وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ـ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان

عنوان :

استفاده از اسانس مرزه جهت جلوگیری از تولید آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس درخوراک آبزیان

مجری :
لاله یزدان پناه گوهرریزی

شماره ثبت
٤٠٢٧٠

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ـ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان

عنوان پروژه : استفاده از اسانس مرزه جهت جلوگیری از تولید آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس درخوراک آبزیان

شماره مصوب : ۸۸۰۲۶-۱۲-۴۵-۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : لاله یزدان‌پناه گوهرریزی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : لاله یزدان‌پناه گوهرریزی

نام و نام خانوادگی همکاران : مصطفی شریف روحانی- عیسی شریف پور- ابوالفضل سپهداری - داوود درویشی - علی اصغر ولی- محمدرضا کدوری- نادر نخعی

نام و نام خانوادگی مشاوران : -

نام و نام خانوادگی ناظر : -

محل اجرا : استان کرمان

تاریخ شروع : ۸۹/۵/۱

مدت اجرا : ۸ ماه

ناشر : مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

شمارگان (تیتراژ) : ۲۰ نسخه

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۱

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : استفاده از اسانس مرزه جهت جلوگیری از آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس درخوراک آبزیان

کد مصوب :۸۸۰۲۶-۱۲-۴۵-۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۰۲۷۰ تاریخ : ۹۱/۱/۱۶

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم لاله یزدان‌پناه گوهرریزی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۰/۵/۲۶ مورد ارزیابی و با نمره ۱۷/۶ و رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

پیشگفتار ۱
چکیده ۴
۱-مقدمه ۵
۱-۱- مشخصات اسانس گیاه مرزه ۵
۱-۲- ترکیبات شیمیایی اسانس مرزه ۱۰
۱-۳- خواص دارویی گیاه مرزه ۱۱
۱-۴- مایکوتوکسینها ۱۶
۱-۵- آفلاکتوسین و انواع آن ها ۱۷
۱-۶- روشهای تعیین آفلاکتوسین ۲۰
۱-۷- آفلاکتوسین در غذای ماهی و علائم آفلاتوکسیکوزیز ۲۰
۱-۸-مدیریت و کنترل ۲۳
۱-۹- شرایط نمونه برداری ۲۳
۲- مواد و روشها ۲۵
۲-۱- تهیه اسانس مرزه ۲۵
۲-۲- تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ ۲۵
۳- نتایج ۲۸
۳-۱- نتایج در نمونه خوراک آبزیان ۳۱
۳-۲- آنالیز واریانس فاکتوریل ۳۲
۴- بحث ۳۴
۴-۱- مدیریت و پیشگیری از آفلاتوکسین ۳۶
۵- نتیجه گیری ۳۹
منابع ۴۱
پیوست ۴۳
چکیده انگلیسی ۵۳

