مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۱۹۸-۱۹۱)

بررسی نحوه عمل باکتری *Bacillus subtilis* در کاهش آفلاتوکسین *Aspergillus flavus*

محسن فرزانه[1]*، مسعود احمدزاده[2]، علیرضا قاسم‌پور[3]، منصوره میرابوالفتحی[4]، محمد جوان نیکخواه[5] و عباس شریفی تهرانی[6]

۱، ۲، ۵، ۶، دانشجوی سابق دوره دکتری، دانشیاران و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۳، دانشیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ۴، دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۷)

چکیده

آفلاتوکسین به‌عنوان یکی از خطرناک‌ترین توکسین‌های قارچی برای انسان و دام محسوب می‌شود. آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین، سبب زیان اقتصادی در کشاورزی، صنایع غذایی و دامی می‌شود. در طبیعت میکروارگانیسم‌هایی وجود دارند که با مکانیسم‌های مختلف، قادر به کاهش این آلودگی در محصولات کشاورزی هستند. در این راستا نحوه تأثیر چهار جدایه از *Bacillus subtilis* در کاهش آفلاتوکسین *Aspergillus flavus* در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد جدایه BsP1 با جلوگیری کامل از تولید بیومس قارچ در محیط کشت مایع PDB بیشترین تأثیر را نشان داده و جدایه‌های BsP4، BsP5 و BsP38 به ترتیب با ۵۸/۸۸، ۲۷/۴۱ و ۲۹/۰۳ درصد کاهش بیومس قارچ و متعاقباً باعث کاهش ۸۶/۸۵، ۲۱/۸۰ و ۲۶/۱۶ درصدی میزان آفلاتوکسین B1 نسبت به شاهد بدون باکتری شدند و به عبارتی همبستگی منفی معنی‌داری بین میزان کاهش بیومس قارچ با مقدار آفلاتوکسین B1 تولید شده مشاهده شد. تأثیر باکتری‌ها در پاک‌سازی آفلاتوکسین اضافه شده به محیط کشت نشان داد که هیچ یک از جدایه‌ها قادر به پاک‌سازی آفلاتوکسین B1 پس از سه روز نبوده اما پس از پنج روز جدایه BsP1 باعث پاک‌سازی کامل آفلاتوکسین شد. سلول‌های هیچ یک از چهار جدایه باکتری نقشی در جذب سطحی آفلاتوکسین B1 نداشتند و فقط متابولیت‌های خارج سلولی جدایه BsP1 در تجزیه آفلاتوکسین B1 نقش قابل توجه‌ای داشت. این نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌های امید بخش *B. subtilis* عمدتاً با دو مکانیزم آنتی‌بیوز و تجزیه در کنترل آفلاتوکسین محصولات کشاورزی مؤثر هستند.

واژه‌های کلیدی: *Aspergillus flavus*، آفلاتوکسین، *Bacillus subtilis*، تجزیه بیولوژیکی، آنتی‌بیوز

مقدمه

قارچ *Aspergillus flavus* روی گستره وسیعی از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد نموده و با تولید زهرابه آفلاتوکسین[1] نوع B موجب آلودگی آنها می‌شود.

1. Aflatoxin

* نویسنده مسئول: محسن فرزانه تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۸۷۸۰۵ E-mail: mfarzane@ut.ac.ir

آفلاتوکسین‌ها به عنوان یکی از سمی‌ترین متابولیت‌های قارچی، موجب ضعیف شدن سیستم دفاعی بدن و بروز سرطان و تومور در انسان می‌شوند (Abbas, 2005). آلودگی محصولات به آفلاتوکسین، یک مشکل جهانی ویران کننده کشاورزی و صنایع غذایی و دامی است. چون آلودگی به آفلاتوکسین اجتناب‌ناپذیر است چندین استراتژی برای سم‌زدایی و غیرفعال کردن آن پیشنهاد شده است که شامل روش‌های فیزیکی، بیولوژیکی و شیمیایی است (Park, 1993). از طرفی میکروارگانیسم‌های مفیدی مانند باکتری‌های آنتاگونیست قادرند مکان‌های غذایی و فضاهای طبیعی این استرین‌های توکسین‌زا را اشغال کرده و با تولید برخی ترکیبات بیولوژیکی، باعث غیرفعال‌سازی و تخریب آفلاتوکسین شده و در سم‌زدایی محصولات آلوده به آفلاتوکسین مؤثر می‌باشند (Abbas, 2005). برای مثال جدایه‌هایی از *Bacillus subtilis* از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین روی ذرت و پسته ممانعت کردند (Sedaghat, 2009; Kimura & Hirano, 1988).

