ارزیابی تاثیر مهار کننده باسیلوس لیکنی‌فورمیس بر آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2 در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی کیلکا

مهرداد ولی‌پورمری[۱]، ابراهیم علیزاده‌دوغیکلایی*[۲]، رضا صفری[۳] و علی ارشدی[۴]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران

[۲]استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران

[۳]مربی پژوهشی پژوهشکده‌ی اکولوژی دریای خزر، ایران

[۴] مربی دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۱، تاریخ تصویب: ۱۳۸۹/۱۲/۲۰)

چکیده

هدف این مطالعه بررسی تاثیر مهارکننده *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* روی آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2 در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی کیلکا است. از دو غلظت آفلاتوکسین (۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای G_1 و G_2) و (۲ و ۴ میلی‌لیتر از استاندارد آفلاتوکسین به ۵۰ گرم از آرد ماهی) به ترتیب در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی کیلکا استفاده گردید. دوز مورد استفاده *باسیلوس لیکنی فورمیس* نیز دو غلظت ۳ و ۴ درصد بوده است. میزان تغییرات باسیلوس و آفلاتوکسین به ترتیب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (جذب نوری با طول موج ۶۰۰ نانومتر) و HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که به هنگام استفاده از دوز ۳ درصد *باسیلوس لیکنی‌فورمیس*، میزان کاهش معنی‌دار ($p<$ ۰/۰۵) G_1 با غلظت‌های ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۹۹/۹ و ۹۹/۴ درصد و G_2 با غلظت ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۹۹/۲ و ۹۸/۲ درصد و میزان کاهش معنی‌دار ($p<$ ۰/۰۵) آفلاتوکسین در دوز ۴ درصد *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد برای G_1 با غلظت‌های ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ و ۹۹/۶ درصد برای G_2 با غلظت ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوده است. در آرد ماهی، میزان کاهش آفلاتوکسین برای تیپ G_1 و G_2 با حضور ۳ و ۴ درصد *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* به همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی برای G_1 به ترتیب ۷۵/۸ و ۶۶/۱ درصد و ۹۵/۴ و ۸۱/۷ درصد و برای G_2 به ترتیب ۷۷/۷ و ۸۰/۱ درصد و ۹۸/۹ و ۸۹/۳ درصد بوده است. نتایج نشان می‌دهد که *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* قادر به کاهش معنی‌دار ($p<$ ۰/۰۵) آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2 در شرایط آزمایشگاهی و آرد ماهی بوده و توصیه می‌شود از آن به عنوان ابزار بیولوژیک در جهت کنترل آفلاتوکسین در کارگاه‌های تولید آرد ماهی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی : *باسیلوس لیکنی‌فورمیس*، آفلاتوکسین، آرد ماهی کیلکا، G_1، G_2

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۵-۸۳۸۰۹۴۶ فاکس: ۰۵۴۲-۲۲۳۲۶۰۰ E-mail: ebi_alizadeh2003@yahoo.com

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین مایکوتوکسین‌هایی هستند که توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس و برخی از گونه‌های پنی سیلیوم تولید می‌شوند. از زمان شناسایی آفلاتوکسین‌ها تاکنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناسایی شده اند که خواص فیزیکوشیمیایی آنها به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است (Chantawannakul *et al* ., 2002). از میان انواع تیپ‌های مختلف، تیپ‌های G_1، G_2، B_1، B_2 به عنوان آفلاتوکسین‌های اصلی مطرح بوده و سایر متابولیت‌ها در بدن میزبان، از این ۴ نوع مشتق می‌شوند (CAST, 1989). این دسته از سموم قارچی دارای اثرات سمی، سرطانزایی، جهش زایی و ناقص الخلقه زایی در انسان و حیوانات می‌باشند و مصرف غذاهای آلوده به آنها به وسیله انسان با بروز بیماری‌هایی نظیر سمیت کبدی، سرطان کبدی، فقر پروتئینی و سندرم ری همراه است (Sweeney and Dobson, 1998).

از روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک به منظور حذف یا کاهش مایکوتوکسین‌ها در جیره غذایی حیوانات استفاده شده است. ولی نتایج حاصله در ارتباط با کاهش فیزیکی و شیمیایی چندان رضایت بخش نبوده است. اما امروزه استفاده از میکروب‌ها و آنزیم‌های تولید شده از آنها به‌عنوان روش‌های بیولوژیک بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات انجام شده با استفاده از قارچ‌های رشته‌ای گروه آسپرژیلوس، ریزوپوس و موکور به منظور تجزیه اخراتوکسین (ochratoxin)، آفلاتوکسین B_1، زرالئون (zeraleon)، پاتولین (patulin) و دزوکسی نیوالنول (deoxynivalenole) نشان می‌دهد که برخی از گونه‌های قارچ‌های مذکور قادر به تجزیه سموم فوق می‌باشند (Vargal *et al.*, 1998).