پیشگفتار

در حال حاضر علاقه فزاینده ای به گیاهان معطر و دارویی در زمینه صنعت و تحقیقات علمی وجود دارد و علت آن خواص ضد میکروبی وآنتی اکسیدانی این مواد است. قارچها از عوامل مهم فساد مواد غذایی در طول انبار داری و ذخیره سازی محسوب می شوند که از یک طرف باعث کاهش کیفیت و کمیت مواد غذایی شده و از سوی دیگر به علت پتانسیل تولید مایکوتوکسین ها باعث ایجاد خطراتی برای مصرف کننده می شوند . یکی از اصول مهم جهت جلوگیری از بروز اینگونه خطرات وکنترل بیماری ها، بهداشت و کنترل آلودگی های خوراک آبزیان می باشد. زیراخوراک بیشترین اقلام ورودی به مزارع پرورش ماهی را تشکیل میدهد و می تواند به صورت مستقیم درآبزی ایجاد بیماری نماید و یا باعث ایجاد زمینه مناسب برای بروز بیماریهای دیگر درآبزیان گردد. همچنین می تواند با ایجاد آلودگی در چرخه تولید غذای انسان، مسبب ایجاد بیماری در انسان شوند. بطور خلاصه جهت تولید غذای سالم برای انسان، باید عوامل بیماری زا را از ابتدای چرخه تولید غذا ،یعنی ازخوراک کنترل کرد. زیرا مایکوتوکسین ها ترکیباتی با ساختمانهای شیمیایی متفاوت با وزن مولکولی کوچک می باشند که متابولیت ثانویه کپک ها و قارچها هستند که بر روی محصولات کشاورزی قبل یا بعد از برداشت،طی حمل ونقل و نگهداری رشد می کنند.اثرات مضر مایکوتوکسین ها بر روی سلامتی انسان و دام بیش از ۸۰ سال است که شناخته شده است . اما مطالعه روی مایکوتوکسین های مولد بیماری از سال ۱۹۶۰ زمانی که یک نوع سم از آسپرژیلوس فلاووس استخراج گردیدشروع شد. نظر به اهمیت مایکوتوکسین ها در غذای انسان، استانداردهای بین المللی حد مجاز آنها در مواد غذایی از جمله خشکبار تعیین شده است که برای حمایت از حقوق مصرف کنندگان و حضور در بازارهای جهانی،تولید کنندگان را ملزم به رعایت آن میکند.با توجه به اینکه از هر ۱۰۰ گرم مرزه تقریبا ۲ تا ۵ سی سی اسانس بدست می آید و با بررسی دیگر منابع و برخی دیگر از گیاهان دارویی که در مقایسه با مرزه از قدرت ضد قارچی ضعیف تری برخوردار بودند بر آن شدیم تا با افزودن اسانس مرزه به خوراک آبزیان و آنالیزهای انجام شده اثر بخشی این اسانس را در جلوگیری از تولید سم آفلاتوکسین بررسی نمائیم.

بررسی منابع

مسکوکی و همکاران در سال ۱۳۸۵ بر روی کنترل رشد قارچ آسپرژیلوس (پارازیتیکوس) توسط اسانسهای طبیعی در محیط کشت مصنوعی تحقیقاتی انجام داده اند. اسانسهای طبیعی شامل گیاهان آویشن، مرزه ، نعناء ، لیمو و اوکالیپتوس بود که در ۶ غلظت۰ ، ۲۰۰،۴۰۰ ، ۶۰۰ ،۸۰۰ ،۱۰۰۰ ppm بر روی قارچ مورد بررسی قرار گرفت و ضمن تعیین بهترین اسانس حداقل غلظت بازدارندگی آن نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که در بین اسانسهای مورد آزمایش بر روی قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس به ترتیب اسانس آویشن و مرزه بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد داشته و حداقل غلظت بازدارندگی اسانس مرزه ۴۰۰ ppm بود.

Razzaghi- Abyaneh وهمکاران نیزدر سال ۲۰۰۸ تحقیقاتی درزمینه اثرات ممانعتی اسانس گیاه مرزه(*Saturejahortensis*) بر روی رشد و تولید آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس انجام داده اند. در این تحقیق این نتیجه عاید شد که اسانس گیاه مرزه دارای اثرات ممانعتی قوی بر روی تولید آفلاتوکسین B_1 (AFB_1) وG_1(AFG_1) توسط قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس است. در این تحقیق همچنین این نتیجه بدست آمد که کارواکرول و تیمول موجود در اسانس مرزه از عوامل مهمی است که در کنترل آفلاتوکسین ایفای نقش می کنند.

در تحقیقی دیگر Dikbas و همکاران در سال ۲۰۰۸ ، اثر عصاره متانولی گیاه مرزه(*Saturejahortensis*) را درکنترل قارچ آسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی قرار دادند. نتیجه این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه مرزه اثرات ضد قارچی قوی دارد.

بر اساس نتایجی کهاز تحقیق روی قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس(*Aspergillus parasiticus*) توسط DusaneeThanaboripatو همکاران در سال ۲۰۰۷بدست آمده اسانس مرزه درغلظت‌های ۱۰۰۰،۶۰۰ ،۵۰۰ ،۳۰۰،۲۰۰ppmبیشترین اثر ضدقارچی را از خود نشان داده، به طوری که بر روی هر دو سویه مورد آزمایش آسپرژیلوس پارازیتیکوس و فومیگاتوس اثربازدارندگی بسیار خوبی ازخود نشان داده است. این اثر بازدارندگی به وسیله اندازه گیری رشد محوری قارچ در محیط کشت بدست آمده است.

