بررسی آلودگی پودر ماهی کیلکا به افلاتوکسین و ارزیابی کاهش بیولوژیک توسط مخمر ساکارومیسس سرویزیه

محمدرضا سعیدی‌اصل [۱] *

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۲۳

چکیده

در این تحقیق ابتدا پودر کیلکای تولید شده در برخی از کارخانجات استان مازندران از نظر وجود افلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس از مخمرساکارومیسس سرویزیه بعنوان یک ابزار بیولوژیک در جهت کاهش تیپهای B1 ، B2 ، G1 و G2 افلاتوکسین (در دو مقیاس آزمایشگاهی و پودر ماهی کیلکا) استفاده گردید. دو غلظت مورد استفاده افلاتوکسین‌ها در محیط کشت برای تیپ B1 ۱۲ و ۱۶ و برای سایر تیپها ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر و دوز مورد استفاده ساکارومیسس نیز دو غلظت ۳٪ و ۴٪ بوده و در پودر ماهی کیلکا برای افلاتوکسین B1 ۵۰ و ۱۰۰ و برای سایر تیپها ۲۵ و ۵۰ نانو گرم بر گرم و برای مخمر نیز ۴٪ درصد بوده است. میزان تغییرات مخمر و افلاتوکسین در محیط کشت به ترتیب با قرائت جذب نوری مخمر در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفته و در پودر ماهی نیز فقط تغییرات غلظت افلاتوکسین با استفاده از دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز افلاتوکسین در پودر ماهی شاهد نمونه برداری شده از واحدهای مختلف نشان داد که میانگین و انحراف معیار تیپ B1 در کارخانه ۱ ، ۲ ، ۳ و ۴ به ترتیب ۰/۱۰+۰/۹۶، ۰/۳۹+۱/۶۸ ، ۰/۱۸+۱/۳۰ و ۰/۲۶+۱/۲۱، برای تیپ B2 به ترتیب ۰/۸۹+ ۱/۷۹، ۰/۷۳+۱/۳۷ ، ۰/۵۲+۲/۰۳ و ۰/۸۳+۱/۵۰، برای تیپ G1 به ترتیب ۰/۳۴+۰/۷۶، ۰/۴۵+۱/۲، ۰/۱۰+۰/۹۴ و ۰/۲۵+۱/۵۴ و برای تیپ G2 به ترتیب ۰/۸۳+۱/۱۵، ۰/۲۶+۱/۰۳ ، ۰/۱۶+۱/۰۳ و ۰/۱۳+۰/۸۸ میکروگرم بر کیلوگرم بوده است. نتایج کاهش بیولوژیک افلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی نشان داد که به هنگام استفاده از ساکارومیسس سرویزیه در دوز ۳ درصد، میزان کاهش برای B1 ۹۲/۷- ۹۰/۶ درصد ، برای B2 ۹۴- ۸۹/۸ درصد، برای G1 ۹۸/۸ و ۹۷/۳ درصد و برای G2 ۹۴/۸ و ۹۵ درصد و در دوز ۴ درصد مخمر به ترتیب ۹۴/۶- ۹۳/۳ درصد برای B1 ، ۹۵/۸-۹۴/۹ درصد برای B2 ، ۹۲/۱ و ۹۶/۸ درصد برای G1 و ۹۷/۳ و ۹۷ درصد برای G2 بوده است. میزان کاهش افلاتوکسین در پودر ماهی به ترتیب ۹۰/۷۹-۸۵/۹۱ درصد برای تیپ B1 ، ۸۷/۷۰- ۸۷/۰۵ درصد برای B2 ، ۹۱/۸۵ و ۹۰/۶۶ درصد برای تیپ G1 و ۸۹/۶۶ و ۹۱/۴۷ درصد برای G2 بوده است. نتیجه این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات انجام گرفته نشان میدهد که ساکارومیسس سرویزیه قادر به کاهش تیپهای افلاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی و پودر ماهی بوده و می‌توان از آن بعنوان یک ماده بیولوژیک در جیره غذایی طیور و آبزیان که حاوی درصد خاصی از پودر ماهی می‌باشند استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ساکارومیسس سرویزیه ، افلاتوکسین‌های B1 ، B2 ، G1 و G2، پودر ماهی کیلکا

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

*- نویسنده مسئول mrezasaeidi@iaus.ac.ir

مقدمه

مطابق با آمار FAO و FDA تقریبا" ۲۵ درصد از محصولات کشاورزی در دنیا آلوده به مایکوتوکسین ها بوده و طبق گزارش اتحادیه اروپا، ۳۰ درصد از محصولات غذایی و کشاورزی آلوده به مایکوتوکسین بوده که از این میزان، ۹۰ درصد مربوط به افلاتوکسین می باشد (۷ و ۱۵).

