

Inhibitory Effect of a Soil Isolate of *Bacillus amyloliquefaciens* on Aflatoxin B₁ Production by *Aspergillus parasiticus* in Laboratory Conditions

Fatemeh Siahmoshteh¹, Zohreh Hamidi-Esfahani², Mehdi Razzaghi-Abyaneh^{3*}

1- Ph.D. Candidate, Department of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1316943551, Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: mrab442@yahoo.com

Received: 05/Sep/2016, Accepted: 05/Feb/2017

Abstract

Objective: The concern about the presence of aflatoxin and its risk for human and animal health has resulted in the introduction of different methods to eliminate or reduce this toxin. One of these methods is biological control of the fungus by other microorganisms.

Methods: We isolated a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* from the soil of a pistachio orchard, Damghan, Iran. This strain was applied as a biological control to examine the inhibition of growth and toxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL2999. After 72 hours of incubation of the bacterium at 30°C, we separated the supernatant as a potential source for antifungal compounds. Different doses of the supernatant were co-cultured with the fungus suspension in glucose yeast extract broth (GYB) at 28°C for 4 days. After the incubation period, we measured the inhibition of fungal growth by dry weight assessment of the fungal mass. We performed qualitative and quantitative assessment to determine the amount of aflatoxin B₁ by TLC and HPLC, respectively.

Results: Increased bacterial culture supernatant as the antagonist in fungal growth medium resulted in decreased fungal growth. AFB₁ production was 2.35 ppm in control samples, whereas the amount considerably decreased in samples treated by the bacterial supernatants. The toxin reduction was dose-dependent.

Conclusion: The results of this study have shown that this bacterial strain, by taking into consideration its native origin, can be used as a biological control against aflatoxigenic fungi.

Keywords: Biological control, Aflatoxin B₁, *Aspergillus parasiticus*, *Bacillus amyloliquefaciens*

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.3, Pages: 33-44

تأثیر مهاری یک سویه باسیلوس آمیلولیکوفاسینس جدا شده از خاک بر تولید آفلاتوکسین B₁ به وسیله قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه سیاه مشته^۱، زهره حمیدی اصفهانی^۲، مهدی رزاقی ایبانه^{۳*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، بخش قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، بخش قارچ شناسی

Email: mrab442@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۱۷

دریافت مقاله: ۹۵/۰۶/۱۵

چکیده

هدف: نگرانی از وجود آفلاتوکسین در مواد غذایی و خطراتی که این سم برای سلامت انسان و حیوانات دارد، باعث پیدایش راه‌های مختلف حذف یا کاهش این سم شده است؛ از جمله این روش‌ها، کنترل زیستی قارچ توسط ریزنده‌های دیگر است. در این تحقیق از باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس جدا شده از خاک باغ پسته از باغات شهرستان دامغان به عنوان عامل کنترل زیستی برای مهار رشد و تولید آفلاتوکسین قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس استاندارد NRRL2999 استفاده شد.

مواد و روش‌ها: پس از ۷۲ ساعت کشت باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، مایع‌رویی آن به‌عنوان منبع ترکیبات ضد قارچی جداسازی شد. غلظت‌های مختلف از مایع‌رویی در مجاورت سوسپانسیون قارچی در محیط کشت GYB به‌مدت چهار روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت میزان مهار رشد قارچ به روش محاسبه وزن خشک توده قارچی محاسبه شد. میزان آفلاتوکسین B₁ نمونه‌ها نیز به روش کروماتوگرافی لایه نازک و HPLC سنجش کیفی و کمی شد.

نتایج: بر اساس نتایج، با افزایش میزان مایع‌رویی کشت باکتری به‌عنوان ماده آنتاگونیست در محیط رشد قارچ، کاهش بیشتری برای رشد قارچ مشاهده شد. آفلاتوکسین B₁ تولیدی در نمونه‌های کنترل به حدود ۲/۳۵ ppm رسید که این میزان در نمونه‌های تیمار شده با مایع‌رویی باکتری به شدت کاهش پیدا کرده بود. میزان این کاهش نیز وابسته به غلظت مایع‌رویی بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به دست‌آوردهای این تحقیق و با توجه به بومی بودن سویه باکتریایی مورد نظر، می‌توان از این سویه به‌عنوان عامل کنترل زیستی قارچ‌های مولد آفلاتوکسین استفاده کرد.

کلیدواژگان: کنترل زیستی، آفلاتوکسین B₁، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، باسیلوس آمیلولیکوفاسینس

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحات: ۳۳-۴۴

مقدمه

آفاتوکسین‌ها (Aflatoxins) خانواده‌ای از توکسین‌ها است که متابولیت ثانویه کپک‌های خانواده آسپرژیلوس (*Aspergillus*) و قوی‌ترین مایکوتوکسین شناخته شده است. ترکیبات آفاتوکسین‌ها بی‌بو، بی‌طعم و بی‌رنگ هستند و ساختار شیمیایی نسبتاً مشابهی دارند. وجود این ترکیبات در سال ۱۹۶۰ با تلف شدن صد هزار بوقلمون در انگلستان که از خوراک حاوی بادام زمینی وارد شده از آفریقا و آمریکای جنوبی مصرف کرده بودند، محرز شد. از این خوراک مسموم، کپک آسپرژیلوس فلاوس (*Aspergillus flavus*) جدا شد و سم تولید شده این کپک، آفاتوکسین نام گرفت [۱].