در این تحقیق اسانس گیاه مرزه به میزان ۸۱– ۷۰٪ از رشد این دو سویه قارچ جلوگیری نموده، به شکلی که اثر ضد قارچی این اسانس در غلظت ppm600 به حداکثر میزان خود رسید. براساس تحقیقات انجام شده در مطالعات گذشته اثر بازدارندگی و ضد قارچی اسانس این گیاه به وجود ترکیبهای فنلی کارواکرول نسبت داده شده است .

LokmanAlpsoy و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ بر روی اثرات ممانعتی اسانس بر روی فعالیت آفلاتوکسین تحقیق نموده اند و به این نتیجه رسیده اند که فعالیتهای ضد قارچی اسانسهای گیاهان دارویی می تواند مربوط به عوامل کارواکرول و تیمول باشد . همچنین دریافتند که بیوسنتز آفلاتوکسینها ، تولید آفلاتوکسینها و در کل رشد قارچ آسپرژیلوس رابطه متقابلی با وجود اسانسهای گیاهی دارد که این اثرات متقابل قابل اندازه گیری می باشد.

LiuRuiqian و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی کنترل بیولوژیکی آسپرژیلوس فلاووس و تولیدات آفلاتوکسین تحقیقاتی انجام داده اند و به این نتیجه رسیدند که آفلاتوکسین متابولیت های ثانویه سرطان زا و موتاژنیک هستند که توسط دو قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در تعداد زیادی از مواد غذایی ایجاد میشوند و با بسیاری از عوامل بیولوژیک قابل کنترل می باشد.

محبوبی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۸ بر روی اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی اسانسهای مرزه و مرزنجوش و اکالیپتوس تحقیقاتی انجام داده اند و به این نتیجه رسیدند که اسانس های گیاهی بر روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس موثر است .Boyraz و همکاران در سال ۲۰۰۶ در طی تحقیقی نشان دادند که اسانس مرزه اثرات ممانعتی قوی بر رشد قارچ آسپرژیلوس داشته است. Sokovic و همکاران درسال ۲۰۰۲ در بررسی چند گیاه آروماتیک که یکی از آنها گیاه مرزه بود نشان دادند که اسانس گیاه مرزه بر روی برخی قارچها خاصیت ضد قارچی دارد.

Sefidkon و همکاران در سال ۲۰۰۶در تحقیقی موفق به بررسی ترکیبات و مواد موثره موجود در اسانس مرزه (کارواکرول ، تیمول ، ترپینن و سیمن) گردیدند.

Sanchez و همکاران در سال ۲۰۰۵ درتحقیقی که انجام دادند موفق به بررسی ترکیبات فیتوکمیکال و خواص ضد قارچی اسانس مرزه گردیدند.

دادار و همکاران نیزدر سال ۱۳۸۵ با مقایسه سطوح مختلف عصاره گیاه مرزه و تاثیر آن بر عملکرد جوجه های گوشتی به این نتیجه رسیدند که مصرف اسانس گیاه مرزه نه تنها مشکلی در روند رشد ایجاد نکرد بلکه مصرف آن در سطح ۱۰۰ میلی گرم در کیلو گرم جیره غذایی در زمانی که سرعت رشد طیور بالاست تفاوت معنی داری با تیمار شاهد داشت و ضریب تبدیل را کاهش داد.