از زمان شناسایی آفلاتوکسین تاکنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناسایی شده‌اند که خواص فیزیکوشیمیایی آنها به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. از میان انواع تیپهای مختلف، تیپهای B1 ، B2 ، G1 و G2 بعنوان آفلاتوکسین‌های اصلی مطرح بوده و متابولیتهای M1 و M2 به ترتیب از B1 و B2 مشتق می‌گردند. دو گونه اصلی تولید کننده افلاتوکسین گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشند. این دسته از سموم قارچی بویژه آفلاتوکسین B1 دارای اثرات سمی، سرطانزایی، جهش زایی و ناقص الخلقه زایی در انسان و حیوانات می باشند و مصرف غذاهای آلوده به آنها به وسیله انسان با بروز بیماریهایی نظیرسمیت کبدی، سرطان کبدی، فقرپروتئینی و سندرم ری همراه است (٦ ، ۷ و ۲۳).

به منظور حذف یا کاهش مایکوتوکسینها در جیره غذایی حیوانات، از روشهای مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک استفاده شده ولی نتایج حاصله در ارتباط با کاهش فیزیکی و شیمیایی چندان رضایت بخش نبوده است. امروزه استفاده از میکروبها و آنزیمهای تولید شده از آنها به عنوان روشهای بیولوژیک بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. Vargal و همکارانش از قارچ‌های رشته‌ای گروه آسپرژیلوس، ریزوپوس و موکور به منظور تجزیه اکراتوکسین، افلاتوکسین B1، زرالئون، پاتولین ودزوکسی نیوالنول استفاده کرده و نتایج نشان داد که برخی از گونه‌های قارچهای مذکور قادر به تجزیه سموم فوق می‌باشند(٢٤).

یکی از روشهای کاهش مایکوتوکسین‌ها استفاده از مخمرها می‌باشد. یکی از مخمرهای مورد استفاده، ساکارومیسس سرویزیه می‌باشد. در مطالعه‌ای انجام شده، از مخمر ساکارومیسس سرویزیه به منظور کاهش اکراتوکسین A در جیره غذایی جوجه استفاده شده است و تأثیر تیمارهای مختلف حاوی اکراتوکسین A بهمراه ساکارومیسس سرویزیه بر پارامترهای مختلف مثل جذب مواد غذایی، ضریب تبدیل غذایی، وزن، وزن نسبی کبد و کلیه مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷). محققین در مطالعه خود از ساکارومیسس سرویزیه در جیره غذایی ماکیان، با هدف کاهش اثرات جانبی بیماری افلاتوکسیکوزیس، استفاده کرده و نتایج حاصله رضایت بخش بوده است (۲۲). در مطالعه‌ای دیگر از ساکارومیسس سرویزیه به منظور کاهش افلاتوکسین در جیره غذایی ماکیان با تاکید بر بهبود موکوس گوارشی و تقویت سیستم ایمنی استفاده کردند(۲۰). همچنین تاثیر دیواره سلولی ساکارومیسس سرویزیه بر جذب ماده غذایی، ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اولیگوساکارید مننان موجود در دیواره سلولی دارای تاثیرات مثبت بر پارامترهای ذکر شده بوده است (۱۹). در مطالعه‌ای، از چند مخمر به منظور کاهش توکسینهای قارچی استفاده گردید. توکسینهای مورد استفاده مورد استفاده شامل زرالنون، دزوکسی نیوالنون و افلاتوکسین‌ها بوده و قارچهای انتخاب شده نیز ساکارومیسس سرویزیه، کلاوروماپسس ماریکسانوس ، ژئوتریکوم فرمنتانس، Rhodotorula glutinis, Metschnikowia pulcherima, بودند (١٦).

در دریای خزر ۳ نوع ماهی کیلکا وابسته به جنس Clupeonella وابسته به خانواده شک ماهیان یا هرینگ‌ها Clupeidae بنامهای کیلکای آنچوی (C.engrauliformis)، چشم درشت (C.grimmi) و معمولی (C.delicatula) زندگی می کنند. میزان صید کیلکا ماهیان در سال ١٣٨٦ ، ١٥٤٠٠ تن بوده است. در حال حاضر بواسطه مشکلات موجود در حمل و نقل

کیلکا و سریع الفساد بودن آن فقط٤٪ از کیلکا صید شده به مصارف انسانی رسیده و ٩٦ ٪ از آن در کارخانه‌های منطقه به پودر ماهی تبدیل می‌شود(۲). شرایط تولید پودر ماهی کیلکا، دپو نمودن آن در کف کارخانه و همچنین شرایط انبارداری، پتانسیل آلودگی آن به قارچهای مختلف از جمله آسپرژیلوس را فراهم می‌کند. متعاقب رشد قارچ، افلاتوکسین تولید شده مشکل ساز خواهد بود. بنابراین آنالیز مستمر پودر ماهی تولید شده از نظر قارچهای توکسین زا و بررسی کمی و کیفی افلاتوکسینها در آن و ارائه راهکارهای مختلف در جهت کاهش بار آلودگی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق ابتدا پودر کیلکای تولید شده در برخی از کارخانجات استان مازندران از نظر وجود افلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس از مخمرساکارومیسس سرویزیه بعنوان یک ابزار بیولوژیک در جهت کاهش تیپهایB1، B2، G1 و G2 افلاتوکسین (در دو مقیاس آزمایشگاهی و پودر ماهی کیلکا) استفاده گردید.