وجود این سم در مواد غذایی مختلف مانند خشکبار (بادام زمینی، پسته، گردو، فندق، بادام و انجیر خشک شده)، غلات، حبوبات، لبنیات و گوشت به اثبات رسیده است. مصرف این سم عوارض بسیاری به همراه دارد که مهم‌ترین آن، ایجاد سرطان کبد است.

این ترکیبات توسط برخی از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*A. parasiticus*)، آسپرژیلوس نومیوس (*A. nomius*)، و آسپرژیلوس اکراسوروسئوس (*A. ochraceoroseus*) تولید می‌شوند. از بین سویه‌های تولیدکننده آفاتوکسین، آسپرژیلوس پارازیتیکوس که قادر به تولید هر چهار نوع آفاتوکسین B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 است، به‌عنوان استاندارد سویه‌های توکسین‌زا تلقی می‌شود [۱، ۲].

از بین بردن آلودگی آفاتوکسینی در مرحله پس از برداشت تاکنون به شیوه‌ها و روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی یا زیستی از جمله غیر فعال‌سازی فیزیکی یا شیمیایی آفاتوکسین‌ها انجام گرفته است. محدودیت‌های روش‌های غیرزیستی منجر به استفاده از روش‌های زیستی شامل به‌کارگیری ریززنده‌ها و عصاره‌جات گیاهی در کنترل سموم قارچی شده است. در سال‌های اخیر، باکتری‌های

کنترل تولید آفاتوکسین B1

مختلفی به‌عنوان عامل کنترل زیستی گزارش شده‌اند که گونه‌های مختلف جنس‌های باسیلوس (*Bacillus*) و سودوموناس (*Pseudomonas*) از مهم‌ترین آن‌ها به‌شمار می‌روند.

سایر گونه‌های باکتریایی مورد استفاده عبارتند از گونه‌های مختلف جنس‌های مایکوباکتریوم (*Mycobacterium*)، رودوکوکوس (*Rhodococcus*)، کورینه باکتریوم (*Corynebacterium*)، لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) و بیفیدوباکتریوم (*Bifidobacterium*) [۳، ۴].

تحقیقات زیادی روی خصوصیات زیستی گونه‌های جنس باسیلوس خصوصاً باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) انجام شده است زیرا خصوصیات مورد نیاز برای یک عامل کنترل زیستی که شامل غیربیماری‌زا بودن، مقاوم بودن و پایداری ژنتیکی است را دارا هستند [۵-۸]. باسیلوس‌ها قادر به تولید ترکیباتی از جنس لپوپروتئین شامل ایتورین (*Iturin*) و فنجیسین (*Fengycin*) هستند که این ترکیبات خاصیت ضد قارچی دارند [۹]. همچنین این باکتری‌ها آنزیم‌های ترشحی مانند کیتیناز (*Chitinases*) و گلوکاناز (*Glucanase*) را تولید می‌کنند که توانایی تجزیه اجزای دیواره سلولی قارچ را دارد.

در زمینه سم‌زدایی، تحقیقاتی روی کاهش آفاتوکسین قارچ‌های مولد سم انجام گرفته که نشان داده است باسیلوس‌ها توانایی تولید ترکیباتی را دارند که قادر به تجزیه سم تولید شده است. فرزانه و همکاران میزان کاهش آفاتوکسین B_1 در محیط مایع به‌وسیله مایع‌رویی کشت باسیلوس سوبتیلیس را بررسی کرده‌اند که بیشترین میزان تجزیه سم در مدت زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد [۴]. لی (Lee) و کیم (Kim) نیز تولید ترکیبات ضدقارچی توسط سویه‌ای از باسیلوس سوبتیلیس را در شرایط کشت مختلف مطالعه نمودند. طبق نتایج آن‌ها، از بین چندین محیط انتخابی مختلف برای کشت باکتری، مایع‌رویی برداشت شده از محیط LB (Luria-) باکتری

(Bertani Broth) و (Trypticase Soy Broth) TSB بیشترین خاصیت ضد قارچی را علیه طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا نشان دادند [۱۰].

در این تحقیق، از سویه‌ای از باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس (*B. amyloliquefaciens*) استفاده شد. از مزایای این سویه بومی بودن آن و جداسازی آن از باغات پسته یعنی محل اصلی حضور قارچ‌های خانواده اسپریلوس بود. فعالیت ضد قارچی این سویه علیه کپک مولد سم اسپریلوس پارازیتیکوس سویه NRRL2999 بررسی شد و پس از اثبات آنتاگونیست بودن آن، اثر مایع‌رویی بر کاهش آفلاتوکسین B₁ که خطرناک‌ترین آفلاتوکسین تولیدی به‌وسیله قارچ اسپریلوس پارازیتیکوس است، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌ها و شرایط کشت