پاک‌سازی میکروبی شناخته شده شامل تجزیه، هضم و جذب سطحی است (Laciakova *et al.*, 2008). هر چند قارچ هایی از قبیل *A. niger*, *A. parasiticus*, *Trichoderma viride*, *Mucor ambiguous* دارای توانایی معنی‌داری در تجزیه آفلاتوکسین B1[1] می‌باشند (Huynh *et al.*, 1984; Mann & Rehm 1976). اما محدودیت هایی از قبیل زمان تخریب طولانی (بیش از ۷۲ ساعت) و تخریب ناتمام و تولید رنگدانه در محیط، باعث کاهش کاربرد این عوامل قارچی شده است. علاوه بر این، برخی از این استرین‌های قارچی ممکن است تحت شرایطی، توکسین‌های خطرناکی تولید نمایند (Huynh *et al.*, 1984). بنابراین استفاده از باکتری‌ها در تخریب آفلاتوکسین کاربرد وسیع تری پیدا کرده است (Laciakova *et al.*, 2008). گزارش‌هایی در مورد کاهش آفلاتوکسین به وسیله باکتری‌ها به چاپ رسیده است. برخی مطالعات روی باکتری‌های لاکتیک اسید از قبیل استرین‌های *Lactobacillus*، *Bifidobacterium*، *Propionibacterium* و *Lactococcus* متمرکز شده و کاهش آفلاتوکسین توسط این باکتری‌ها اساساً به علت باند شدن سلولی است تا متابولیسم یا تجزیه (El-Nezami *et al.*, 1998; Gratz *et al.*, 2005; Peltonen *et al.*, 2001). علاوه بر این مکانیسم، باکتری‌هایی از قبیل *Rhodococcus erythropolis*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، *Mycobacterium fluoranthenivorans* و همچنین باکتری *Nocardia corynebacterioides* (formerly *Flavobacterium aurantiacum*) در تجزیه آفلاتوکسین B1 مؤثر هستند (D'Souza & Brackett 2001; Hormisch *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2009).

هدف از این تحقیق، بررسی نحوه عمل جدایه‌های *B. subtilis* مؤثر در کاهش آفلاتوکسین *A. flavus* است. فهم این امر می‌تواند حذف یا غیرفعال‌سازی (سم‌زدایی) آفلاتوکسین در زنجیره غذایی انسان و احشام را آسان نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ توکسین‌زا، جدایه‌های آنتاگونیست *subtilis Bacillus* و استاندارد آفلاتوکسین‌ها

جدایه *A. flavus* R5 که توکسین‌زایی آن قبلا اثبات شده بود (Ali-Bakhshi, 2009) از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایه‌های آنتاگونیست BsP1، BsP4، BsP5 و BsP38 که توانایی آنها در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus* R5 و کاهش آفلاتوکسین روی پسته اثبات شده بود (Sedaghat-Telgerd, 2009) از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شدند. استاندارد آفلاتوکسین B1 (AFB1, ACROS ORGANICS, USA) از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران و مخلوط آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxin Mix: B1, B2, G1, G2; SIGMA) از آزمایشگاه مایکوتوکسین موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور دریافت شد.