در روش بیولوژیک از سوش‌های باکتریایی و مخمری به منظور خنثی نمودن مایکوتوکسین‌ها استفاده می‌شود. در مطالعه انجام شده از چند مخمر به منظور کاهش توکسین‌های قارچی استفاده گردید. توکسین‌های مورد استفاده شامل زرالنون، دزوکسی نیوالنون و آفلاتوکسین ها بوده و قارچ‌های انتخاب شده نیز ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)، کلاورومایسس ماریکسانوس(*Klyveromyces marixanus*)، ژئوتریکوم فرمنتان (*Geotrichum fermentans*)، *Metschnikowia pulcherima*، *Rhodotorula glutinis* بودند (Paskevicius *et al.*, 2006).

Stanley *et al.* (1993) در مطالعه خود از *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* در جیره غذایی ماکیان، با هدف کاهش اثرات جانبی بیماری آفلاتوکسیکوزیس، استفاده کرده و نتایج حاصله رضایت بخش بوده است. Santin *et al.* (2001) از *Saccharomyces Cerevisiae* به منظور کاهش آفلاتوکسین در جیره غذایی ماکیان با تاکید بر بهبود موکوس گوارشی و تقویت سیستم ایمنی استفاده کردند. تاثیر دیواره سلولی *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* بر جذب ماده غذایی، ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که پلی‌ساکارید موجود در دیواره سلولی دارای تاثیرات مثبت بر پارامترهای ذکر شده بوده است (Santin *et al.*, 2003b).

در مطالعات انجام شده در زمینه مبارزه بیولوژیکی در برابر آفلاتوکسین‌ها به واسطه حضور باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس لیکنی‌فورمیس*) به‌این نتیجه رسیدند، که غشای خارجی این باکتری‌ها از جنس پلی ساکارید بوده و به پپتیدوگلیکان معروف می‌باشد، که آنزیم آلفا-آمیلاز تولید می‌کند، این آنزیم قادر به تجزیه ساختارهای حلقوی غیر یکسان آفلاتوکسین می‌باشد (Bakutis *et al.*, 2005).

بروز بیماری در بسیاری از گونه‌های ماهی در اثر مصرف غذای آلوده به آفلاتوکسین گزارش شده است (Lim *et al.*, 2001; Halver, 1996; Cagauan *et al.*, 2004)، که نشان دهنده آلودگی آرد ماهی جیره‌های غذائی به آفلاتوکسین می‌باشد. عامل اصلی گسترش آفلاتوکسین

نحوه نامناسب انبار کردن غذا است (Liu and Chu, 2001).

با توجه به کاهش صید شک ماهیان (Clupeidae) دریای کاسپین در سال‌های اخیر و اهمیت این ماهیان در تولید آرد ماهی که تامین کننده پروتئین جیره غذایی دام، طیور و آبزیان می‌باشد، اهمیت مطالعه آرد ماهی تولیدی را از نظر قارچ‌های توکسین زا در زمان نگهداری آن در کف کارخانه و همچنین شرایط انبارداری نشان می‌دهد. مطالعه حاضر به بررسی تاثیر *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* در جهت کاهش تیپ‌های G_1 و G_2 آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

طرز تهیه *باسیلوس لیکنی‌فورمیس*

استوک لیوفیلیزه *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* (PTCC 1355)[1] از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. به منظور انجام آزمایش‌ها، ابتدا مقداری از پودر این باکتری را به سرم فیزیولوژی اضافه نموده و پس از ۵ ساعت انکوباسیون در دمای۳۰ درجه‌سانتی‌گراد، به صورت خطی در محیط کشت تریپتون سویا براث کشت داده شده و مجدداً در انکوباتور قرار داده شد (AOAC, 1999).

انجام آزمایش‌های تجزیه بیولوژیک آفلاتوکسین درمقیاس آزمایشگاهی

آفلاتوکسین‌های مورد استفاده جهت تلقیح ، تیپ‌های G_1 و G_2 بوده که غلظت مورد استفاده در محیط کشت آزمایشگاهی ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوده است. به منظور تهیه سوسپانسیون باسیلوس، ابتدا باسیلوس را در محیط تریپتیک سویا براث یا آگار کشت داده و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه و رساندن باسیلوس به فاز رشد لگاریتمی، مقدار ۳ و ۴ درصد از سوسپانسیون تهیه شده، به محیط مایع حاوی آفلاتوکسین انتقال داده شد. پس از اضافه نمودن باسیلوس و آفلاتوکسین‌ها به محیط مایع و انتخاب تیمارهای مختلف، روند آزمایش در زمانهای صفر، ۵ و ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

انجام آزمایش‌های تجزیه بیولوژیک آفلاتوکسین در آرد ماهی

قبل از انجام آزمایش‌ها و تیمارها در این مرحله، آرد ماهی از نظر وجود آفلاتوکسین G مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده به ترتیب ۲ و ۴ میلی‌لیتر از استاندارد آفلاتوکسین به ۵۰ گرم از آرد ماهی بوده و دوز مورد استفاده *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* نیز ۳ و ۴ درصد بوده است. علت استفاده از غلظت‌های فوق آن است که آفلاتوکسین اضافه شده تحت تاثیر واکنش‌های دیگر نظیر فوتواکسیداسیون تجزیه شده و در نتیجه از مقدار آن کاسته می‌شود. پس از اضافه نمودن استاندارد آفلاتوکسین به آرد ماهی و مخلوط کردن آن، نمونه‌ها در یک مکان تاریک با دمای ۲۵ درجه نگهداری شده و در زمان‌های مشابه فاز آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. با این تفاوت که در این مرحله فقط تغییرات آفلاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفت (Hyogo, 1999; AOAC, 1999; Adsule and Commission, 1998; Salunkhe, 1984).

