برنج، سویا و پنبه دانه چه به صورت دانه کامل و چه به صورت خرد و ریز شده بکار رفته اند [۲۸].

در این میان ذرت،گندم و برنج مهمترین محیط ها تعیین و معرفی شدند. بررسی ها همچنین نشان داد که با افزایش درجه حرارت، تولید آفلاتوکسین پایین می آید. در مواردی که از دانه هایی که پوست شاخی دارند مانند پسته، بادام زمینی و تا حدودی پنبه دانه استفاده می شود. چنانچه پوست سخت خارجی جدا شده و مغز دانه برای این منظور بکار برده می شود، محصول آفلاتوکسین به مراتب بیشتر خواهد بود. این موضوع با تحقیقاتی که به عمل آمده به اثبات رسید و مقدار آفلاتوکسین در مغز دانه ها ۳۰-۱۰ برابر آفلاتوکسین تولید شده در پوست سخت خارجی آنهاست [۲۸].

تا بحال به ثبوت رسیده که *A.flavus* توانایی تولید آفلاتوکسین روی تعداد زیادی از مواد غذایی از جمله پنیر، شکر کنسانتره، فندق، بادام برزیلی، گردو، بذر خشخاش، نارگیل، آب سیب، فرآورده های سیب زمینی، گوشت خوک، نخود خشک، لوبیا، عدس، آلو، سیب، انجیر و حتی فلفل قرمز دارد. تولید آفلاتوکسین به مقدار کم روی سویا گزارش شده است. در گیاهان علوفه ای چون شبدر قرمز، جو و یونجه آفلاتوکسین ردیابی نشده است [۳].

۱-۵-۳- رطوبت محصول و رطوبت نسبی محیط

این موضوع کاملا مورد قبول دانشمندان است که تولید آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس بستگی کامل به رطوبت فرآورده و رطوبت نسبی محیط دارد. آسپرژیلوس فلاووس را در شمار قارچ های رطوبت دوست قلمداد کرده اند زیرا برای رشد خود نیاز به حداقل ۹۰-۸۰ درصد رطوبت نسبی محیط دارد. حال آنکه برای جوانه زدن اسپور رطوبت ۸۰ درصد نیاز است. این موضوع نشانگر این است که شرایط رشد قارچ در یک دامنه وسیع یا گسترده ای است. البته نیاز رطوبتی این قارچ بستگی به درجه حرارت و موادغذایی دارد. وقتی که با خشک شدن دانه ها، رطوبت آنها سریعا تنزل می کند، روند تولید آفلاتوکسین و فعالیت قارچ هم کاهش می یابد. به محض فراهم شدن شرایط محیط و بالا رفتن رطوبت مجددا فعالیت قارچ و تولید آفلاتوکسین آغاز می شود [۲۸].

رطوبت نسبی ۸۵ درصد در ۳۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۱ روز شرط محدودکننده تولید آفلاتوکسین در مغز بادام زمینی اعم از سالم ویا شکسته به شمار می رود. یانگ و همکاران ثابت کردند که آفلاتوکسین در ظرف مدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۲ درجه سانتی گراد در دانه هایی که ذخیره رطوبتی آنها بین ۱۵ تا ۳۰ درصد بود، تشکیل می شود. در دانه هایی که رطوبت بین ۲۰ تا ۳۰ درصد دارند در حرارت ۲۱ درجه سانتی گراد آفلاتوکسین از ۹۶ ساعت ایجاد می گردد. وی نشان داد که در دانه های بادام زمینی خشک که رطوبت آنها به ۱۵ درصد می رسد در حرارت ۳۱ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی محیط ۵۰ درصد آفلاتوکسین تشکیل نشد حال آنکه در همین شرایط و رطوبت نسبی ۸۵ درصد در اغلب نمونه ها آفلاتوکسین B1 ردیابی شد[۲۸].

۱-۵-٤- حرارت و زمان

گونه قارچ آسپرژیلوس فلاووس رطوبت دوست و متوسط درجه حرارتی که برای رشد آن ایده آل است، ۳۵-۲۴ درجه سانتی گراد می باشد [۲۸, ۲۹]. حداقل و حداکثر این حرارت ۸-۶ و ۴۶-۴۴ درجه سانتی گراد تعیین شده است. این حداقل و حداکثر درجه حرارت تحت تاثیر رطوبت، تراکم اکسیژن و استحصال موادغذایی متغییر است [۲۸].

در مورد *A.parasitscus* حداکثر مقدار آفلاتوکسین B1 در ۳۵-۳۰ درجه و حداکثر آفلاتوکسین G1 در ۳۰-۲۵ درجه به دست آمد .بالاترین درجه حرارت که بازدارنده تولید آفلاتوکسین است، حدود ۴۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید [۲۸].

دیکن و همکاران نشان دادند که در مدت ۱۰ روز تولید آفلاتوکسین در نمونه های بادام زمینی که ۳۰-۱۵ درصد رطوبت داشته و در درجه حرارت ۳۲ درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند، رو به افزایش گذاشت اما در همین دانه ها در درجه حرارت ۲۱ درجه مقدار کمی آفلاتوکسین تولید گردید. آنها همچنین ثابت کردند که حداقل زمان لازم برای تشکیل آفلاتوکسین در این شرایط ۶۰ ساعت بود. محققین دیگری این حداقل زمان را تا ۴۸ ساعت گزارش کردند [۲۸].