چکیده

اسانس گیاه مرزه (Satureja hortensis) با نام انگلیسیSummer savory به علت داشتن ترکیبات فنلی، کارواکرول (Carvacrol) ،سیمن(Symene) و ترپینن(Terpinene) دارای خاصیت ضد قارچی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس آبی مرزه در غلظتهای۳۰۰ ، ۴۰۰ ، ۵۰۰ و ۶۰۰ ppm بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس(PTCC5006)در محیط کشت PDA و اثر ممانعت از تولید آفلاتوکسینهای ,B1 G1 ,B2و G2در خوراک آبزیان بود. تجزیه و تحلیل داده ها باآزمون دانکن در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح ۰/۰۱ انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که اسانس مرزه درغلظت هایppm500 و بالاتر دارای اثر ممانعت کننده از رشد آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی می باشد. مقدار تولید کل آفلاتوکسینهای ,B1, B2 G1, G2 در خوراک آبزیان آلوده شده با قارچ آسپرژیلوس فلاوس پس از ۲۰ روز مجاورت باغلظتهای ۰ ، ۴۰۰ ، ۵۰۰ و ۶۰۰ ppm اسانس آبی مرزه به ترتیب ۰/۴۳، ۲/۵۲، ۱/۷۵ ، ۱/۴۶ و پس از ۴۰ روز به ترتیب ۱/۷۸، ۰/۸۲، ۰/۸۶، ۰/۸۴ و پس از ۶۰ روز به ترتیب ۲/۶۲، ۰/۸۲، ۰/۵۲، ۰/۱۵ بدست آمد. افزایش غلظت کل آفلاتوکسینها درتیمارهای آزمایشی در دوره زمانی ۲۰ روز نسبت به تیمار شاهد نتیجه ای خارج از انتظار بوده که روشن شدن دلایل آن نیازمند مطالعات بیشتری است.

کلید واژه ها : مرزه[۱]، قارچ[۲]،آفلاتوکسین [۳]،خوراک آبزیان[۴]

[1]- *Satureja hortensis*
[2]- fungal
[3]- Aflatoxin
[4]- Animal feed

۱- مقدمه

۱-۱- مشخصات گیاه اسانس مرزه

مرزه که از گیاهان خانواده نعناء به شمار می رود، در فاصله ماه‌های تیر تا شهریور در ایران به گل می‌نشیند. مرزه گیاهی معطر یکساله و دارای ساقه های متعدد ، افراشته و یا ساقه ها کمانی می باشد . این گیاه چند ساله علفی یا با قاعده چوبی و به فرم بالشتکی است که بومی مدیترانه شرقی و جنوب غربی آسیاست. اصولا گیاهانی کوتاه قد بوده و ارتفاع آنها حداکثر تا ۶۰ سانتی متر میرسد .(۲) غده های ترشحی بدون پایک و به شکل دایره ای کوچک و در روی اندامهای مختلف دیده می شود. تراکم کرکها در گونه های مختلف متغیر است و بر اساس آن گیاه برنگهای سبز یا خاکستری و نقره ای دیده میشود. با توجه به تراکم کرکهای غده دار و غده های ترشحی ، میزان عطر گونه های مختلف و اسانس آنها متغیر می باشد. غده های ترشحی معمولا در سطح تحتانی برگ با تراکم بیشتر دیده می شوند ولی در بعضی گونه ها در هر دو سطح برگ با تراکم یکسان دیده میشوند.
برگ‌های آن نرم و متقابل وتقریبا بدون دم برگ وباریک ونوک تیز و پوشیده ازکرک ودارای تارهای غده‌ای فراوان اسانس‌داراست. گیاه مرزه درمرحله گل دهی حاوی حداکثر مقدار اسانس میباشد، از اینرو برداشت پیکر رویشی آن از این مرحله آغاز می شود. رنگ غده های ترشحی از سبز تا زرد و یا قرمز و نارنجی متغیر است. (۵) قسمت های هوایی به انضمام برگ ها که در بعضی مواقع، فقط قسمت های فوقانی گل دار جمع آوری می گردد، به صورت خوشه ای دسته شده یا بر روی قاب های چوبی پهن کرده و در سایه و با حرارت مصنوعی کمتر از ۴۰ درجه سانتی گراد خشک می شوند در صورت مراقبت مناسب از نظر آبیاری رسیدگی به خاک و عناصر موجود در آن جهت رویش مناسب گیاه، میتوان در طول سال ۲ یا حتی ۳ بار محصول برداشت نمود. اولین برداشت همواره در آغاز گلدهی انجام می گیرد. دومین برداشت معمولاً اواخر شهریور ، اوایل مهر مناسب میباشد.برداشت محصول توسط ماشین یا داس صورت می گیرد و کلیه اندام های هوایی گیاهان برداشت میشوند. پس از جمع آوری محصول را خشک می کنند. دمای مناسب برای خشک شدن اندام های رویشی مرزه ۴۰ درجه سانتی گراد است. مقدار عملکرد وزن خشک پیکر رویشی بین۱/۴تا ۱/۸ تن در هکتار است .(۹) اسانس مرزه از تقطیر با بخار آب از برگ ها و سرشاخه های برگدار حاصل می شود. این اسانس مایعی بی رنگ یا مایل