سویه باکتریایی که در مطالعه قبلی از خاک باغات پسته شهرستان دامغان جداسازی شده بود، در بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران نگهداری می‌شد. سویه مورد مطالعه پس از استخراج DNA و با بررسی مولکولی و شناسایی توالی، باسیلوس آمیلولیکوفاسینس تشخیص داده شد. استخراج DNA به کمک کیت استخراج شرکت Qiagen (آمریکا) انجام شد. برای تکثیر ژن 16srRNA فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد که در آن از آغازگر عمومی (Universal primer) مخصوص باکتری‌ها استفاده شد. تأیید تکثیر ژن در فرآیند PCR به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. غلظت DNA به کمک نانودراپ (Nanodrop) بررسی و پس از رقیق‌سازی برای توالی‌یابی ارسال شد. پس از تعیین توالی، توالی مذکور در سایت NCBI جستجو شد و نزدیک‌ترین گونه با احتمال ۹۹ درصد شناسایی شد [۱۱].

پس از خروج از فریزر، باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس

به محیط غنی‌کننده مانند BHI (Brain Heart Infusion broth) اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و روی همزن مغناطیسی با دور ۱۲۰ قرار گرفت. پس از آن میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از هر کشت در سه تکرار به ارلن حاوی محیط کشت LB اضافه شد. ارلن‌های حاوی محیط کشت باکتری در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. پس از این مدت سانتریفوژ محیط انجام و مایع‌رویی جدا شد و سپس برای حذف کامل سلول‌های باکتریایی عمل صاف کردن با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرونی انجام گرفت [۹].

برای تهیه سوسپانسیون اسپوری قارچ از محلول ۰/۱ درصد توپین ۸۰ (Tween 80) استفاده شد و شمارش میزان اسپور موجود در سوسپانسیون نیز به کمک لام نئوبار (Neubauer) انجام شد.

بررسی مهار رشد قارچ به روش محاسبه وزن خشک

در این روش از پلیت‌های شش خانه حاوی محیط GYB (Glucose Yeast Extract Broth) استفاده شد که به آن میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت ۱۰^۷ اسپور در میلی‌لیتر اضافه شد. مایع‌رویی تولیدی حاصل از کشت باکتری در نسبت‌های مختلف به محیط رشد قارچ اضافه شد و به بقیه حجم چاهک (حجم نهایی هر چاهک ۵ میلی‌لیتر)، محیط کشت GYB اضافه شد. برای جبران کاهش محیط GYB مورد نیاز رشد قارچ در هر چاهک، با محاسبه میزان کمبود این محیط میزان مناسب پودر گلوکز (۲ درصد وزنی/حجمی) و عصاره مخمر (۰/۵ درصد وزنی/حجمی) پس از سترون‌سازی با فیلتر سرنگی به‌صورت مخلوط با محیط به چاهک‌های دیگر اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت چهار روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از گذشت این مدت توده میسلیمی رشد کرده از سطح هر چاهک تیمار

کنترل تولید آفلاتوکسین B1

خط صاف، ده میکرولیتر از نمونه‌های عصاره‌گیری شده لکه‌گذاری شد. فاصله هر نمونه لکه‌گذاری شده از نمونه بعدی، یک سانتی‌متر بود. درون تانک به نسبت ۹/۸ به ۰/۲ کلروفرم/متانول ریخته شد. پلیت به آرامی درون تانک قرار داده شد. با قرار گرفتن پلیت در تانک، حلال از پلیت بالا می‌رود. پس از این که حلال به اندازه کافی مسافت پلیت را طی کرد، از تانک خارج و در هوای آزاد قرار داده شد تا حلال آن تبخیر شود. سپس پلیت در اتاقک با نور فرابنفش در طول موج ۳۶۰ نانومتر قرار گرفت و باندهای آفلاتوکسین نمونه‌ها شامل آفلاتوکسین گروه G و آفلاتوکسین گروه B مشاهده شد.

برای اندازه‌گیری کمی آفلاتوکسین، از دستگاه HPLC مدل KNAUER کشور آلمان با آشکارساز فرابنفش استفاده شد. پس از شستشوی دستگاه و تنظیم آن روی طول موج ۳۶۵ نانومتر، استاندارد آفلاتوکسین B₁ در رقت‌های مختلف و ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه توسط سرنگ مخصوص دستگاه به مخزن دستگاه تزریق شد. بخش متحرک شامل مخلوطی از سه حلال آب/استونیتریل و متانول با نسبت‌های حجمی ۱۵/۲۵/۶۰ با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون دستگاه (Cosmosil 5-ph-AR-300 Waters; 4.6 mm₁₅₀) عبور کرد. زمان بقا (Retention Time) برای آفلاتوکسین B₁ حدود ۱۰/۶ دقیقه بود. از روی صفحه نمایش، نقاط اوج (Peaks) ایجاد شده، مشاهده و تصاویر با فرمت JPEG ذخیره شد. غلظت آفلاتوکسین نمونه‌ها با توجه به منحنی استاندارد به دست آمد [۷].

تحلیل آماری

کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام و نتایج به صورت انحراف استاندارد $\pm$ متوسط بیان شد. مقایسه میانگین داده‌ها به وسیله آزمون LSD انجام شد. از نرم‌افزارهای SPSS و Excel برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها استفاده شد.