مواد و روش کار

ارزیابی کمی و کیفی افلاتوکسین در پودر ماهی کیلکا

جهت بررسی کمی و کیفی تیپهای افلاتوکسین در پودر ماهی کیلکا، نمونه برداری بصورت ماهانه و در سال ۱۳۸۷ از ٤ کارخانه پودر ماهی در استان مازندران انجام گرفته و با احتساب ۳ تکرار برای هر نمونه، در مجموع ٣٦ نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند. آنالیز کمی و کیفی افلاتوکسین با استفاده از دستگاه HPLC انجام گرفته است. بدین ترتیب که با در دست داشتن سطح زیر منحنی هریک از آفلاتوکسینهای مورد استفاده و نمونه های آزمایشی تزریق شده به دستگاه، مقدار نهایی هر یک از آفلاتوکسینها تعیین شد. مشخصات دستگاه HPLC برای اندازه گیری افلاتوکسین شامل موارد ذیل بوده است:

مدل ٤٩٠٠-٤٥٠٠ Cecil ، دتکتور: فلوئورسانس، ستون: ODS ، میزان تزریق: ۱۰۰ میکرو لیتر

استاندارد: B1، B2، G1 و G2 (SIGMA)، حلال: آب، استونیتریل، متانول (به نسبت ٦٠، ١٥ و ٣٠ v/v) (٤، ٥، ٨ و ١٤).

ارزیابی کاهش بیولوژیک افلاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی

تیپهای استفاده جهت تلقیح ، تیپهای B1، B2 ، G1 و G2 بوده که غلظت مورد استفاده برای تیپ B1 ۱۲ و ١٦ و برای سایر ۸ و ۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر بوده است. مخمر مورد استفاده ساکارومیسس سرویزیه PTCC 5052 بوده که از مرکز پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. به منظور تهیه سوسپانسیون مخمری، ابتدا مخمر را در محیط مالت براث کشت داده و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه و رساندن مخمر به فاز رشد لگاریتمی(با مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند) و اضافه نمودن ۳ و ٤ درصد به ازای مقدار محیط کشت مایع حاوی افلاتوکسین انتقال داده شد. پس از اضافه نمودن مخمر و افلاتوکسینها به محیط مایع و انتخاب تیمارهای مختلف، روند آزمایش در زمانهای صفر ، ۵ و ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی تغییرات رشد مخمر، جذب نوری آن در طول موج ٦٠٠ نانومتر با استفاده اسپکتروفتومتر قرائت شده و مقادیر افلاتوکسین نیز با استفاده از دستگاه HPLC تعیین گردید(٤، ٥ ، ٨ و ١٤).

انجام آزمایشات تجزیه بیولوژیک آفلاتوکسین در پودر ماهی

غلظتهای مورد استفاده افلاتوکسین در این مرحله برای B1 ۵۰ و ۱۰۰ و برای سایر تیپها ۲۵ و ۵۰ نانو گرم بر گرم و برای مخمر نیز ٤٪ درصد بوده است (٤ درصد از سوسپانسیون به ازای گرم پودر ماهی مورد استفاده). علت استفاده از غلظتهای فوق آنست که افلاتوکسین اضافه شده تحت تاثیر واکنشهای دیگر نظیر فوتواکسیداسیون تجزیه شده و در نتیجه از مقدار آن

کاسته می‌شود(۱۲). پس از اضافه نمودن ۲ و ٤ میلی لیتر از استاندارد افلاتوکسین (به ترتیب برای غلظتهای ۲۵ و ۵۰ نانو گرم بر گرم) به ۵۰ گرم از پودر ماهی و مخلوط کردن آن، نمونه ها 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 افلاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفت(٤، ۵ ، ۸ و ١٤).

به منظور تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده از نرم فزار SPSS و تست Anova یک طرفه و به منظور وجود ارتباط معنی دار ما بین هریک از گروهها از تست Duncan استفاده شده و در نهایت ارزش P مشخص گردید.

نتایج

نتایج آنالیز کمی و کیفی پودر ماهی کیلکا در برخی از کارخانجات استان مازندران در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان میدهد که غلظت تیپ B1 در کارخانه ۲، تیپ B2 در کارخانه ۳ ، تیپ G1 در کارخانه ٤ و تیپ G2 در کارخانه ۱ بیشتر از سایر واحدها بوده است.