به زرد و دارای عطر و بوی تند و زننده ای و با مزه ای که طعم فلفل را به یاد می آورد، می باشد. این گیاه دارای ۸/۰ تا ۵/۱ درصد اسانس به همراه تانن، رزین و موسیلاژ می باشد. اسانس مرزه درصنایع غذایی کاربرد دارد. (۱) اهمیت آسپرژیلوس ها از دیدگاه بهداشتی و بیماریزایی به دلیل تولید آفلاتوکسین می باشد. این سموم اگر بطور مستمر استفاده شوند بر روی انسان و دام اثرات سوء خواهد گذاشت که این اثرات به ۳ حالت تولید سم ، اثرات آلرژی زایی و عامل عفونت میتواند ایجاد بیماری کند. تاکنون حدود ۱۲۰ قارچ شناسایی شده اند که قادر به تولید سم می باشند و یکی از آنها آسپرژیلوس فلاووس است که مولد سم آفلاتوکسین است . از این ۱۲۰ نوع قارچ ۲۴ گونه آن تولید کننده سم آفلاتوکسین می باشند .(۲۱)تاکنون نزدیک ۱۲ نوع آفلاتوکسین نیز شناسایی شده است . بسیاری ازکپک ها آفلاتوکسین تولید می کنند اما مهم ترین کپک های توکسین زا *A.flavus,A.parasiticus*است . برخی از این سوشها بر روی غلات تا ۲۰۰۰ میکروگرم در گرم توکسین تولید میکنند . (۳۵)

با توجه به مطالعه میکروفلور انواع محصولات کشاورزی و در اغلب محیط های جغرافیایی معمولا قارچهای جنس *Aspergillus* همیشه بیشترین تکرار را در جدایه ها دارند و همیشه این قارچ ها در اغلب محیطهای اکولوژیک بعنوان یکی از ساپروفیتهای غالب جدا شده مطرح می باشد. این قارچها در طول دوران طولانی تکامل خودشان توانائی ها را بدست آوردند تا ضمن حفظ بقای خودشان در بدترین شرایط همواره در اغلب محیط ها حضور داشته باشند . یکی از ویژگیهای قارچهای جنس *Aspergillus* این است که این قارچها هم بعنوان قارچهای ساکن خاک شناخته شده اند (بدلیل حضور با جمعیت های بالا در خاک و آداپته شدن به شرایط خاک) و هم بعنوان قارچهای انباری مطرح می باشند و این چیزی نیست جز بدست آوردن تواناییهای خاصی که این قارچها را قادر می سازد در اغلب محیطهای اکولوژیک و جغرافیایی با سایر رقیبان خود به رقابت بپردازند و در حقیقت موفق تر از آنها باشند.برای داشتن محصولی سالم و عاری از سموم قارچی مسئله از دو جنبه قابل بررسی است . یکی شناخت شرایط تولید آفلاتوکسین و روشهای پیشگیری از تولید آن و دیگری شناخت روشهای سالم سازی محصول آلوده به این سموم است. از مهمترین عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین میتوان به ژنوم ارگانیزم ، رطوبت ، درجه حرارت ، نوع سوبسترا واثرات متقابل میکروارگانیزم،pH، ترکیبات