شده با مایع‌رویی و چاهک کنترل جمع‌آوری و در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت خشک شد. سپس هر یک از نمونه‌ها (میسلیوم خشک قارچ) توزین شد و میزان کاهش وزن آن‌ها نسبت به نمونه حاصل از چاهک کنترل به عنوان میزان مهار رشد در نظر گرفته شد [۱۲].

بررسی مهار تولید آفلاتوکسین توسط قارچ در مجاورت آنتاگونیست

پس از جدا کردن میسلیوم حاصل از آزمایش مهار رشد، یک میلی‌لیتر از مایع باقی‌مانده از کشت در هر چاهک به وسیله یک میلی‌لیتر کلروفرم استخراج شد. پس از چندین بار ورتکس کردن (Vortex) مایع زیری حاصل از دو بخش که حاوی کلروفرم و آفلاتوکسین است، خارج شد و به بخش بالایی مجدداً کلروفرم اضافه شد. عمل استخراج تا سه بار تکرار شد. سپس بخش‌های کلروفرمی یکی شد و برای حذف ناخالصی‌ها از پشم شیشه عبور داده شد. سپس ظرف‌های نمونه‌ها تا خشک شدن کامل در دمای اتاق و دور از نور شدید قرار گرفت. پس از آن به هر ظرف میزان ۱۵۰ میکرولیتر متانول اضافه شد تا آفلاتوکسین استخراج شده در آن حل شود. میزان آفلاتوکسین B₁ استخراجی به کمک کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography: TLC) و دستگاه HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) به ترتیب به طور کیفی و کمی ارزیابی شد.

سنجش آفلاتوکسین B₁ به کمک TLC و HPLC

پس از استخراج آفلاتوکسین، سنجش اولیه آن توسط TLC صورت گرفت. این آزمون با استفاده از پلیت سیلیکاژل 60F₂₅₄، تانک TLC مدل CAMAG و حلال‌های کلروفرم و متانول انجام گرفت. ابتدا با فاصله دو سانتی‌متری از پایین پلیت، روی یک