ارزیابی تغییرات رشد *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* و غلظت آفلاتوکسین

به منظور ارزیابی تغییرات رشد، جذب نوری باسیلوس در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکترفتومتر قرائت شده و جهت ارزیابی غلظت آفلاتوکسین نیز از دستگاه HPLC استفاده گردید. با در

1- Persian Type Culture Collection

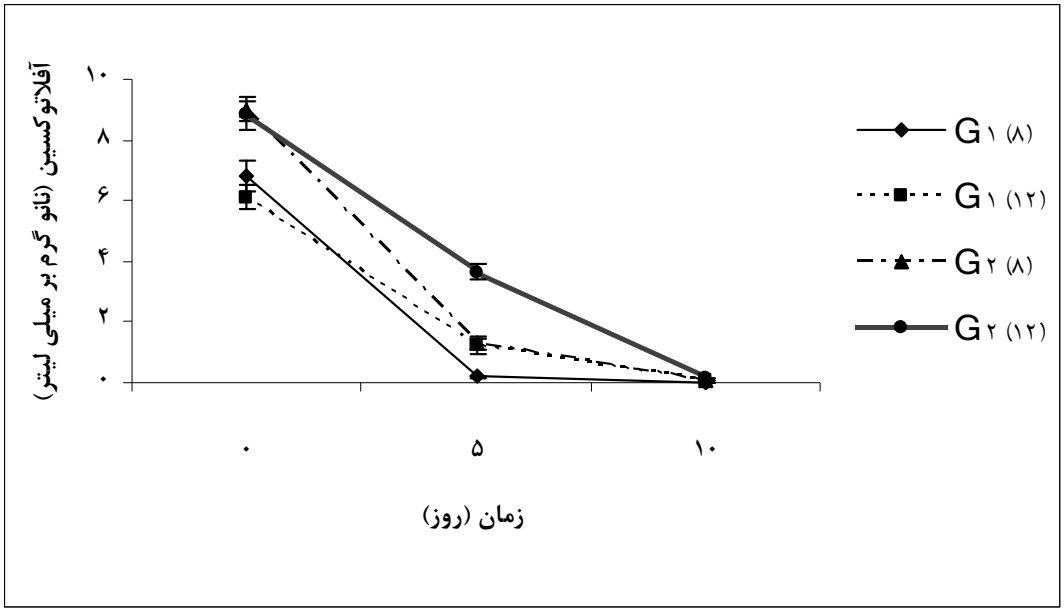
دست داشتن سطح زیر منحنی هریک از آفلاتوکسین‌های مورد استفاده و نمونه‌های آزمایشی تزریق شده به دستگاه، مقدار نهایی هر یک از آفلاتوکسین‌ها تعیین گردید (Coker, 1998).

تجزیه وتحلیل آماری

داده‌ها پس از نرمال سازی با نرم افزار MINITAB، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد. در تمام مقاله تفاوت یا تغییر معنی‌دار معادل است با $P < ۰/۰۵$.

نتایج

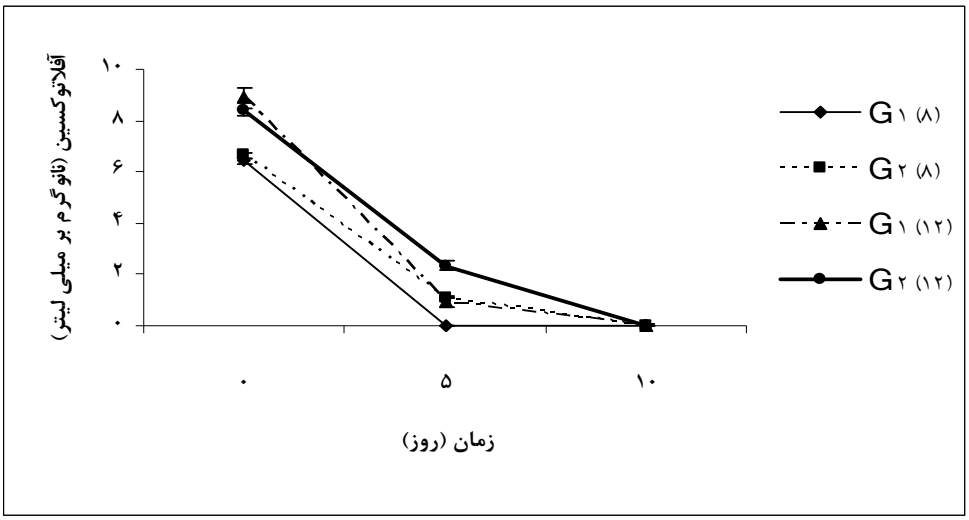
نتایج تجزیه بیولوژیک تیپ‌های G_1 و G_2 آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی و آرد ماهی در شکل های زیر نشان داده شده است. به هنگام استفاده از *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۳ درصد در مقیاس آزمایشگاهی، روندی کاهشی را در تیپ‌های G_1 و G_2 در دو غلظت ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر مشاهده می‌کنیم که تفاوت معنی‌داری را بین داده‌ها نشان می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱- تغییرات آفلاتوکسین درحضور *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۳٪ (نانوگرم‌بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۸ =G_2 و ۱۲ و۸ =G_1) درمقیاس آزمایشگاهی

با توجه به نتایج فاز آزمایشگاهی به هنگام استفاده از *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۴ درصد، مشاهده می‌شود که غلظت هر چهارتیپ آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روندی نزولی داشته و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده ($p< ۰/۰۵$) است.