نتایج کاهش بیولوژیک تیپهای B1 ، B2 ، G1 و G2 افلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی نشان میدهد که به هنگام استفاده از ساکارومیسس سرویزیه در دوز ۳ درصد، میزان کاهش پس از ۱۰ روز برای B1 ۹۲/۷- ۹۰/٦ درصد، برای B2 ٩٤- ۸۹/۸ درصد، برای G1 ۹۸/۸ و ۹۷/۳ درصد و برای G2 ٩٤/۸ و ۹۵ درصد بوده است (p< ۰/۰۵) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز کمی و کیفی تیپهای مختلف افلاتوکسین (ppb) در پودر تولید شده در برخی از کارخانجات پودر ماهی کیلکا استان مازندران

واحد تولیدی	کارخانه ۱			کارخانه ۲			کارخانه ۳			کارخانه ۴		
افلاتوکسین	میانگین نمونه‌برداری در ۳ ماه اول		میانگین- انحراف معیار	میانگین نمونه برداری در ۳ ماه اول		میانگین- انحراف معیار	میانگین نمونه برداری در ۳ ماه اول		میانگین- انحراف معیار	میانگین نمونه برداری در ۳ ماه اول		میانگین- انحراف معیار
B1	۱	۰/۸۵	۱/۰۴ ۰/۹۶±۰/۱۰a*	۱/۵	۱/۴۲	۲/۱۴ ۱/۶۸±۰/۳۹a	۱/۱	۱/۴۶	۱/۳۶ ۱/۳۰±۰/۱۸a	۰/۹۱	۱/۴۲	۱/۳۰ ۱/۲۱±۰/۲۶a
B2	۲/۸۳	۱/۳۱	۱/۲۵ ۱/۷۹±۰/۸۹b	۲/۰۱	۰/۵۷	۱/۵۴ ۱/۳۷±۰/۷۳b	۱/۵۲	۲/۳۵	۲/۲۴ ۲/۰۳±۰/۵۲a	۲/۳۱	۰/۶۵	۱/۵۶ ۱/۵۰±۰/۸۳b
G1	۰/۳۸	۱/۰۵	۰/۸۶ ۰/۷۶±۰/۳۴c	۱/۵۱	۱/۴۱	۰/۶۸ ۱/۲±۰/۴۵c	۰/۸۷	۰/۸۹	۱/۰۶ ۰/۹۴±۰/۱۰b	۱/۲۵	۱/۷۱	۱/۶۷ ۱/۵۴±۰/۲۵b
G2	۰/۷۹	۲/۱۱	۰/۵۶ ۱/۱۵±۰/۸۳c	۱/۲۱	۰/۷۳	۱/۱۵ ۱/۰۳±۰/۲۶d	۱/۱۱	۱/۱۵	۰/۸۵ ۱/۰۳±۰/۱۶c	۰/۸۹	۱/۰۱	۰/۷۵ ۰/۸۸±۰/۱۳c

*حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار می باشد

جدول شماره ۲- تغییرات افلاتوکسینهای B1 ، B2 ، G1 و G2 (میکروگرم بر لیتر یا ppb) در محیط کشت حاوی ساکارومیسس سرویزیه (۳ درصد) در زمانهای مختلف

افلاتوکسین / زمان (روز)	B1		B2		G1		G2	
	۱۲	۱۶	۸	۱۲	۸	۱۲	۸	۱۲
صفر	۱۰/۵۶a	۱۴/۲۱a	۴/۵۲a	۸/۶۱a	۵/۲۱a	۹/۲۶a	۴/۸۵a	۱۰/۲۴ a
۵	۰/۸۸b	۴/۵۳a	۰/۵۴a	۲/۱۶ b	۱/۱۹ b	۱/۲۵b	۲/۱b	۱/۷۵b
۱۰	۰/۷۷c	۱/۳۳b	۰/۴۶b	۰/۵۱b	۰/۰۶c	۰/۲۵c	۰/۲۵b	۰/۵۱ c
درصد کاهش	۹۲/۷	۹۰/۶	۸۹/۸	۹۴	۹۸/۸	۹۷/۳	۹۴/۸	۹۵

*حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار می باشد

به هنگام استفاده از ساکارومیسس سرویزیه در دوز ٤ درصد، میزان کاهش پس از ۱۰ روز به ترتیب ۹٤/٦– ۹۳/۳ درصد برای B1 ،۹۵/۸–۹٤/۹ درصد برای B2 ، ۹۲/۱ و ۹٦/۸ درصد برای G1 و ۹۷/۳ و ۹۷ درصد برای G2 بوده است (p< ۰/۰۵) (جدول شماره ۳). نتایج همچنین نشان می‌دهد که با افزایش یافتن دوز مخمر، میزان کاهش افلاتوکسین نیز بیشتر بوده است.

در جدول شماره ٤ تغییرات جذب نوری مخمر در زمانهای مختلف بهنگام استفاده از غلظت ۳ درصد مخمر نشان داده شده است. نتایج نشان میدهد که میزان افزایش رشد مخمر بعد از ۱۰ روز، در غلظت‌های B1 (۱۲) و B2 ، G1 و G2 (۸ ppb) ٦۸/٦٦ درصد بوده در حالیکه در غلظت های B1 (۱٦) و B2، G1 و G2 (۸ ppb و ۱۲)، ۷۱/۷۱ درصد بوده است (جدول شماره ٤). افزایش جذب نوری مخمر در زمانهای مختلف معنی‌دار بوده است (p< ۰/۰۵).