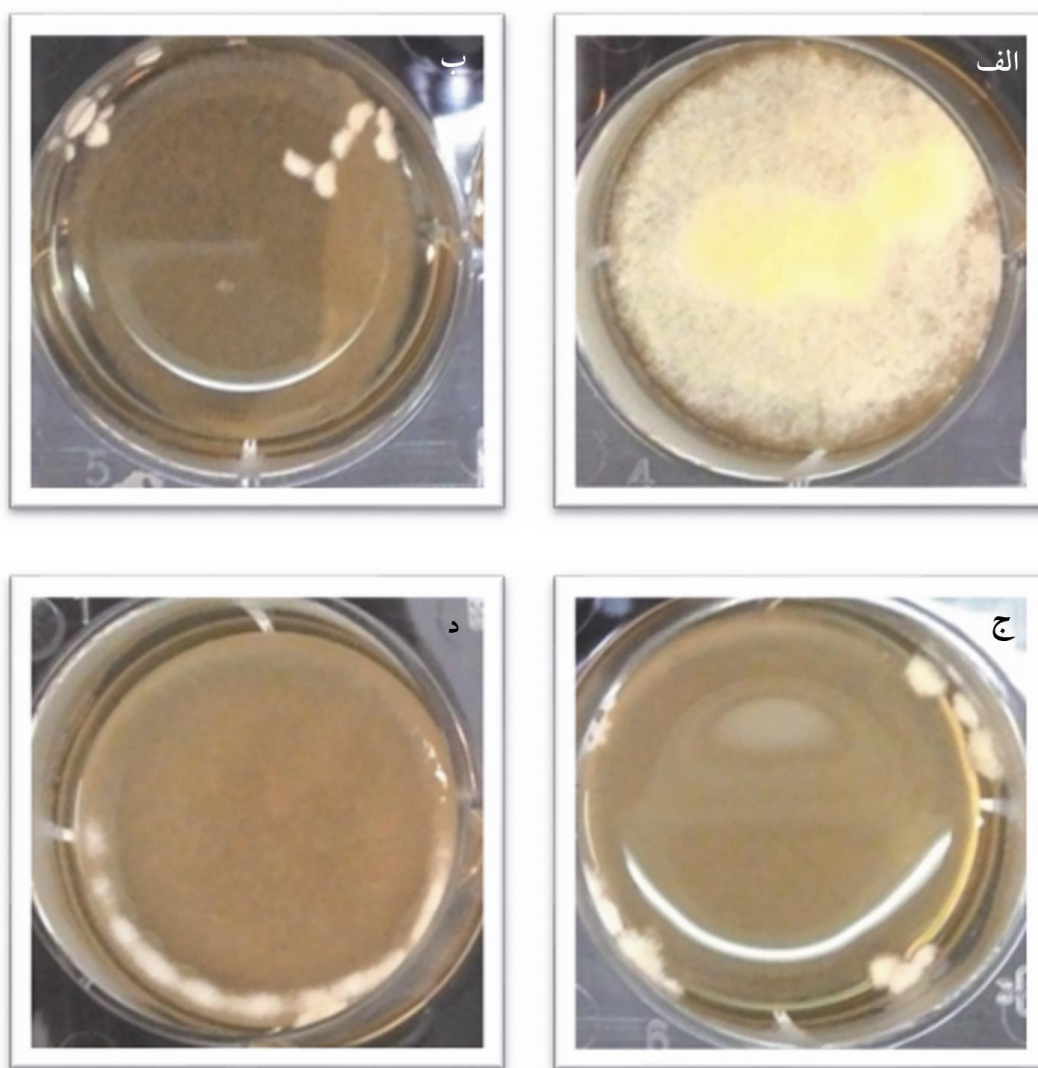
نتایج

بررسی مهار رشد قارچ به روش محاسبه وزن خشک

مهار رشد قارچ به وسیله مایع رویی کشت ۴ روزه باکتری‌ها در محیط GYB بررسی شد. در شکل ۱ پلیت شش خانه پس از چهار روز نگهداری در شرایط آزمایش نشان داده

شده است.

با توجه به نتایج محاسبه شده از آزمون وزن خشک توده قارچی، مهار رشد قارچ وابسته به میزان مایع آنتاگونیست بود به طوری که با افزایش مقدار آن، میزان مهار رشد قارچ افزایش پیدا کرد. مهار رشد برای باسیلوس آمیلولیکوفاسینس از ۴۵ تا ۸۲ درصد متغیر بود.



شکل ۱ بازداري رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس توسط مایع رویی باسیلوس آمیلولیکوفاسینس. چاهک کنترل (الف)، چاهک تیمار شده با ۳۰۰۰ میکرولیتر مایع رویی باکتری (ب)، چاهک تیمار شده با ۱۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی باکتری (ج) و چاهک تیمار شده با ۷۵۰ میکرولیتر مایع رویی باکتری (د)

کنترل تولید آفاتوکسین B1

حاصل از تزریق استاندارد آفاتوکسین B₁ به دستگاه HPLC را نشان می‌دهد. در جدول ۲ میزان آفاتوکسین هر یک از تیمارها مشخص شده است.

در آزمایش حاضر در محیط مایع کشت قارچ حاوی مایع‌رویی حاصل از رشد باکتری، میزان آفاتوکسین نمونه‌های تیمار شده به نسبت کنترل کاهش پیدا کرده بود. شکل ۴ درصد کاهش آفاتوکسین برای هر نمونه را نشان می‌دهد. میزان درصد کاهش آفاتوکسین توسط تیمارها بیشتر از میزان کاهش رشد قارچ (جدول ۲) است که نشان‌دهنده مکانیسم دیگری در کاهش آفاتوکسین علاوه بر کاهش رشد قارچ است.

بررسی مهار تولید آفاتوکسین توسط قارچ در مجاورت آنتاگونیست

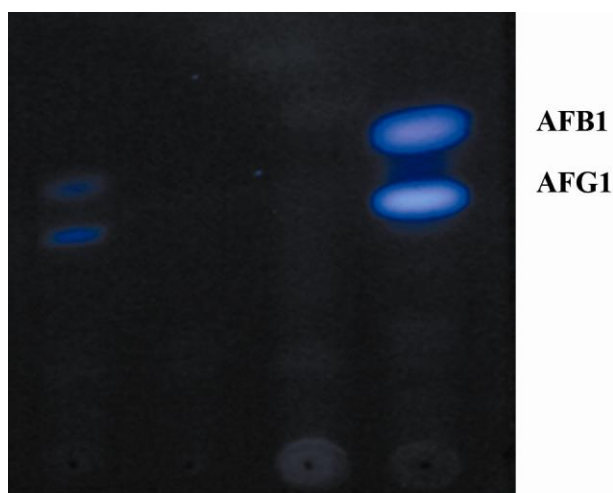
نتایج حاصل از TLC نمونه‌ها در شکل ۲ نمایش داده شده است. همان‌طور که از شکل پیداست، نمونه‌های کنترل به نسبت نمونه‌های تیمار شده با مایع‌رویی دو باند قوی را نشان می‌دهند که باند بالایی نشان‌دهنده آفاتوکسین‌های گروه G و باند پایین نشان‌دهنده آفاتوکسین‌های گروه B است.

میزان سی میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های حل شده در متانول به دستگاه HPLC تزریق شد تا میزان کمی کاهش آفاتوکسین هر نمونه هم بررسی شود. شکل ۳ کروماتوگرام