این نتایج نشان می‌دهد که غلظت هر دو تیپ آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روند نزولی داشته و بیشترین میزان کاهش مربوط به تیپ (۱۲) G_1 بوده است (شکل ۱).



شکل ۲- تغییرات آفلاتوکسین درحضور *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۴٪ (نانوگرم‌بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۸ =G_2 و ۱۲ و۸ =G_1) درمقیاس آزمایشگاهی

تغییرات جذب نوری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* در زمان‌های مختلف به هنگام استفاده از غلظت ۳ و ۴ درصد باسیلوس در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۴ در صد تاثیر بیشتری روی غلظت‌های هر دو تیپ آفلاتوکسین می‌گذارد و بیشترین میزان کاهش مربوط به تیپ (۱۲) G_1 بوده است (شکل ۲).

جدول ۱- جذب نوری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* در محیط کشت آزمایشگاهی در زمانهای مختلف (نانوگرم‌بر میلی‌لیتر، ۱۲ و ۸ = G_2 و ۱۲ و۸ =G_1) درمقیاس آزمایشگاهی

آفلاتوکسین / زمان (روز)	۱	۲	۳	۴
صفر	۰/۳۷ ±۰/۰۳^{a}	۰/۳۸ ±۰/۰۵^{a}	۰/۴۶ ±۰/۰۳^{a}	۰/۴۴ ±۰/۰۱^{a}
۵	۳/۳۳ ±۰/۱۶^{b}	۳/۴۱ ±۰/۴۲^{b}	۳/۸۴ ±۰/۱۴^{b}	۳/۷۶ ±۰/۱۹^{b}
۱۰	۴/۸۹ ±۰/۳۷^{c}	۴/۲۶ ±۰/۰۶^{c}	۴/۷۴ ±۰/۱۱^{c}	۴/۱۲ ±۰/۰۳^{c}

داده‌های جدول شامل میانگین داده‌ها ± انحراف معیار (n=۳) می‌باشد.

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌داردر زمان های مختلف است.

× ۱: آفلاتوکسین G_1 و G_2 به میزان ۸ نانو گرم بر میلی‌لیتر و غلظت باکتری ۳٪.

× ۲ : آفلاتوکسین G_1 و G_2 به میزان ۱۲ نانو گرم بر میلی‌لیتر و غلظت باکتری ۳٪.

.× ۳ : آفلاتوکسین G_1 و G_2 به میزان ۸ نانو گرم بر میلی‌لیتر و غلظت باکتری ۴٪.

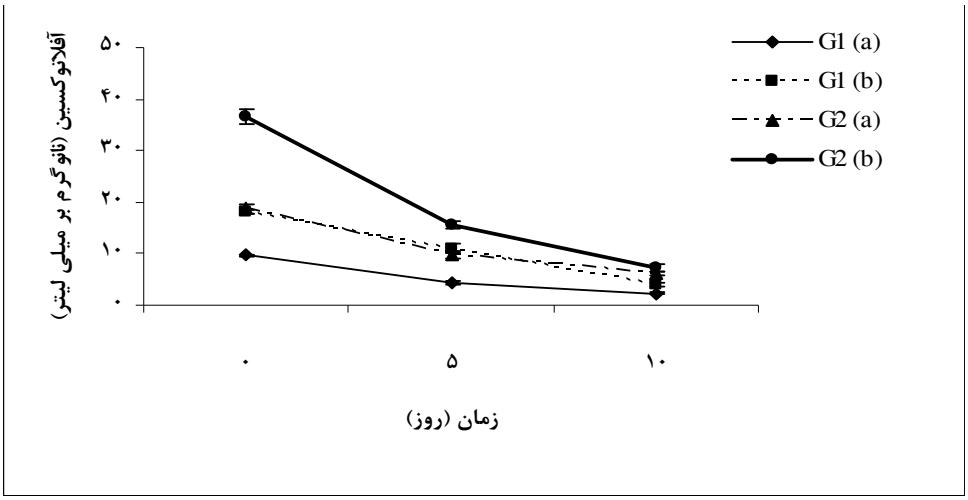
.× ۴ : آفلاتوکسین G_1 و G_2 به میزان ۱۲ نانو گرم بر میلی‌لیتر و غلظت باکتری ۴٪.

جذب نوری باسیلوس در دو غلظت ۳ و ۴ درصد نسبت به هم معنی‌دار بوده($p< ۰/۰۵$) ولی ما بین دوزهای مختلف آفلاتوکسین ارتباط معنی‌داری وجود نداشته است.