در جدول شماره ۵ تغییرات جذب نوری مخمر در زمانهای مختلف بهنگام استفاده از غلظت ٤ درصد مخمر نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان افزایش رشد مخمر بعد از ۱۰ روز، در غلظت‌های B1 (۱۲) و B2 ، G1 و G2 (۸ ppb) ۷۱/۸۸ درصد بوده در حالیکه در غلظت های B1 (۱٦) و B2 ، G1 و G2 (۸ ppb و ۱۲)، ۷۵/٥٦ درصد بوده است. افزایش جذب نوری مخمر در زمانهای مختلف معنی دار بوده است(p< ۰/۰۵). تغییرات جذب نوری مخمر در دو غلظت ۳ و ٤ درصد نسبت به هم معنی‌دار بوده (p<۰/۰۵) ولی مابین دوزهای مختلف افلاتوکسین ارتباط معنی داری وجود نداشته است.

جدول شماره ۳ – تغییرات افلاتوکسینهای B1 ، B2 ، G1 و G2 (میکروگرم بر لیتر) در محیط کشت حاوی ساکارومیسس سرویزیه (۴ درصد) در زمانهای مختلف

افلاتوکسین / زمان (روز)	B_1		B_2		G_1		G_2	
	۱۲	۱۶	۸	۱۲	۸	۱۲	۸	۱۲
صفر	۱۰/۵۶a	۱۴/۲۱ a	۴/۵۲ a	۸/۶۱ a	۵/۱a	۹/۲۶a	۴/۸۵ a	۱۰/۲۴a
۵	۱/۳۶ b	۳/۱۴b	۰/۶۵ b	۱/۴۱b	۰/۶۹a	۰/۵۶b	۱/۲۷b	۰/۴۷b
۱۰	۰/۵۶b	۰/۹۴ c	۰/۲۳c	۰/۳۶b	۰/۴۱b	۰/۲۹b	۰/۱۳c	۰/۳۰b
درصد کاهش	۹۴/۶	۹۳/۳	۹۴/۹	۹۵/۸	۹۲/۱	۹۶/۸	۹۷/۳	۹۷

*حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار می باشد

جدول ۴ شماره – تغییرات جذب نوری ساکارومیسس سرویزیه (۳ درصد) در محیط کشت حاوی افلاتوکسینهای B1 ، B2 ، G1 و G2 در زمانهای مختلف

افلاتوکسین / زمان (روز)	B1(۱۲ ppb) B2 ،G1 ،G2 (۸ ppb)	B1(۱۶ ppb) B2 ،G1 ،G2 (۱۲ ppb)
صفر	۱/۳۵۱a	۱/۳۴۵a
۵	۲/۷۲۵b	۲/۳۱۴b
۱۰	۴/۳۱۱c	۴/۷۵۶b
درصد افزایش	۶۸/۶۶	۷۱/۷۱

*حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار می باشد

جدول شماره ۵ - تغییرات جذب نوری ساکارومیسس سرویزیه (۴ درصد) در محیط کشت حاوی افلاتوکسینهای B1 ، B2 ، G1 و G2 در زمانهای مختلف

افلاتوکسین / زمان (روز)	(ppb ۱۲)B1 (ppb ۸) G2،G1 ، B2	(ppb ۱۶)B1 (ppb ۱۲) G2 ،G1 ، B2
صفر	۱/۵۶۴a	۱/۵۷۰a
۵	۳/۳۲۵b	۳/۶۵۷b
۱۰	۵/۵۶۲c	۶/۴۲۵c
درصد افزایش	۷۱/۸۸	۷۵/۵۶

*حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار می باشد

جدول شماره ۶ - تغییرات افلاتوکسینهای B1 و B2 ، G1 و G2 در پودر ماهی حاوی ساکارومیسس سرویزیه (۴ درصد) در زمانهای مختلف

افلاتوکسین / زمان (روز)	B1		B2		G1		G2	
	۵۰	۱۰۰	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰
صفر	۵۱/۲ a	۱۰۵/۴a	۶/۱a	۱۱/۲a	۵/۴۲a	۱۲/۲a	۶/۷۵a	۱۱/۸۹a
۵	۲۱/۲۶b	۳۵/۵۶a	۲/۴۵b	۳/۱۶b	۲/۱۱b	۳/۵۶a	۲/۸۹b	۳/۴۲b
۱۰	۷/۲۱c	۹/۳۰b	۰/۷۵c	۱/۴۵c	۰/۵۶b	۱/۰۴b	۰/۵۵b	۱/۱۱b
درصد کاهش	۸۵/۹۱	۹۰/۷۹	۸۷/۷۰	۸۷/۰۵	۸۹/۶۶	۹۱/۴۷	۹۱/۸۵	۹۰/۶۶

*حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار می باشد

نتایج تغییرات افلاتوکسین در پودر ماهی حاوی ٤ درصد مخمر ساکارومیسس سرویزیه در زمانهای مختلف در جدول شماره ٦ نشان داده شده است. نتایج نشان میدهد که میزان کاهش (پس ز ۱۰ روز) ۲۵ و ۵۰ به ترتیب ۹۱/۸۵ و ۹۰/٦٦ درصد و میزان کاهش تیپهای B1 در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ به ترتیب ۸۵/۹۱ و ۹۰/۷۹ و تیپهای B2 و G1 در دو غلظت ۲۵ و ۵۰ به ترتیب ۸۷/۷۰ و ۸۷/۰۵ درصد و ۸۹/٦٦ و ۹۱/٤۷ درصد بوده است($p< ۰/۰۵$). دامنه کاهش تیپهای مختلف افلاتوکسین بین ۸۷/۰۵ درصد تا ۹۵/۳۱ درصد بوده است. میزان کاهش تیپهای مورد بررسی به ترتیب $B2 < B1 < G1 < G2$ بوده است(جدول شماره ٦).

بحث

مطالعات مختلفی در ارتباط با کنترل بیولوژیک قارچهای بیماریزا و متابولیتهای آنها توسط مخمر انجام گرفته است. نتایج نشان داد که ساکارومیسس دارای اثر مهار کننده بر فعالیت قارچهای بیماریزا فوق بوده است. مهمترین فاکتور مهارکننده رشد کپک، کاهش مواد غذایی در محیط بوده که مخمرها با رشد خود و رقابت با کپک باعث این امر میشوند. مطالعات نشان داده که مخمرهای ساپروفیت جدا شده از میوه جات قادر به کاهش افلاتوکسین میباشند. مخمرها بدلیل 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 بعنوان ابزارهای بیولوژیک در زمینه کنترل آلاینده‌های میکروبی و متابولیتهای سمی آنها در مواد غذایی استفاده می‌شود. بهنگام استفاده از مخمرها، یا از سلول کامل استفاده شده یا آنکه از دیواره سلولی آن به منظور کاهش افلاتوکسین استفاده می‌گردد. مخمر ساکارومیسس سرویزیه از ارگانیسمهایی است که بعنوان ماده جاذب بیولوژیک افلاتوکسین مورد استفاده قرار می‌گیرد. این

مخمر دارای ٤٠ تا ٤٥ درصد پروتئین بوده و سرشار از ویتامینهای گروه B می‌باشد. نتایج نشان داده که بهنگام استفاده از دیواره سلولی این مخمر، میزان افلاتوکسین و سایر توکسینها بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد. دیواره سلولی ساکارومیسس حاوی پلی ساکاریدهایی نظیر گلوکان و مننان بوده که مکانیسم‌های مختلف پیوند با توکسین را فراهم می‌نمایند (پیوندهای هیدروژنی، یونی و هیدروفوبی) (۱۷ ، ۱۸ و ٢٤).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ساکارومیسس سرویزیه مورد استفاده قادر به کاهش تیپهای مختلف افلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی و پودر ماهی میباشد ولی با این وجود میزان کاهش افلاتوکسین در پودر اندکی کمتر بوده است که این امر به دلیل در دسترس نبودن افلاتوکسین در محیط جامد بوده در صورتیکه در محیط براث، افلاتوکسین در دسترس مخمر بوده و واکنش تجزیه و غیر فعال کردن آن با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد. تحقیقات مختلفی در ارتباط بااستفاده از مواد جاذب شیمیایی و بیولوژیک در مواد غذایی و خوراک طیور انجام گرفته است. در مطالعه ای ساکارومیسس سرویزیه ، زئولیت و بی سولفیت سدیم به منظور کاهش افلاتوکسین در زنجیره غذایی جوجه های گوشتی استفاده کرده و تاثیر آنها بر پارامترهایی نظیر رشد، ضریب چاقی، ضریب تبدیل عذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که جوجه های تغذیه شده با جیره حاوی آفلاتوکسین بهمراه ساکارومیسس سرویزیه، دارای بالاترین وزن ، کمترین درصد تلفات و بهترین تبدیل غذایی بودند. نتایج تحقیق خسروی و همکارانش تایید کننده مطالعه حاضر می‌باشد (۱).

مطالعات نشان داد که 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 سمهای مختلفی تحت تاثیر خواهند گرفت (۱۳). نتایج مطالعه مذکور تایید کننده مطالعه حاضر میباشد. به عبارت دیگر تیپهای مختلف افلاتوکسین، به علت ساختار مولکولی مشابه، تحت تاثیر تجزیه مخمری قرار گرفته‌اند. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان کاهش تیپهای مختلف افلاتوکسین در محیط کشت آزمایشگاهی در غلظت ۳ درصد ساکارومیسس بین ٩٤/٨ تا ٩٨/٨ درصد، در غلظت ٤ درصد ٩٢/١ تا ٩٧/٣ درصد و در پودر ماهی بین ٨٩/٦٦ تا ٩١/٨٥ درصد متغیر بوده است.