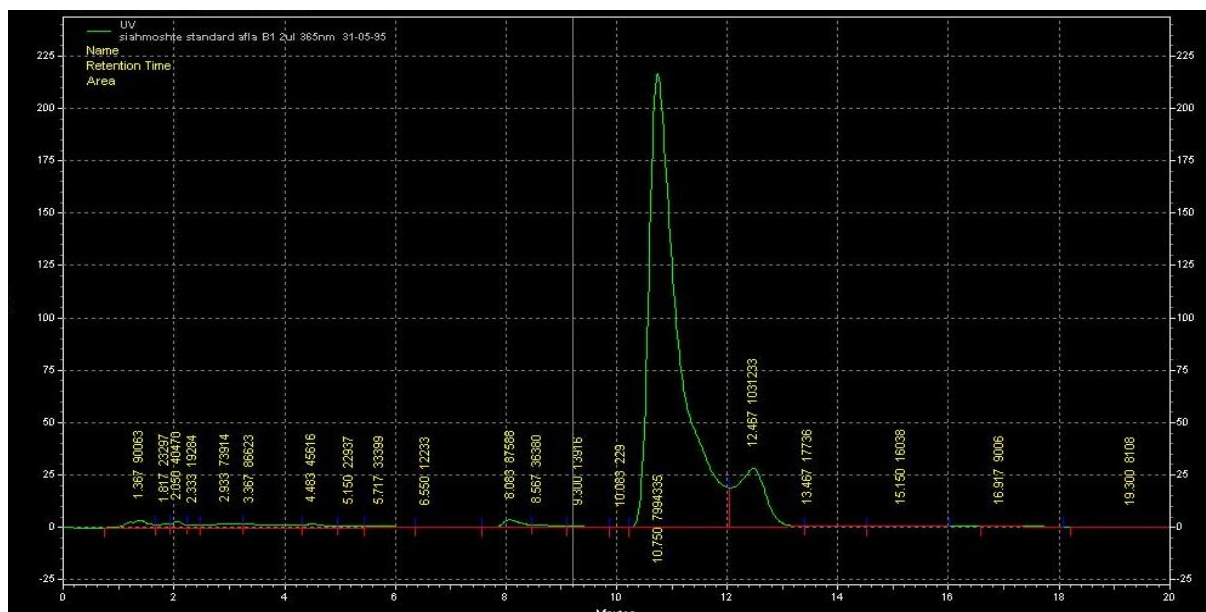
جدول ۱ بازداری رشد اسپرژیلوس پارازیتیکوس توسط مایع‌رویی باکتری در غلظت‌های مختلف

مایع‌رویی (میکرولیتر)	مهار رشد (درصد)	وزن خشک (میلی‌گرم)
۰	۰	۲۷/۵±۱/۰
۷۵۰	۴۵	۱۵/۰±۱/۱*
۱۵۰۰	۵۶	۱۲/۰±۲/۰*
۳۰۰۰	۸۲	۵/۰±۱/۰*

*اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ با نمونه کنترل



شکل ۲ باندهای آفاتوکسین حاصل از نمونه‌ها در زیر نور فرابنفش (از راست به چپ به ترتیب نمونه کنترل، نمونه تیمار شده با میزان ۳۰۰۰ میکرولیتر مایع‌رویی باکتری، نمونه تیمار شده با ۱۵۰۰ میکرولیتر مایع‌رویی باکتری و نمونه تیمار شده با غلظت ۷۵۰ میکرولیتر مایع‌رویی)

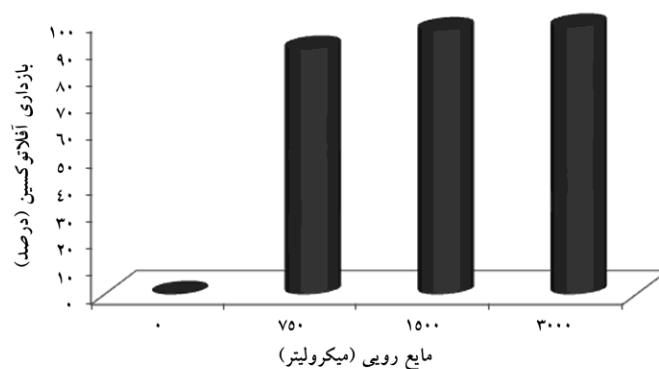


شکل ۳ کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد آفلاتوکسین B₁ به دستگاه HPLC

جدول ۲ میزان آفلاتوکسین B₁ در نمونه‌های تیمار شده با مایع‌رویی باکتری

میزان آفلاتوکسین تولیدی (نانوگرم/میلی گرم وزن خشک قارچ)	میزان آفلاتوکسین تولیدی در محیط (نانوگرم)	مایع‌رویی باکتری (میکرولیتر)
۲/۳۵±۰/۷۵	۶۵/۲۶±۲۰/۶۴	۰
۰/۲۴±۰/۱۲*	۳/۶۵±۱/۷۸*	۷۵۰
۰/۰۸±۰/۰۵*	۱/۰۰±۰/۵۵*	۱۵۰۰
۰/۰۵±۰/۰۳*	۰/۲۳±۰/۱۴*	۳۰۰۰

* اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ با نمونه کنترل



شکل ۴ درصد مهار تولید آفلاتوکسین B₁ با مایع‌رویی باکتری در غلظت‌های مختلف

بحث

باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس از جمله گونه‌های شناخته شده باکتریایی است که همانند سایر گونه‌های جنس باسیلوس طیف وسیعی از متابولیت‌ها با کاربرد گسترده را تولید می‌کند؛ به طوری که بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های تولیدی توسط گونه‌های مختلف این جنس به عنوان داروهای شناخته شده و به عنوان نگهدارنده‌های مواد غذایی استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر ترکیبات ضد قارچی ترشح شده به وسیله باکتری بر قارچ توکسین‌زای اسپرژیلوس پارازیتیکوس و جلوگیری از تولید سم آن است. طبق نتایج این تحقیق، غلظت‌های مختلف مایع‌رویی باکتری قادر به کاهش رشد قارچ مولد سم و نیز جلوگیری از تولید سم آن بود. با توجه به نتایج، با افزایش میزان مایع‌رویی کشت باکتری به عنوان ماده آنتاگونیست، میزان بازداری رشد قارچ افزایش یافت و تا ۸۲ درصد برای میزان ۳۰۰۰ میکرولیتر آنتاگونیست رسید. در مورد بازداری تولید سم نیز همین پدیده قابل مشاهده است. در واقع این پدیده، پدیده وابسته به غلظت (Dose dependent) نامیده می‌شود.