نتایج نشان می‌دهد که میزان رشد باسیلوس بعد از ۱۰ روز در غلظت‌های مختلف روندی کاملا صعودی داشته و در نتیجه افزایش جذب نوری باسیلوس در زمان‌های مختلف معنی‌داربوده است ($p< ۰/۰۵$). همچنین تغییرات

سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا را نشان می‌دهد.

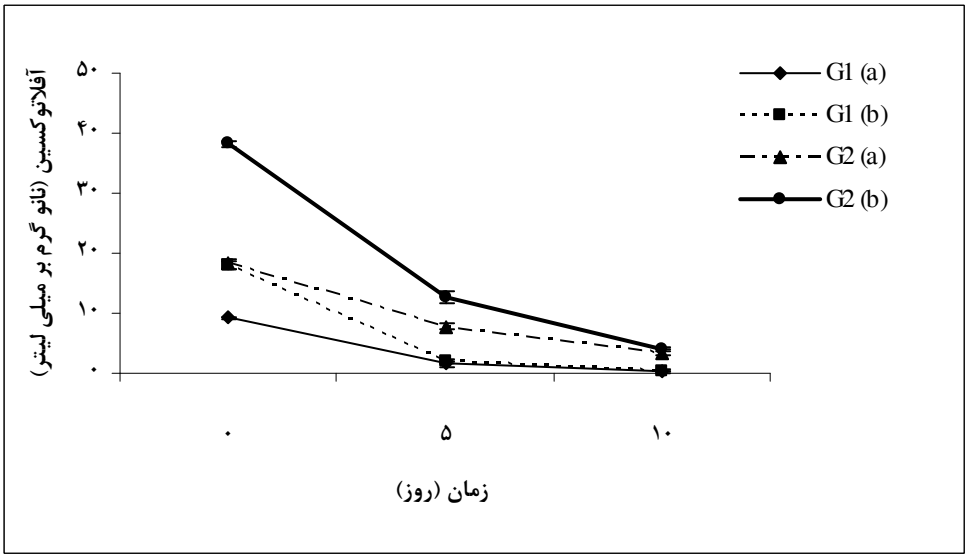
شکل ۳ تغییرات آفلاتوکسین درحضور *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۳ درصد به همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از



شکل ۳- تغییرات آفلاتوکسین درحضور *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۳٪ به همراه ۲ و۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا ((۳٪باکتری و۴میلی‌لیتر) b و (۳٪باکتری و۲میلی‌لیتر) a)

شکل ۴ نشان می‌دهد که استفاده از *باسیلوس لیکنی فورمیس* ۴ درصد به همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا موجب کاهش میزان توکسین‌ها در هر دو تیپ شده است.

میزان کاهش توکسین در هر دو تیپ به وضوح مشاهده می‌شود. غلظت آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روندی نزولی داشته و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است ($p<$ ۰/۰۵). بیشترین درصد کاهش توکسین مربوط به تیپ (۳٪باکتری و ۴ میلی‌لیتر) G_2 بوده است.



شکل ۴- تغیرات آفلاتوکسین درحضور *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* ۴٪ به‌همراه ۲ و۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین در ۵۰ گرم از آرد ماهی کیلکا ((۴٪باکتری و۴میلی‌لیتر) b و (۴٪باکتری و۲میلی‌لیتر) a)

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* مورد استفاده قادر به کاهش تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی (شکل ۱ و ۲) و آرد ماهی (شکل ۳ و ۴) می‌باشد ولی با این وجود میزان کاهش آفلاتوکسین در آرد اندکی کمتر بوده است که‌این امر به دلیل در دسترس نبودن آفلاتوکسین در محیط جامد بوده در صورتی‌که در محیط براث، آفلاتوکسین در دسترس باسیلوس بوده و واکنش تجزیه و غیر فعال کردن آن با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد. به منظور کاهش آفلاتوکسین از سلول کامل یا آنکه از دیواره سلولی باسیلوس‌ها و مخمرها استفاده می‌گردد. به هنگام استفاده از دیواره سلولی این باسیلوس، میزان آفلاتوکسین و سایر توکسین‌ها بطور معنی‌داری کاهش می یابد. دیواره سلولی *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* حاوی پلی‌ساکاریدهایی بوده که مکانیسم‌های مختلف پیوند با توکسین را فراهم می نمایند (پیوندهای هیدروژنی، یونی و هیدروفوبی). به ازای هر گرم از دیواره سلولی باسیلوس، ۲/۶ میلی گرم از سم زرالنون جذب می‌گردد. فرآیند اتصال به توکسین‌ها به سرعت انجام گرفته و در عرض ۱۰ دقیقه فرآیند کامل می‌گردد (Santin *et al.*, 2002; 2003a).