در ارتباط با تجزیه تیپهای مختلف آفلاتوکسین توسط مخمر کاندیدا کروزه ای مطالعات صورت گرفته و نتایج آن نشان دادند که مخمر مورد استفاده باعث کاهش معنی‌دار تیپهای مختلف افلاتوکسین در محیط کشت و پودر ماهی کیلکا می‌گردد(۳).

در مطالعه انجام شده توسط Paskericius و همکارانش از چند مخمر به منظور کاهش توکسینهای قارچی استفاده گردید. توکسینهای مورد استفاده مورد استفاده شامل زرالنون، دزوکسی نیوالنون و افلاتوکسین‌ها بوده و قارچهای انتخاب شده نیز ساکارومیسس سرویزیه، کلاوروماپسس ماریکسانوس، ژئوتریکوم فرمنتانس، Rhodotorula glutinis, Metschnikowia pulcherima, و رودوتورولا mulcilaginosa بودند. نتایج نشان داد که با اضافه نمودن مخمرهای مذکور در جیره غذایی، توکسینهای انتخاب شده بطور چشمگیری کاهش نشان می‌دهند. علاوه بر این، رودوتورولا Metschnikowia باعث خنثی نمودن و کاهش ۱۰۰ درصدی افلاتوکسین‌ها می‌گردند. سایر مخمرهای مورد استفاده تاثیر چندانی بر افلاتوکسین‌ها نداشته ولی بر سایر توکسینها تاثیر خنثی کننده دارند(١٦). نتایج تحقیق حاضر نشان میدهد که ساکارومیسس باعث کاهش معنی دار تیپهای مختلف افلاتوکسین شده و غلظت آنها به پائین تر از دوز استاندارد کاهش می‌دهد (استاندارد اروپا برای b1، ppb ۲ و برای مجموع ppb ٤ می‌باشد).

در مطالعه‌ای، از ساکارومیسس سرویزیه، کلروتتراسیکلین و مخلوط ایندو به منظور کاهش افلاتوکسین در جیره غذایی جوجه های گوشتی استفاده کرده و تاثیر تیمارهای مختلف را بر وزن بدن و پارامترهای سرمی نظیر آلبومین و پروتئین مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که ساکارومیسس دارای اثر مهار کننده بر افلاتوکسین بوده و وزن و پارامترهای سرمی را بطور معنی‌داری افزایش می‌دهد(٦).

در مطالعات دیگر در ارتباط با بررسی کمی و کیفی ماشین آلات تولید کننده پودر، ابزاآلات و وسایل، پرسنل، کف کارخانه و پودر ماهی کیلکا نشان داده شد که ، قارچهای گروه آسپرژیلوس دارای تراکم بالایی بوده و از پودر دپو شده در کف کارخانه و برخی از ابزارآلات جدا شده اند. البته برخی دیگر از قارچها نظیر فوزاریوم ، آلترناریا، پنی سیلیوم نیز جدا شده اند ولی تراکم آسپژیلوس بیشتر بوده است(۲). بنابراین پتانسیل تولید افلاتوکسین در پودر ماهی وجود خواهد داشت. نتایج تحقیق حاضر نشان میدهد که پودر ماهی کیلکای شاهد دارای مقادیری متفاوتی از افلاتوکسینهای B1 ، B2 ، G1 و G2 بوده است. این امر نشاندهنده وجود آسپرژیلوس در پودر بوده و اینکه شرایط آن برای تولید افلاتوکسین فراهم شده و تولید توکسین کرده است.

پودر 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 منهادن، هرینگ تهیه میگردد. آلودگی پودر در هنگام تولید، دپو کردن در کف کارخانه و یا انبارداری رخ میدهد. یکی از راههای آلودگی پودر ماهی، مخلوط نمودن آن با غذاهایی با منشاء گیاهی بوده که در اکثر موارد آلوده به افلاتوکسین میباشند. بنابراین جیره غذایی بایستی به نوعی انتخاب شود که عاری از هرگونه غذای آلوده به افلاتوکسین باشد. بر اساس گزارش FAO وجود مایکوتوکسینها در غذای آبزیان در آسیای جنوب شرقی بسیار بالا میباشد. آلودگی جیره غذایی ماهیان پرورشی به افلاتوکسین مشکل اساسی در نواحی گرمسیری بوده که علت عمده آن فرآوری ناقص پودر و روشهای نگهداری نامناسب آن بوده است. به منظور کاهش افلاتوکسین در پودر بایستی مواردی نظیر خشک کردن به موقع پودر و کاهش رطوبت آن به ۱۲-۱۱ درصد و یا پائین تر مورد توجه قرار گیرد. پودر ماهی کیلکا پس از تولید بعلت گرم بودن در کف کارخانه دپو شده که گرمای بالای آن باعث جذب رطوبت محیط شده و در نتیجه محیط مناسب برای رشد و تکثیر اسپورهای قارچی فراهم می‌شود. از طرفی کنترل مستمر دستگاهها، محیطهای مورد استفاده از نظر آسپرژیلوس حائز اهمیت می‌باشد (۹، ۱۰ ، ۱۱ ، ۲۱ و ۲۵).