گازی ، تعامل میکروبی ، نور و صدمات مکانیسمی اشاره نمود.(۱۸-۲۰)آفلاتوکسین ها پس از جذب انرژی برانگیخته شده و ممکن است تبدیل به محصولات غیر سمی یا با سمیت کمتر شوند لذا یک منبع انرژی مناسب و یا شرایط فرایندی که می تواند بطور موثر سبب شکستن ملکول آفلاتوکسین شود برای سم ردایی مناسب است . عوامل متعددی بر جوانه زدن رشد و بقا و تولید متابولیتهای ثانویه بر قارچهای مولد آفلاتوکسین اثر میگذارند. بنابر این برای هر محیط اکولوژیکی ویژه شناخت کاملی از عوامل موثر ی که در آن محیط وجود دارد و بر شرایط زیست و فعالیت میکروارگانیزم ها اثر می گذارد در هر اکوسیستم باید بطور جداگانه مطالعه شود . یکی ار این عوامل که تعیین کننده و اساسی می باشند رطوبت بوده که در شرایط مختلف تحت عناوین مختلف رطوبت نسبی RH و رطوبت نسبی متعادل HER و فعالیت آبیaw و مقدار رطوبت موجود MC و پتانسیل آبی Q نامیده می شوند. در این تحقیق نیز با توجه به اثرات مهم رطوبت در نمونه هایی که اسانس مرزه اضافه شده بود رطوبت توسط اسانس تامین میشد و در نمونه شاهد نیز به همان میزان آب مقطر اضافه گردید. از آنجایی که هوای محیط اطراف بیشترین رابطه را با مقدار رطوبت در ماده غذایی دارد بنابراین همیشه رطوبت نسبی متعادل تعیین کننده مقدار رطوبت ماده غذایی خواهد بود در این طرح نیز تمامی نمونه های خوراک دام را در شرایط یکسان از نظر رطوبتی قرار دادیم . گونه های مختلف قارچهای آسپرژیلوس در نیازشان به مقدار aw متفاوت هستند برای مثال آسپرژیلوس فومیگاتوس نیاز به ۰/۸۵aw دارد در حالیکه آسپرژیلوس فلاووس در دمای ۳۳ درجه سانتیگراد نیاز به ۰/۷۱-۰/۷۴ aw دارد. Patkar و همکاران در سال ۱۹۴۱ مینیمم رطوبت نسبی برای رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را ۸۰٪ رطوبت نسبی و مینیمم رطوبت نسبی برای اسپور زایی را ۸۵٪ رطوبت نسبی RH ذکر می کند این اطلاعات دلالت بر این دارد که رشد معمولا روی دامنه بیشتری از شرایط محیطی نسبت به اسپورزایی واقع میشود مینیمم فعالیت آبی برای رشد*A.flavus* ۰/۷۸ aw می باشد ولی مینیمم فعالیت آبی برای تولید آفلاتوکسین توسط *A.flavus*۰/۸۲ aw است که این نیاز نیز در قارچهای گوناگون متفاوت است . مطالعات انجام شده نشان داده که شرایط محیطی که در آن ارگانیزم اپتیمم رشد را دارد با شرایط محیطی که بیشترین متابولیت ثانویه یا توکسین را تولید میکند یکسان نیست چه از نظر دما ، رطوبت ،pH و گاها در مورد قارچهای

تولید کننده توکسین یا حتیآنتی بیوتیک قارچ زمانیکه در شرایط تنش زا از نظر رطوبت قرار می گیرد بیشترین میزان متابولیت ثانویه را تولید می کند. (۲۰)