همان طور که جدول ۱ نشان می‌دهد احتمالاً *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* به عنوان یک میکروارگانیسم مداخله گر عمل کرده و موجبات افزایش رشد خود و در نتیجه کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) آفلاتوکسین را در محیط فراهم کرده است. بسیاری از ارگانیسم‌ها، هنگامی که در محیط‌های کشت ساختگی و یا سوبسترهای مختلف طبیعی با *آسپرژیلوس فلاووس* همراه می‌شوند توانایی مهار آفلاتوکسین را دارند. این تداخل از طریق رقابت جهت تولید مواد مداخله گر در سم زدایی صورت می‌گیرد. هنگامی‌که *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط غالب است سم تولید می‌شود، ولی زمانی‌که سایر میکروارگانیسم‌های محیط مانند *باسیلوس سوبتی لیس* و سویه‌های لاکتوباسیلوس ترکیبات مداخله‌گر تولید نمایند تولید آفلاتوکسین‌ها به‌طور کامل متوقف شده و یا به غلظت هر دو تیپ آفلاتوکسین از زمان صفر تا ده روز روند نزولی داشته و نتایج حاصله نیز معنی‌داربوده است(p< ۰/۰۵). با توجه به کاهش میزان توکسین می‌توان به رابطه افزایش میزان دوز باکتری که منجر به کاهش میزان توکسین شده است پی برد. بیشترین درصد میزان کاهش توکسین مربوط به تیپ G_2 (۴٪ باکتری و۲میلی‌لیتر) بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات مختلفی در ارتباط با کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماریزا و متابولیت‌های آنها توسط باسیلوس و مخمر انجام گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* دارای اثر مهار کننده بر فعالیت قارچ‌های بیماریزا می‌باشد، که تاثیر آن به وضوح در تحقیق حاضر قابل مشاهده است. مهم‌ترین فاکتور مهارکننده رشد کپک، کاهش مواد غذایی در محیط بوده که باسیلوس‌ها با رشد خود و رقابت با کپک باعث این امر می‌شوند. و با افزایش درصد باسیلوس تاثیر آن بر آفلاتوکسین‌ها بیشتر می‌شود (Vargal *et al.*, 1998).

یکی از دلائل احتمالی کاهش میزان آفلاتوکسین در تحقیق حاضر را می‌توان به حضور باسیلوس‌ها به عنوان ساپروفیت جدا شده از میوه‌جات، خاک و گیاهان اشاره کرد که قادر به کاهش آفلاتوکسین می‌باشند. مخمر کاندیدا کروزه‌ایی و جنس *Pichia anomala* قادر به کاهش تولید آفلاتوکسین به ترتیب تا ۹۶ تا ۹۹ درصد بوده اند. باسیلوس‌ها به دلیل مزایایی نظیر نیازمندی‌های ساده غذایی، توانایی رشد در فرمانتور در حضور محیط کشت ارزان قیمت، توانایی زنده ماندن در شرایط محیطی متفاوت و عدم تولید ترکیبات سمی از اهمیت خاصی برخوردار بوده و از آنها به عنوان ابزارهای بیولوژیک در زمینه کنترل آلاینده‌های میکروبی و متابولیت‌های سمی در مواد غذایی استفاده می‌شود (Santin *et al.*, 2002; 2003a).

منهادن تهیه می‌گردد. آلودگی آرد در هنگام تولید، جمع کردن در کف کارخانه و یا انبارداری رخ می‌دهد. یکی از راه‌های آلودگی آرد ماهی، مخلوط نمودن آن با غذاهایی با منشاء گیاهی بوده که در اکثر موارد آلوده به آفلاتوکسین می‌باشند. بنابراین جیره غذایی بایستی به نوعی انتخاب شود که عاری از هرگونه غذای آلوده به آفلاتوکسین باشد. بر اساس گزارش FAO وجود مایکوتوکسین‌ها در غذای آبزیان در آسیای جنوب شرقی بسیار بالا می‌باشد. آلودگی جیره غذایی ماهیان پرورشی به آفلاتوکسین مشکل اساسی در نواحی گرمسیری بوده که علت عمده آن فرآوری ناقص آرد و روش‌های نگهداری نامناسب آن بوده است. به منظور کاهش آفلاتوکسین در آرد بایستی مواردی نظیر خشک کردن به موقع آرد و کاهش رطوبت آن به ۱۱ تا ۱۲ درصد و یا پائین تر مورد توجه قرار گیرد. آرد ماهی کیلکا پس از تولید به‌علت گرم بودن در کف کارخانه نگهداری شده که گرمای بالای آن باعث جذب رطوبت محیط شده و در نتیجه محیط مناسب برای رشد و تکثیر اسپورهای قارچی فراهم می شود. از طرفی کنترل مستمر دستگاه‌ها، محیط‌های مورد استفاده از نظر آسپرژیلوس حائز اهمیت می‌باشد و همچنین رعایت بهداشت از نکات حائز اهمیتی است که باید به آن توجه بیشتری کرد (Dragoni *et al.*, Yiannikouris and Jouany, 2002; Hagler, 1998; Spring and Fegan, 2005; Dutta and Das, 2000).