تأثیر باکتری در جلوگیری از رشد و کاهش آفلاتوکسین جدایه *A. flavus R5*

یک میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط مایع آبگوشت غذایی (NB)[2] به فلاسک‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع

1. Aflatoxin B1 (AFB1)

2. Nutrient Broth (NB)

پی‌دی‌بی[1] اضافه شده و همزمان 5×10^{4} اسپور قارچ به هر فلاسک افزوده شد. پس از نگهداری به مدت ۷ روز روی شیکرانکوباتور در دمای۳۰ درجه سلسیوس، توده‌های میسلیومی از محیط کشت به کمک پارچه ململ چهارلا جدا شده و در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شدند. وزن خشک میسیلیوم محاسبه و مقدار آفلاتوکسین موجود در محیط کشت مایع تعیین شد (Teniola *et al.*, 2005).

تأثیر باکتری در کاهش میزان آفلاتوکسین محیط

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط مایع NB به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌بی[2] آفلاتوکسین B1 اضافه شد. پس از نگهداری به مدت ۳ و ۵ روز روی شیکرانکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، میزان آفلاتوکسین تعیین شد.

تأثیر سلول باکتری در کاهش میزان آفلاتوکسین B1 محیط

از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط NB، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه جداسازی شدند. رسوب[3] باکتری دو بار با محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار شسته شده و مجددا در بافر سوسپانسیون شد و جمعیت آن به حدود 10^{6} سلول زنده باکتری در میلی‌لیتر تنظیم شد. سپس به این سوسپانسیون باکتری به میزان ۱۰۰ پی‌پی‌بی آفلاتوکسین B1 اضافه شد. سوسپانسیون حاصل در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شد. سلول‌های باکتری به کمک سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه ته‌نشین شده و میزان آفلاتوکسین موجود در مایع رویی تعیین شد.

تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی باکتری در کاهش آفلاتوکسین محیط

از کشت ۷۲ ساعته باکتری در محیط PDB سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ در ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شدند. مایع رویی از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد. سپس ۰/۴ میلی‌لیتر ازمحلول پایه آفلاتوکسین B1 (۵۰۰ پی‌پی‌بی) با ۱/۶ میلی‌لیتر از این مایع تصفیه شده مخلوط شد تا غلظت نهایی آن به ۱۰۰ پی‌پی‌بی برسد. مخلوط حاصل در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد و سپس میزان آفلاتوکسین آن تعیین شد (Alberts *et al.*, 2006).

استخراج آفلاتوکسین و آنالیز کروماتوگرافی

استخراج آفلاتوکسین‌های موجود در محیط کشت مایع سه مرتبه و طبق روش Teniola *et al.* (2005) با استفاده از حلال کلروفرم انجام شد. سپس کلروفرم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با استفاده از گاز نیتروژن یا حمام آبی تبخیر شد. نمونه‌های حاصل حداکثر به مدت دو هفته تا انجام آنالیز کروماتوگرافی در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال نگهداری شدند.

جهت انجام کروماتوگرافی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC)[4] استفاده شد. ابتدا هر نمونه در یک میلی‌لیتر کلروفرم به کمک دستگاه تولیدکننده امواج ماورای صوت، التراسونیک[5]، کاملاً حل شد. سپس نمونه‌ها روی صفحه سلیکاژلی (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany) به فاصله مناسب لکه‌گذاری شدند. سپس صفحات لکه‌گذاری شده در حلال کلروفرم-استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار گرفته و عمل جداسازی آفلاتوکسین صورت گرفت. پس از جداسازی، صفحات مذکور درون قسمت آنالیز دستگاه HPTLC قرار گرفته و با استفاده از نرم‌افزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evalution Software V. 1.01) بصورت کمی و کیفی در طول موج ۳۶۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از دو نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز بهره برده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به وسیله نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد.