بازداری مایع کشت این باکتری برای تولید آفلاتوکسین بسیار چشمگیر بود و در هر سه میزان آن باعث کاهش تولید آفلاتوکسین تا بیش از ۹۰ درصد شده بود. تحقیق مشابهی با سویه باسیلوس سوبتیلیس برای بازداری رشد و آفلاتوکسین تولیدی توسط قارچ اسپرژیلوس پارازیتیکوس صورت گرفته است [۱۳]. طبق نتایج حاصل از تحقیق اشاره شده، بیش از ۹۵ درصد بازداری رشد و تا ۶۰ درصد کاهش آفلاتوکسین تولیدی قارچ در مواجهه با مایع‌رویی حاصل از کشت باکتری مشاهده شد. بر این اساس باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس توانایی بیشتری در مهار تولید آفلاتوکسین به نسبت باسیلوس سوبتیلیس داشته است.

تحقیقات مختلفی مکانیسم اثر آنتاگونیستی باکتری‌های جنس باسیلوس را بررسی کرده‌اند. باسیلوس آمیلولیکوفاسینس از گونه‌های این جنس است که دامنه

کنترل تولید آفلاتوکسین B1

وسییی از متابولیت‌های ضد باکتریایی و ضدقارچی تولید می‌کند. این باکتری قادر به تولید اندوسپورهایی (Endospore) است که به استرس‌های شیمیایی و فیزیکی مقاومت بالایی نشان می‌دهد. این خصوصیات و نیز توانایی زندگی در خاک، باعث شده که این باکتری یکی از عوامل مؤثر در کنترل زیستی به شمار رود [۱۴]. با شناسایی متابولیت‌های ضد قارچی این جنس مشخص شد که بیشتر این ترکیبات از خانواده لیپوپروتئین‌ها است. از این ترکیبات می‌توان ایتورین، فنجیسین و سرفکتین (Surfactin) را نام برد که می‌توانند روی کشت سطحی غشای سلول قارچ تأثیر گذاشته و باعث ایجاد منافذی در سطح غشا شوند که کار ورود و خروج مواد حیاتی سلول را دچار اختلال کرده است و تنظیمات غشا به هم می‌ریزد و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود [۱۵، ۱۶]. از دیگر آثار مواد آنتاگونیست تولیدی توسط باکتری، اثر بر سنتز ارگوسترول (Ergosterol) غشای سلول است. ارگوسترول از اجزای مهم غشای سلولی قارچ است. این امر باعث آسیب‌پذیری غشا و کاهش مقاومت آن می‌شود [۱۷].

علاوه بر اثر بر غشای سلول، ترکیبات ضد قارچی روی دیواره سلول قارچ نیز اثر گذار هستند. مشخص شده که باسیلوس‌ها قابلیت تولید آنزیم‌های تجزیه کننده مختلف از قبیل پروتئازها، کیتیناز و گلوکاناز را دارند. تعدادی از این ترکیبات ضد قارچی نیز روی سنتز اجزای دیواره سلول اثرگذار هستند. به طور مثال داروهای ضدقارچی از خانواده پپتیدیل نوکلئوزیدها مانند نیکومایسین (Nikkomycin Z) بازدارنده‌های ساخت کیتین است و داروهای خانواده اکیونکاندین (Echinocandin) مانند کسپوفانجین (Caspofungin) از ساخت بتاگلوکان دیواره جلوگیری می‌کند [۱۸].

اکیونکاندین‌ها از ترکیبات جدید ضدقارچی است و FKs1 که زیرواحد آنزیم بتا ۱ و ۳-گلوکان سنتتاز است را مورد هدف قرار می‌دهد [۱۹].

به طور کلی از دلایل کاهش سم نمونه‌های تیمارشده

بازداری رشد قارچ بوده است به این معنی که قارچ کمتری و در نتیجه سم کمتری تولید شده است. دلیل دیگر حضور متابولیت‌های مختلف حاصل از رشد باکتری در مایع‌روبی است. تعدادی از این متابولیت‌ها از خانواده اتیل استات و پروپیونات‌ها (Propionates) هستند. این ترکیبات توانایی مهار دسته ژن‌های مسیر تولید آفلاتوکسین یا پیش‌سازهای آن را دارند. بنابراین تولید آفلاتوکسین در ابتدای راه مهار شده است. توجه دیگر برای کاهش آفلاتوکسین نمونه‌ها تولید ترکیبات ترش‌حی تجزیه‌کننده سم توسط باکتری است. مهم‌ترین آنزیم تجزیه‌کننده سم آفلاتوکسین لاکاز (Aflatoxin laccase) است که جز خانواده اکسیدازهاست. این سم قادر به بازکردن حلقه لاکتونی موجود در ساختمان آفلاتوکسین است [۲۰]. بسیاری از سویه‌های جنس باسیلوس قادر به تولید این آنزیم هستند و معمولاً این آنزیم در مرحله اسپوری باکتری تولید می‌شود [۲۱].