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* قادر به کاهش تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین در آرد ماهی بوده و می‌توان از آن به عنوان ابزار بیولوژیکی جهت کنترل آفلاتوکسین در کارگاه‌های تولیدی استفاده کرده و با دوزهای مشخص به آرد ماهی اضافه نمود. با توجه به مطالعات انجام گرفته، پیشنهاد می‌شود که اثر باکتری مذکور به منظور کاهش سایر سموم قارچی نظیر اخراتوکسین، فوزاریوتوکسین و غیره در آرد ماهی مورد بررسی قرار گیرد.

تاخیر می‌افتد (Blumenthal., 2004; Peltonen *et al.*, 2000).

Khosravi and Modirsanei (2000) از *ساکارومیسس سرویزیه*، زئولیت و بی سولفیت سدیم به منظور کاهش آفلاتوکسین در زنجیره غذایی جوجه‌های گوشتی استفاده کرده و تاثیر آنها بر پارامترهایی نظیر رشد، ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آفلاتوکسین به همراه ساکارومیسس سرویزیه، دارای بالاترین وزن، کمترین درصد تلفات و بهترین تبدیل غذایی بودند. نتایج تحقیق خسروی و همکارانش تایید کننده مطالعه حاضر می‌باشد.

میزان کاهش تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی در غلظت ۳ درصد *باسیلوس لیکنی فورمیس*، به همراه توکسین با دو غلظت ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر بین۹۸/۲ تا ۹۹/۹ درصد، در غلظت ۴ درصد به همراه توکسین با دو غلظت ۸ و ۱۲ نانو گرم بر میلی‌لیتر بین ۹۹/۶ تا ۱۰۰ درصد و این میزان کاهش در آرد ماهی با غلظت ۳ درصد *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* به همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندار آفلاتوکسین بین۶۶/۱۰ تا ۸۰/۱ درصد و در غلظت ۴ درصد باسیلوس به همراه ۲ و ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد آفلاتوکسین بین ۸۱/۷ تا ۹۸/۹ درصد متغیر بوده است. به عبارت دیگر تیپ‌های مختلف آفلاتوکسین، به علت ساختار مولکولی مشابه، تحت تاثیر تجزیه *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* قرار گرفته اند. مواد بیولوژیک مثل مخمرها و باکتری‌ها بطور غیر اختصاصی عمل کرده و بر اساس نوع آنزیم تجزیه کننده و یا غیر فعال کننده میکروارگانیسم، روند واکنش متفاوت بوده و سموم مختلف دیگر تحت تاثیر خواهند گرفت (Huwing *et al.*, 2001).

آرد ماهی یکی از اجزای تشکیل دهنده غذای کنسانتره آبزیان بوده و در اکثر موارد از ماهی کامل مثل ماهی کیلکا، ساردین، کاپلین و یا ضایعات آنها نظیر ماهی

References

- Adsule, R. N. and Salunkhe D. K., 1984. Aflatoxins in foods and feeds. Metropolitan Book Company, 17: 231-265.
- AOAC Officcial Methods., 1999. Aflatoxin B1 & Total Aflatoxins in peanut butter , pistachio paste, fig paste & paprika powder immunoaffinity column liquid chromatography with Post-Column Derivatization , Official Methods of Analysis of AOAC International 17th Edition Volum Π , Chapter 49 Natural Toxins.
- Bakutis, B., Baliukoniene V. and Paskevicius A., 2005. Use of biological method for detoxification of mycotoxins. Botanica Lithuanica. Suppl, 7: 123-129.
- Blumenthal, C. Z., 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus flavus, Aspergillus nige,* justification of effect *lactobasillus* testing in food grade enzyme preparations derived from the two fungi. Regulatory Toxicology Pharmacology, 39: 214-228.
- Cagauan, A. G., Tayaban, R. H., Somga, J. and Bartolome, R. M., 2004. Effect of aflatoxin B1-contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and *Oncorhynchus Mykiss*. Journal of Agricultural Sciences, 16: 47-54.
- CAST, M. G., 1989. Mycotoxins. Economic and health risks. Task Force Rep. No. 116. November 1989. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, 13: 147 -153.
- Chantawannakul, P., Onchaeroen A., Klanbut K., Chukeatorite E. and Lumyong S., 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Science Journal Asia, 28: 241-245.
- Coker, R. D. 1998. The chemical methods detoxification of aflatoxincontaminated animal feed. *Natural Toxicants Food*, 17(2): 284-298.
- Commission, D., 1998. of sampling & analysis methods for control levels for certain contaminations in foods stuffs: FAO, 42: 117-125
- Dragoni, I., Cantoni C., Papa A. and Vallone L., 2000. Muffe, alimenti ecotossicosi. Citta`StudiEdizioni. UTET Libreria srl, Milano, Italia. ISBN, 19: 188 -251
- Dutta, T. K. and Das, P. 2000. Isolation of aflatoxigenic strains of Aspergillus and detection of aflatoxins B1 from feeds in India. Mycopathologia, 151: 29 -33.
- Hagler, W. M., 1998. Potential for detoxification of mycotoxin-contaminated commodities. Food microbiology, 76: 233-243.
- Halver, J. E., 1996. Aflatoxicosis and rainbow trout hepatoma. Mycotoxins in foodstuffs Journal, 18: 209 –234.
- Huwing, A., Freimund S. and Kappeli O., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters, 122: 179-188.
- Hyogo International Center. 1999. Japan International Cooperation Agency- Textbook for group training course in mycotoxin inspection in food. Applied Enviromental Microbiology, 9:129-133.
- Khosravi, A. and Modirsanei M., 2000. Comparison of some application method in decrease aflatoxin effect on production index of broiler chickens. Journal of veterinary faculty of Tehran university, 54: 59-66.
- Lim, H. A., Ng, W. K., Lim, S. L. and Ibrahim, C. O., 2001. Contamination of palm kernel meal with *Aspergillus flavus* affects its nutritive value in pelleted feed for tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Research, 32: 895-905.
- Liu, B. H. and Chu, F. S., 2001. Regulation of aflr and its product Aflr, associated with aflatoxin biosynthesis. Applied Enviromental Microbiology, 64: 3718-3723.
- Paskevicius, A., Bakutis B. and Baliukoniene V., 2006. The search for ecologically safe means of mycotoxin detoxification in fodder. Ecologija, 3: 128-131.
- Peltonen, K., El-Nezami H., Salminen S. and. Ahokas J., 2000. Binding of aflatoxin B_1 by probiotic bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture, 70: 1942–1945.