1. PDB
2. ppb (parts per billion)
3. Plates
4. High Performance Thin Layer Chromatography
5. Ultrasonic

برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ یا ۵٪ مقایسه شدند. آنالیزهای همبستگی بین نتایج آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

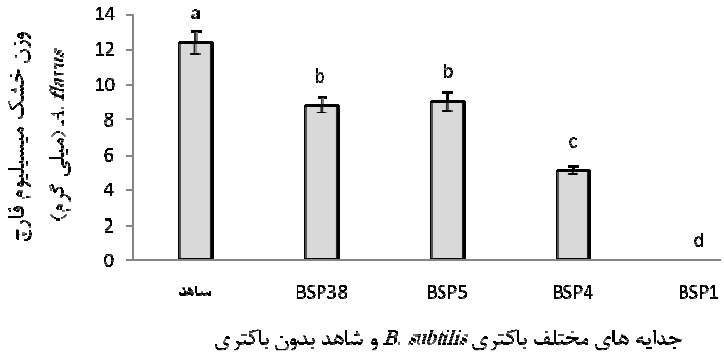
نتایج

تأثیر باکتری در جلوگیری از رشد قارچی و کاهش آفلاتوکسین جدایه *A. flavus* R5

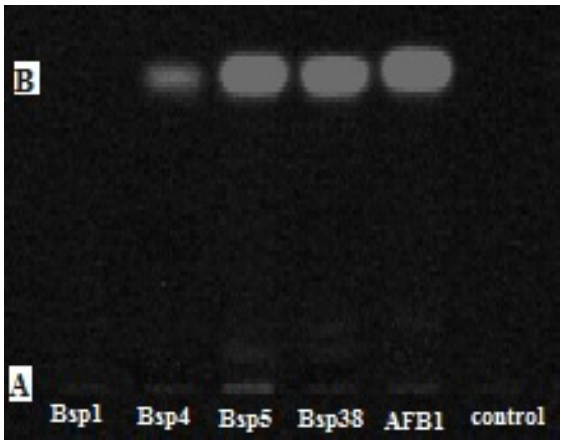
با توجه به شکل ۱ بین باکتری‌ها از نظر توانایی در جلوگیری از رشد قارچ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. جدایه BsP1 با جلوگیری کامل از تولید توده[1] قارچ در محیط PDB بیشترین تأثیر را نشان داده و جدایه‌های BsP4، BsP5 و BsP38 به ترتیب با ۵۸/۸۸، ۲۷/۴۱ و ۲۹/۰۳ درصد کاهش توده قارچ نسبت به شاهد بدون باکتری (۱۲/۴ میلی گرم) نقش معنی‌داری داشتند.

نتایج بررسی میزان آفلاتوکسین تولید شده در تعامل‌های باکتری-قارچ نشان داد که حضور باکتری BsP1 باعث کاهش ۱۰۰٪ آفلاتوکسین B1 شده و تعامل باکتری BsP4 نیز با قارچ *A. flavus* با ۸۶/۸۵ درصد کاهش در تولید آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار قارچ بدون باکتری (۲۱/۴۹ پی‌پی‌ام) تأثیر قابل قبولی داشت. به طور خلاصه بین میزان کاهش بیومس قارچ با مقدار آفلاتوکسین تولید شده همبستگی منفی مشاهده شد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