نتیجه‌گیری کلی که از طرح حاصل میشود آنست که مخمر ساکارومیسس سرویزیه قادر به کاهش تیپهای مختلف افلاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی و پودر ماهی بوده و میتوان از آن بعنوان ابزار بیولوژیک در جهت کنترل افلاتوکسین استفاده کرده و با دوزهای مشخص به پودر ماهی اضافه نمود.

منابع

۱- خسروی، ع. مدیرصانعی، م. (۱۳۷۸)،مقایسه برخی از روشهای مورد استفاده در کاهش اثرات آفلاتوکسین برروی شاخصهای تولیدی جوجه های گوشتی مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ٥٤ ، شماره ۲، ٦٦ -٥٩.

۲- سلمانی، ع. صفری، ر. غلامی پور ، س (۱۳۷٦). بهینه سازی تولید پودر ماهی کیلکا. گزارش نهایی. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر.

۳- محمدی، م. صفری، ر (۱۳۷۸) استفاده از کاندیدا کروزه ای به منظور کاهش افلاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی و پودر ماهی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد واحد بندرعباس.

4- AOAC official Methods .(1999): 7th Edition volume II, Chapter 49 Natural Toxins. P.273.

5- Adsule, R.N. Salunkhe, D.K. (1984): Aflatoxins in foods and feeds. Metropolitan Book Co. p.455

6- Celyk, K. Denl, M. (2003): Reduction of toxic effects of Aflatoxin B1 by using Baker yeast (Saccharomyces cerevisiae) in growing Chickes diets. R.Bras,Zootec, v 32(3) p. 615-619.

7- CAST, 1989. Mycotoxins. Economic and health risks. Task Force Rep. No. 116. November (1989): Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA.

8- Commission Directive 98/53/EC of sampling & analysis methods for control levels for certain contaminations in foods stuffs. (1998):

9- Dragoni, I. Cantoni, C. Papa, A. Vallone, L (2000). Muffe, alimenti ecotossicosi. Citta`StudiEdizioni. UTET Libreria srl, Milano, Italia. ISBN 88-251-7187-0.

10- Dutta, TK. Das, P. (2000): Isolation of aflatoxigenic strains of Aspergillus and detection of aflatoxins B1 from feeds in India. Mycopathologia 151:29–33.

11- Fegan, D. (2005): Mycotoxins: the hidden menace? http:// www.alltech.com/.

12- Hussein, S.H. Brasel, J. M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology. Vol. 167.P.101-134.

13- Huwing, A. Freimund, S. Kappeli, O. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters 122 179-188.

14- Hyogo International Center. (1999): Japan International Cooperation Agency- Textbook for group training course in mycotoxin inspection in food. P.40

15- Moss, M.O. (1996): Centenary review. Mycotoxins. Mycol. Res. 100, 513-523.

16- Paskevicius, A. Bakutis, B. Baliukoniene, V. (2006): The search for ecologically safe means of mycotoxin detoxification in fodder. Ekologija 3 p. 128-131.

17- Santin, E. Paulillo, A.C. Nakagui, L.S.O. Alessi, A.C. (2003): Evaluation of cell wall yeast as adsorbent on Ochratoxin in Broilers diets. International Journal of Poultry Science 2(6) p. 465-468.

18- Santin, E. Maiorka, A. Krabbe, E.L. Paulillo, A.C. Alessi, A.C. (2002): Effect of hydrated Sodium Calcium aluminosilicates on the Prevention of the toxic effects of Ochratoxin. Journal of Applied Poultry Research. Vol. 11.P.22-28.

19- Santin, E. Paulillo, A. C. Krabbe, E. L. Alessi, A. C. Polveiro, W.J. C. Maiorka, A. (2003): Low Level of aflatoxin in broiler at experimental Conditions. Use of Cell Wall Yeast as adsorbent of aflatoxin. Archives of veterinary science. Vol. 8. P. 51-55.

20- Santin, E. A. Maiorka, M. Macari, M. Grecco, L.C. Sanchez, T.M. Okada, A.M. Myasaka, (2001): Performance and Intestinal Mucosa Development in Broiler Chickens Fed Ration Containing Saccharomyces Cerevisiae Cell Wall. J. Appl. Poult. Res., 10:236-244.

21- Spring, P. (2005): Mycotoxins – a rising threat to aquaculture. Feed mix 13:5

22- Stanley, V. G. Ojo, R. Woldesenbet, S. Hutchinson, D. H. (1993): The use of Saccharomyces cerevisiae to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poultry Science. Vol. 72. P. 1867-1872.

23- Sweeney, M.J. Dobson, A.D.W. (1998): Review: mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. Int. J. Food Microbiol. 43,141-158.

24- Vargal , J. Rigol, K. Taboril, K. (1998): Degradation of mycotoxins by filamentous fungi. Int.J.Food. Microbiol. 43 p. 141-158.

25- Yiannikouris A., Jouany J. (2002): Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. Animal Research. Vol. 51. P. 81-99.