- Santin, E. A., Maiorka M., Macari M., Grecco L. C., Sanchez T. M., Okada J. I. and Myasaka A. M., 2001. Performance and intestinal mucosa development in broiler chickens feed ration containing *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall. The Journal of Applied Poultry Research, 10: 236 -244.
- Santin, E., Maiorka A., Krabbe E. L., Paulillo A. C. and Alessi A. C., 2002. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicates on the prevention of the toxic effects of ochratoxin. Journal of Applied Poultry Research, 11 : 22-28.
- Santin, E., Paulillo A. C., Nakagui L. S. O., Alessi A. C., Polveiro W.J.C. and Maiorka A., 2003a. Evaluation of cell wall yeast as adsorbent on ochratoxin in broilers diets. International Journal of Poultry Science, 2: 465- 468.
- Santin, E., Paulillo A. C., Krabbe E. L., Alessi A. C., Polveiro W. J. C. and Maiorka, A., 2003b. Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin. Archives of veterinary science, 8: 51-55.
- Spring, P. A. and Fegan D. F., 2005. Mycotoxins – a rising threat to aquaculture. Feed mix Springer publication. International Journal of Food Microbiology, 135: 323-331.
- Stanley, V. G., Ojo R., Woldesenbet S. and Hutchinson D. H., 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poultry Science, 72: 1867-1872.
- Sweeney, M. J. and Dobson A. D. W., 1998. Review: Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. International Journal Food Microbiol, 43: 141-158.
- Vargal, J., Rigol K. and Taboril K., 1998. Degradation of mycotoxins by filamentous fungi. International Journal Food Microbiol, 43: 141-158.
- Yiannikouris A. and Jouany J., 2002. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. Animal Research, 51: 81-99.

Inhibitory Effect of *Bacillus Licheniformis* on G_1 and G_2 Aflatoxins in Culture Media and Kilka Fish Meal

M. Valipour meri[1], E. Alizadeh doughikollaee[*2], R. Safari[3] and A. Arshadi[4]
[1] M.Sc. Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Zabol University, I.R. Iran
[2] Assistant Prof, Faculty of Natural Resources, Zabol University, I.R. Iran
[3] Researcher, The Caspian Sea Ecology Research Center, Sari, I.R. Iran
[4] Instructor, Faculty of Natural Resources, Zabol University, I.R. Iran
(Received: 23 August 2010, Accepted: 10 March 2011)

Abstract

This study investigated the inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* on G_1 and G_2 aflatoxins in culture media and Kilka fish meal. Two concentrations of aflatoxins (8 and 12 ppb for G_1 and G_2) and (2 and 4 ml from aflatoxins standard per 50g of fish meal) were used in culture media and Kilka fish meal respectively. The doses of bacillus were 3 and 4% for this experiment. Changes of aflatoxins and the bacterium growth were evaluated using HPLC and spectrophotometer (OD: 600 λ) respectively. Culture media results show that G_1 and G_2 concentrations decreased significantly ($P < 0.05$) by 99.9 and 99.4%, 99.2 and 98.2% respectively (for 3% *Bacillus*), and 100 and 100%, 100 and 99.6%, respectively (for 4% *Bacillus*). In fish meal, concentrations of G_1 and G_2 decreased significantly ($P < 0.05$) by 75.8 and 66.1%, 77.7 and 80.1% (for 3% *Bacillus* with 2 and 4 ml aflatoxins standard) and 95.4 and 81.7%, 98.9 and 89.3 % (for 4% *Bacillus* with 2 and 4 ml aflatoxins standard), respectively. The results show that *Bacillus licheniformis* is able to decrease significantly ($P < 0.05$) G_1 and G_2 aflatoxins in culture media and fish meal and is recommended to be used as a biological tool in fish meal industry.

Keywords: *Bacillus licheniformis,* Aflatoxins, Kilka fish meal, G_1, G_2

*Corresponding author: Tel: +98 915 8380946 ,Fax: +98 542 2232600 , E-mail: ebi_alizadeh2003@yahoo.com