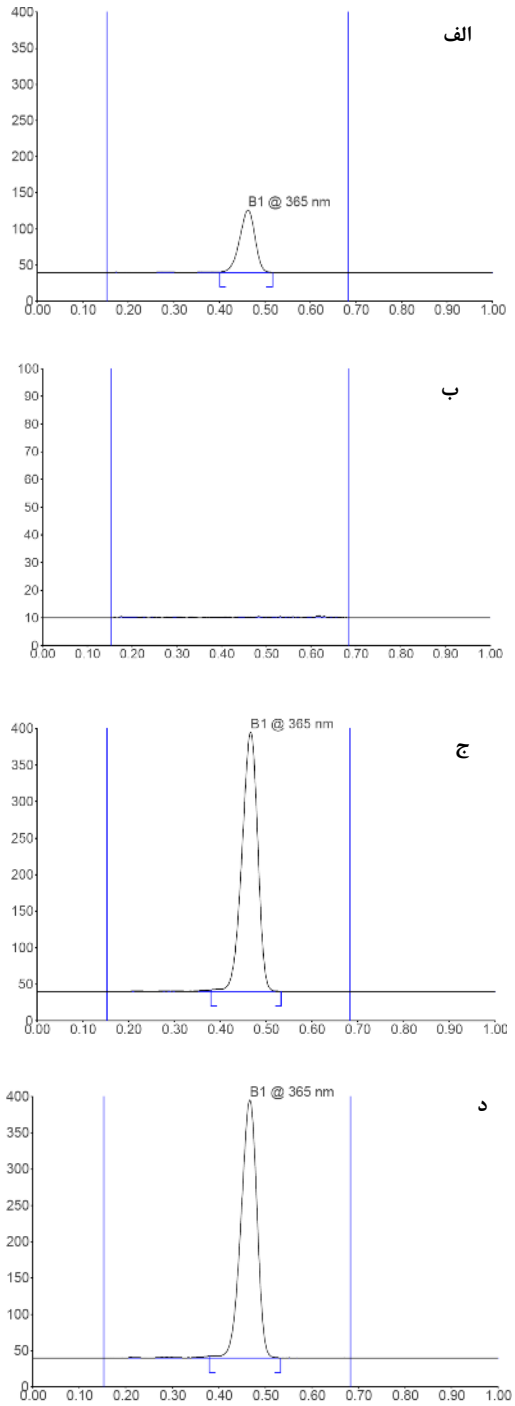
1. Biomass



شکل ۱- تأثیر جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus R5* پس از نگهداری به مدت هفت روز در محیط کشت مایع PDB و دمای ۳۰ درجه سلسیوس



شکل ۲- مشاهده کیفی آفلاتوکسین تیمارهای مختلف با استاندارد آفلاتوکسین (AFB1) روی صفحه سیلیکاژل و تحت نور ماورای بنفش (با طول موج ۳۶۵ نانومتر). A، محل قرار دادن تیمارها روی صفحه سلیکاژل. B، محل قرار گرفتن آفلاتوکسین روی صفحه سلیکاژل با استفاده از حلال جداکننده کلروفرم-استون (۹ به ۱).



شکل ۳- کروماتوگرام تأثیر جدایه‌های *B. subtilis* در میزان آفلاتوکسین نوع B1 جدایه قارچی *A. flavus R5* پس از نگهداری به مدت پنج روز در محیط کشت مایع PDB و دمای ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه HPTLC. الف) جدایه BsP4؛ ب) جدایه BsP1؛ ج) جدایه BsP5؛ د) جدایه BsP38. محور افقی نشان‌دهنده فاکتور بازداری[1] است. محور عمودی نشان‌دهنده ارتفاع پیک می‌باشد.

1. Retention Factor (Rf)

تأثیر باکتری در پاک‌سازی زیستی آفلاتوکسین B1

بر اساس نتایج بدست آمده از جدول ۱ هر چهار باکتری مورد استفاده پس از سه روز در میزان آفلاتوکسین موجود در محیط PDB تأثیری نداشتند. پس از پنج روز باکتری BsP1 باعث کاهش کامل آفلاتوکسین شده و جدایه‌های BsP5، BsP4 و BsP38 در میزان کاهش آفلاتوکسین تأثیر قابل قبولی نداشتند.

جدول ۱- تأثیر جدایه‌های *B.subtilis* در پاک‌سازی و کاهش آفلاتوکسین موجود در محیط مایع PDB پس از نگهداری به مدت پنج روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

جدایه باکتری	سطح زیر منحنی	میزان آفلاتوکسین (پی‌پی‌بی)
BsP1	۰**	۰ d*
BsP4	۴۶۵/۳	۸۸/۵ c
BsP5	۴۸۰/۵	۹۲/۱ bc
BsP38	۵۰۱/۸	۹۶/۶ b
شاهد	۵۱۲/۷	۱۰۰ a

* حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشد.