قارچ‌های اصلی تولید کننده سم آفلاتوکسین در مزارع و باغ‌های کشاورزی، شامل آسپرژیلوس فلاوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس است. باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس مورد استفاده در این تحقیق نیز از خاک باغ پسته یعنی محل حضور

آسپرژیلوس‌های آفلاتوکسین‌زا، جداسازی شده بود. توانایی سازگاری با شرایط محل زندگی قارچ بیماری‌زا از جمله مهم‌ترین خصوصیات بک عامل کنترل زیستی است که باکتری حاضر دارای این خصوصیت است. این باکتری همچنین همانند سایر سویه‌های جنس باسیلوس، دارای سرعت رشد بالا و تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی است که آن را مستعد به‌کارگیری به‌عنوان عامل کنترل زیستی می‌نماید [۹].

با توجه به دست آوردهای این تحقیق و با توجه به بومی بودن سویه مورد نظر و جداسدن آن از مزارع خشکبار، می‌توان از این سویه به‌عنوان عامل کنترل زیستی قارچ‌های مولد آفلاتوکسین بهره برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس است و بدین وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه به‌دلیل حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- [1] Sforza S, Dall'asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25(1): 54-76.
- [2] Abyaneh M. Aflatoxins—Recent Advances and Future Prospects. 1st ed. Rijeka: InTech, 2013; p: 23.
- [3] Dini A, Khazaeli P, Roohbakhsh A, Madadlou A, Poureanmdari M, Setoodeh L, Askarian A, Doraki N, Farrokhi H, Moradi H, Khodadadi E. Aflatoxin contamination level in Iran's pistachio nut during years 2009–2011. *Food Control* 2013; 30(2): 540-4.
- [4] Farzaneh M, Shi Z-Q, Ghassempour A, Sedaghat N, Ahmadzadeh M, Mirabolfathy M, Javan-Nikkhah M. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control* 2012; 23(1): 100-6.
- [5] Akpa E, Jacques P, Wathelet B, Paquot M, Fuchs R, Budzikiewicz H, Thonart P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2001; 91-93: 551-61.

- [6] Obagwu J, Korsten L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology* 2003; 28(1): 187-94.
- [7] Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Jaimand K, Alinezhad S, Saberi R, Yoshinari T. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* 2009; 20(11): 1018-24.
- [8] Reddy KRN, Raghavender CR, Reddy BN, Salleh B. Biological control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B₁ production in sorghum grains. *Afr J Biotechnol* 2010; 9(27): 4247-50.
- [9] Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guirio A, Thonart P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* 2004; 96(5): 1151-60.
- [10] Lee HA, Kim JH. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains with Antifungal Activities from Meju. *Prev Nutr Food Sci* 2012; 17(1): 64-70.
- [11] Kalantari S, Jamali M, Tolouei R, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Asgharzadeh A, Asmar M, Aslani M, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production by antagonistic bacteria isolated from soils of pistachio orchards. *International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits. Acta Hortic* 2012; 963: 19-22.
- [12] Razzaghi-Abyaneh M, Yoshinari T, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Nagasawa H, Sakuda S. Dillapiol and Apiol as specific inhibitors of the biosynthesis of aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(9): 2329-32.
- [13] Siahmoshteh F, Hamidi-Esfahani Z, Razzaghi-Abyaneh M. Antifungal activity, biodegradation and production inhibition of aflatoxins b1 and g1 by a soil isolate of *Bacillus subtilis* against *Aspergillus parasiticus*. *J Pure Appl Microbiol* 2016;10(4): 2541-49.
- [14] Huang J, Wei Z, Tan S, Mei X, Shen Q, Xu Y. Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62. *J Agric Food Chem* 2014; 62(44): 10708-16.
- [15] Gordillo MA, Navarro AR, Benitez LM, Torres de Plaza MI, Maldonado MC. Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp strain IBA 33. *Microbiology Insights* 2009; 2: 15-24.
- [16] Thimon L, Peyoux F, Maget-Dana R, Michel G. Surface-active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69(1): 92-3.
- [17] Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 501-17.
- [18] Fortwendel JR, Juvvadi PR, Pinchai N, Perfect BZ, Alspaugh JA, Perfect JR, Steinbach WJ. Differential effects of inhibiting chitin and 1,3- β -D-glucan synthesis in ras and calcineurin mutants of *Aspergillus fumigatus*.

- Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2): 476-82.
- [19] Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NA, Munro CA. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(1): 208-17.
- [20] Eshelli M, Harvey L, Edrada-Ebel R, McNeil B. Metabolomics of the bio-degradation process of aflatoxin B1 by actinomycetes at an initial pH of 6.0. Toxins (Basel) 2015; 7(2): 439-56.
- [21] Lončar N, Božić N, Lopez-Santin J, Vujčić Z. *Bacillus amyloliquefaciens* laccase--from soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolorization. Bioresour Technol 2013; 147: 177-83.