نسبت آفلاتوکسین های B و G تولید شده بستگی به ترکیب محیط غذایی دارد. دیویس و همکاران نشان دادند که غلظت پایین قند سوکروز و عصاره مخمر منتج به تشکیل آفلاتوکسین B1 کمتر از G1 می گردد، حال آنکه در غلظت بالای این مواد (سوکروز و عصاره ۳۰ درصد و عصاره مخمر ۳ درصد) مقدار B1 بر G2 افزایش می یابد اما به هرحال درجه حرارت برای تولید آفلاتوکسین B1، ۲۴ درجه سانتی گراد و برای G1، 30 درجه سانتی گراد می باشد [۲۸].

۱-۵-۵- مرحله رشد بذر

این موضوع در موارد متعدد به اثبات رسیده که آمادگی دانه در بادام زمینی کاملا رسیده به قارچ آسپرژیلوس فلاووس به مراتب بیشتر از نمونه های نارس و تازه برداشت شده، است. بطوریکه در بعضی موارد برداشت زودتر بادام زمینی را توصیه کرده و نتایج عاری بودن آنها را از آفلاتوکسین و آلودگی به قارچ آسپرژیلوس فلاووس ضمانت کرده اند. بدیهی است چنانچه زمان برداشت با یک بارندگی مصادف باشد، آلودگی به قارچ وتوکسین بالا می رود. علت آمادگی برای پذیرش قارچ در دانه های کامل بخاطر کاهش فعالیت های فیزیولوژیکی دانه در آن حد رشدی گیاه است [۲۸].

۱-۵-٦- اکسیژن و دی اکسیدکربن

رشد قارچ های انباری روی موادغذایی و محیط های طبیعی نه تنها به وجود رطوبت و حرارت مساعد بستگی دارد، بلکه به شرایط جوی محیط اطراف و در واقع میکروکلیمای حاکم بر ماده غذایی وابسته است.گرچه قارچ ها در شمار موجودات هوازی قلمداد می شوند اما حداقل اکسیژن مورد نیاز برای رشد، جوانه زدن و بازدهی کاملا متغییر است. تحمل این موجودات به غلظت گاز دی اکسیدکربن که دامنه نوسانی زیادی دارد نیز به همین صورت است. در یک بررسی همه جانبه روی اثر اکسیژن و دی اکسیدکربن و ازت در رشد، اسپورزایی و تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس فلاووس ،التم و همکاران نشان دادند که در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۹ درصد پس از دو هفته چنانچه میزان دی اکسیدکربن از ۲۰

درصد به ۳۰ درصد افزایش می یافت، هرچند که تغییر محسوسی در رشد قارچ مشهود نبود اما میزان تولید آفلاتوکسین تا ۷۵ درصد تنزل پیدا می کرد. با بالا رفتن این درصد،کم کم رشد قارچ هم متوقف و در محیط ۱۰۰ درصد اشباع با دی اکسیدکربن هیچ رشدی از قارچ مشاهده نشد. بطور کلی این نکته لازم به ذکر است که کاهش تراکم اکسیژن با کاهش میزان آفلاتوکسین همراه است. در نمونه های بادام زمینی که به مدت شش هفته در درجه حرارت ۱۵ درجه سانتی گراد و غلظت ۲۰ درصد از دی اکسیدکربن نگهداری شده بودند، میزان آفلاتوکسین حاصله بسیار پایین بود و وقتی که در همین شرایط اما با دی اکسیدکربن در غلظت ۴۰ درصد و اکسیژن ۵ درصد آزمایش انجام گرفت، هیچ آفلاتوکسین قابل ردیابی تشکیل نگردید[۲۸].

۱-۵-۷- تداخل میکروبی

در دانه ها و موادغذایی انبار قارچ آسپرژیلوس فلاووس اکثر اوقات همراه با تعداد دیگری از میکروارگانیسم ها، محدودیتی در فعالیت آسپرژیلوس فلاووس به وجود آمده و در نتیجه مقدار آفلاتوکسین هم کاهش یافته است. در این راستا احتمال اینکه خود قارچ یا قارچ های رقیب دیگر، آفلاتوکسین تولید شده روی مواد غذایی را جذب و تجزیه کنند، خیلی زیاد است؛ این نکته بخصوص وقتی مصداق پیدا می کند که می بینیم مقدار آفلاتوکسین در دانه های آفت زده معمولا کمتر از مقدار آن در دانه های شکسته است [۲۸].

لاتر و همکاران نشان دادند که تعدادی از قارچ ها قادرند ملکول های آفلاتوکسین موجود در دانه های بادام زمینی و یا محیط کشت مایع حاوی آفلاتوکسین را شکسته و تجزیه کنند. آنها همچنین به این نکته پی بردند که قارچ های *A.niger* و *Rhizoctonia solani* رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین را در محیط غذایی محدود می کنند [۲۸].

تاکنون حدود هزار میکروارگانیسم از گروه های مخمر، قارچ های کپکی، باکتری، اکتینومیست و اسپور قارچ، به منظور مطالعه توانایی آنها در تجزیه آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفته اند. در جمع این میکروارگانیسم ها تنها باکتری (*Flavobacterium auranticum* NRRLB-184) قادر بود که آفلاتوکسین B1 را از محیط بزداید. در بررسی های به عمل آمده روشن شد که این باکتری دارای قدرت توکسین زایی بوده و قادر است شیر، روغن ذرت، بادام زمینی و سویای آلوده به آفلاتوکسین را کاملا از توکسین بزداید. این محققین گزارش کردند که سلول های باکتری مذکور که در غلظت کم، کم خطرتر از