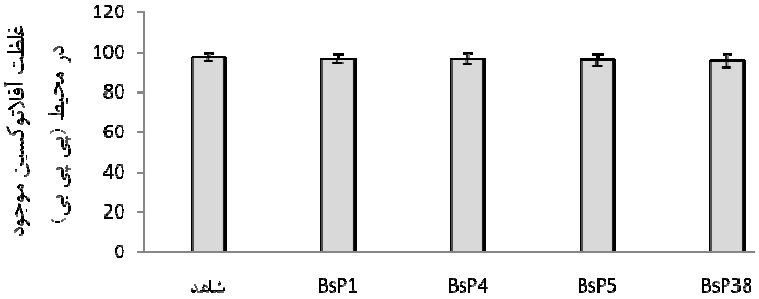
** اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار می‌باشد.

تأثیر سلول باکتری در کاهش آفلاتوکسین موجود در محیط

همانطور که در نمودار مشاهده می‌شود به طور کلی سلول‌های جدایه‌های *B. subtilis* در جذب سطحی آفلاتوکسین B1 و متعاقب آن در کاهش آفلاتوکسین مؤثر نبودند (شکل ۴).

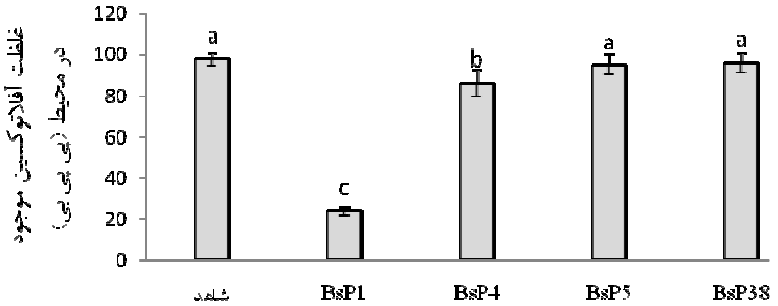
تأثیر عصاره خارج سلولی باکتری در کاهش آفلاتوکسین موجود در محیط

تأثیر عصاره خارج سلولی باکتری‌ها در کاهش چهار نوع آفلاتوکسین موجود در محیط تقریبا با نتایج کاربرد خود باکتری‌ها مطابقت داشت. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود عصاره خارج سلولی جدایه BsP1 فعالیت تجزیه کنندگی بسیار قوی نشان داد به طوری که ۷۴٪ آفلاتوکسین موجود در محیط کشت را پس از ۷۲ ساعت تجزیه کرد. همچنین عصاره خارج سلولی جدایه BsP4 باعث تجزیه ۱۲ درصدی آفلاتوکسین شد. دو جدایه دیگر تأثیر معنی‌داری در کاهش آفلاتوکسین نشان ندادند.



جدایه های مختلف باکتری *B. subtilis* و شاهد بدون باکتری

شکل ۴- تأثیر سلول‌های جدایه‌های *B.subtilis* در پاک‌سازی و جذب آفلاتوکسین موجود در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار) پس از نگهداری به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس



جدایه های مختلف باکتری *B. subtilis* و شاهد بدون باکتری

شکل ۵- تأثیر عصاره خارج سلولی جدایه‌های *B.subtilis* در پاک‌سازی و تجزیه آفلاتوکسین، پس از نگهداری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

بحث

در تحقیق حاضر با کاربرد باکتری و کاهش رشد قارچ، میزان آفلاتوکسین تولیدی نیز کاهش یافت اما کاهش رشد قارچی به تنهایی دلالت بر کاهش معنی‌دار در تولید آفلاتوکسین ندارد. Kimura & Hirano (1988) نیز نشان دادند جدایه (NK-330) *B. subtilis* از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند. به هر حال، تولید توکسین به شرایط رشدی مناسب مرتبط با رطوبت، ترکیبات سوبسترا و رقابت با دیگر میکروارگانیسم‌ها نیز وابسته است (Cotty & Bhatnagar, 1994).

در این تحقیق کاربرد جدایه BsP1 باعث پاک‌سازی چشمگیر (صد در صد) آفلاتوکسین B1 شد، اما در حضور سه جدایه دیگر، کاهش قابل توجهی در میزان آفلاتوکسین موجود در محیط مشاهده نشد. مکانیسم‌های کاهش و غیرفعال‌سازی میکروبی توکسین‌ها که تا کنون شناخته شده شامل تجزیه، هضم و جذب سطحی است(Laciakova *et al.*, 2008). در تحقیق حاضر دیواره سلولی سلول‌های هر چهار جدایه ناتوان در جذب سطحی آفلاتوکسین بوده و یا به عبارتی از نظر فیزیکی امکان باند شدن آفلاتوکسین به سلول‌های باکتری وجود نداشت. به هر حال بر اساس برخی گزارش‌ها، سلول‌های باکتری‌هایی از قبیل *Bifidobacterium*، *Propionibacterium* و *Lactococcus* آفلاتوکسین محیط کشت را با باند شدن فیزیکی پاک‌سازی می‌کنند (El-Nezami *et al.*, 1998; Gratz *et al.*, 2005; Peltonen *et al.*, 2001). همچنین Haskard *et al.* (2001) گزارش کردند که استرین‌های *Lactobacillus* آفلاتوکسین محیط کشت را با باند شدن آفلاتوکسین به ترکیبات سطحی باکتری رفع می‌کنند.

در تحقیق ما عصاره خارج سلولی جدایه BsP1 به طور چشمگیری آفلاتوکسین موجود در محیط را پاک‌سازی و تجزیه کرد. مشابه این، طبق تحقیقات Reddy *et al.* (2009) ترشحات مایع خارج سلولی

باکتری *B. subtilis* به طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B1 ممانعت کرد. همچنین گزارش شده است که عصاره خارج سلولی باکتری *Bacillus* sp. در تجزیه کومارین و آفلاتوکسین B1 نقش مهمی دارد (Guan *et al.*, 2008).

بر اساس بررسی‌های به عمل آمده، ترشحات خارج سلولی برخی باکتری‌ها از قبیل *R. erythropolis*، *P. fluorescens*، *M. fluoranthenivorans* و *N. corynebacterioides* *Stenotrophomonas maltophilia* در تجزیه آفلاتوکسین B1 مؤثر هستند و به نظر می‌رسد آنزیم های پراکسیداز در عمل سم‌زدایی آفلاتوکسین دخالت دارند (Guan *et al.*, 2008). کومارین[1] اساس ساختار ملکولی تمام آفلاتوکسین‌هاست (Bergot *et al.*, 1977; Grove *et al.*, 1981). از این رو مشخص شده میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند از کومارین به عنوان منبع کربن استفاده کنند قادر به استفاده از آفلاتوکسین‌ها و تجزیه آنها نیز می‌باشند (Guan *et al.*, 2008).

با این اوصاف و بر اساس مطالعات انجام شده در این پژوهش به نظر می‌رسد میزان کاهش آفلاتوکسین مشاهده شده به وسیله جدایه‌های باکتریایی بویژه جدایهBsP1 قطعا به علت باند شدن سلولی نبوده و مکانیسم‌های آنتی‌بیوز علیه قارچ همراه با متابولیسم و تجزیه آفلاتوکسین توسط باکتری درگیر این کاهش باشند. در مورد هر ۴ جدایه وجود مکانیسم آنتی‌بیوز صادق و محرز است اما مکانیسم پاک‌سازی از طریق متابولیسم و تجزیه آفلاتوکسین تنها در مورد جدایه BsP1 مشاهده شد. در پایان باید خاطر نشان کرد که شناسایی مکانیسم‌های عمل کنترل میکروبی آفلاتوکسین گامی کلیدی در جهت طراحی استراتژی کنترل آفلاتوکسین بر اساس کاربرد منفرد یا مخلوط استرین‌ها و یا اجزای آنها در مراحل مختلف باغ، انبار و حمل و نقل بوده و امکان طراحی آسان، کارآمد و مقرون به صرفه سم‌زدایی آفلاتوکسین موجود در محیط‌های مختلف را نیز فراهم می سازد.

1. Coumarin

سپاسگزاری

هزینه و امکانات مورد استفاده در این طرح از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تأمین شده است، که نگارندگان به این وسیله مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Abbas, H. K. (2005). *Aflatoxin and food safety*. CRC Press. New York, USA, 565 pp.
2. Alberts, J. F., Engelbrecht, Y., Steyn, P. S., Holzapfel, W. H. & Vanzyl, W. H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 121-126.
3. Alibakhshi, Z. (2009). *Study on effect of hyphal anastomosis on transferring of genetic materials between aflatoxigenic and non–aflatoxigenic isolates of the fungus Aspergillus flavus Link*, *isolated from Pistachio and their analysis by molecular marker rep-PCR*. MSc. dissertation, University of Tehran, Karaj, Iran. (In Farsi).
4. Bergot, B. J., Stanley, W. L. & Masri, M. S. (1977). Reaction of coumarin with aqua ammonia. Implications in detoxification of aflatoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 965-966.
5. Cotty, P. J. & Bhatnagar, D. (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2248-2251.
6. D'Souza, D. H. & Brackett, R. E. (2001). Aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *Journal of food protection*, 64, 268-271.
7. El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. & Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 326-361.
8. Gratz, S., Mykkanen, H. & El-Nezami, H. (2005). Aflatoxin B1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. *Journal of food protection*, 68, 2470-2474.
9. Grove, M. D., Plattner, R. D. & Weisleder, D. (1981). Ammoniation products of an aflatoxin model coumarin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1161-1164.
10. Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q. & Niu, T. (2008). Aflatoxin B1 Degradation by *Stenotrophomonas Maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. *International*

Journal of Molecular Sciences, 9, 1489-1503.
11. Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpaa, P. E. & Salminen, S. (2001). Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3086-3091.
12. Hormisch, D., Brost, I., Kohring, G. W., Giffhorn, F., Kroppensted, R. M., Stackebrandt, E., Färber, P. & Holzapfel, W. H. (2004). *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a *fluoranthene andaflatoxin* B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 653-660.
13. Huynh, V. L., Gerdes, R. G. & Lloyd, A. B. (1984). Synthesis and degradation of aflatoxins by *A. parasiticus*. II: comparative toxicity and mutagenicity of aflatoxin B1 and its autolytic breakdown products. *Australian Journal of Biological Sciences*, 37, 123-129.
14. Kimura, N. & Hirano, S. (1988). Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin-production of aflatoxigenic fungi, *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 1173-1179.
15. Laciakova, A., Cicooova, P., Mate, D. & Laciak, V. (2008). Aflatoxins and possibilitiesfor their biological detoxification. *Medycyna Weterynaryjna*, 64 (3), 276-279.
16. Mann, R. & Rehm, H. J. (1976). Degradation products from aflatoxin B1 by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguus*. *European Journal of Applied Microbiology*, 2, 297-306.
17. Park, D. L. (1993). Controlling aflatoxin in food and feeds. *Food Technology*, 47, 92-96.
18. Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J. & Salminen, S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairystrains of lactic acid bacteria and *bifidobacteria. Journal of Dairy Science*, 84, 2152-2156.
19. Reddy, K. R. N., Reddy, C. S. & Muralidharan, K. (2009). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin productionby *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*, 20, 173-178.
20. Sedaghat-Telgerd, N. (2009). *Study on biological control of Aspergillus flavus in pistachio by using atoxigenic isolate and Bacillus subtilis.* M. Se. dissertation, university of Tehran, Karaj, Iran. (In Farsi).
21. Teniola, O. D., Addo, P. A., Brost, I. M., Farber, P., Jany, K. D., Alberts, J. F., Van-Zyl, W. H., Steyn, P. S. & Holzapfel, W. H. (2005). Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM 44556(T). *International Journal of Food Microbiology*, 105, 111-117.