دامنه تحمل pH،در بعضی از قارچها خیلی محدود ودر بعضی دیگر بسیار وسیع است . اثر pHدر تولید مایکوتوکسینها در انواع قارچها بستگی به شرایط محیط کشت ، ترکیبات غذایی محیط کشت وگونه قارچ تولید کننده توکسین دارد. برای مثال قارچ آسپر ژیلوس فلاووس در محیط کشت هایی که pH اولیه آنها کمتر از۴ است رشد نمی کند .بررسی ها نشان داده است که تولید آفلاتوکسین به توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس درابتدای تخمیر که روند درجه pHروبه کاهش است ، پائین می باشد و با افزایش میزان pHتولید آفلاتوکسین نیز افزایش می یابدودر pH=4.7به حد ماکزیمم خود می رسد .امروزه مشخص شده است که کاهش روند تولید آفلاتوکسین در انواع قارچ ها ودر جه ها ی متفاوت pHناشی از تأثیرغلظت یونهای هیدروژن برمتابولیسم تولید مواد مختلف درکپک هاست .(۳۹) البته شرایط تنفس (هوازی یا بی هوازی بودن) درجه اسیدیته محیط، نیز روی رشد وتولید انواع مایکوتوکسینهادر قارچ ها مؤثراست .(۳۴)اکسیژن نیز یکی دیگر از عوامل مهم برای رشد قارچ است زیرا امکان تنفس را برای قارچها فراهم می کند با توجه به اینکه اکثر کپکها هوازی هستند .یکی از دلایل به هم زدن خوراکهای دام از طریق تکان دادن ظروف هر چند روز یکبار در این تحقیق نیز به همین دلیل بود.(۳۴-۱۸) دی اکسید کربن اتمسفر فاکتوردیگری است که تأثیر ویژه ای بر روی رشد وشکل ظاهری قارچها دارد . *A.flavus* در غلظت بالایCO_2 رشدش متوقف می شود .وجود اکسیژن برای رشد قارچ و ایجاد اسپور ضرورت کامل دارد ،ولی دی اکسید کربن از تولید توکسین جلوگیری می کند .قارچها می توانند مقادیر زیادCO_2راتحمل نمایند ، به طوری که اگر غلظت CO_2از ۳٪به ۲۰٪ افزایش یابد ، کاهش قابل ملاحظه ای در رشد قارچ و تولید اسپور ایجاد نمی شود .ولی در غلظت ۷۵٪ CO_2،از تولید مایکوتوکسین کاسته می شود.در تراکم ۱۰۰٪Co_2،هم رشد قارچ وهم تولید مایکوتوکسین متوقف می شود.بنابراین در این طرح میزان دی اکسید کربن نیز تحت کنترل قرار داشت. ساندرز (Sanders) و همکاران نشان دادند که در یک درجه حرارت ثابت و سطوح بالای CO_2 (۲۰-۴۰٪) و رطوبت نسبی کم (۸۶٪) از تولید آفلاتوکسین جلوگیری شده است. محققین نشان دادند که افزایش غلظت CO_2 موجب کاهش تولید آفلاتوکسین میشود.حساسیت آفلاتوکسینها ، در برابر

حرارت نیزتابع شرایط محیطی است .برای مثال وجود رطوبت در موادغذایی باعث افزایش درصد تجزیه و از بین رفتن آفلاتوکسینها در برابر می شود و این کار تحت تأثیر هیدرولیز حلقه لاکتونی در غلظتهای مؤثر رطوبت و درجه حرارت انجاممی گیردیااینکه حضور رطوبت در محیط سبب تحریک واکنشهای شیمیایی در موقعیتهای مختلف بعضی مایکوتوکسینهای مختلف شده و در نتیجه سمیت آنها را تغییر می دهد یا حضور پروتینها و سایر ترکیبات غذایی در محیط باعث حفظ وثبات آفلا توکسینها در مواد غذایی حرارت دیده می شودکه این کار ناشی ازکاهش نفوذ حرارت و تثبیت توکسین بوسیله اتصال با پروتئینها وسایر اجزای تشکیل دهنده ماده غذایی می شود.(۳۲) آزمایشات مربوط به خصوصیات فیزیکو شیمیایی و بیوشیمیایی آفلاتوکسین B_1 نشان میدهد که این ملکول دو ناحیه مهم برای ایجاد فعالیت سمی دارد اولین ناحیه پیوند مضاعف بین کربنهای ۸ و۹ در حلقه فوران است .اثر متقابل بین پروتئینها و DNA با ملکول آفلاتوکسین در این قسمت اتفاق می افتد . قسمت دوم حلقه لاکتون می باشد که به آسانی قابل هیدرولیز است . بنابراین فرایندهایی که برای تخریب آفلاتوکسین اعمال می شوند باید بر بند مضاعف در حلقه لاکتون اثر کنند یا شکافی در حلقه لاکتون بوجود آورند. پس از باز شدن حلقه لاکتون واکنشهای دیگر اتفاق می افتد . همچنین در تحقیق دیگری اثر کلرور سدیم را در از بین بردن قارچ آسپرژیلوس فلاووس موردبررسی قرار داده اند و چنین نتیجه گرفته شده که کلرور سدیم در غلظت ۲۰ درصد فقط باعث جوانه زدن اسپورها شده و رشد قارچ را متوقف می کند.همچنین NeslihanDikbas,2008 در نتایج بدست آمده در این طرح بر روی میوه لیمو در شرایط انبارداری استفاده نمود . Boyraz&Ozcan,2006 و Adiguzel*etal.*,2007 بر روی فعالیت ضد قارچی اسانس *Satureja* و قارچهای فیتوپاتوژنیک در خوراک ها تحقیق کرده اند و به این نتیجه رسیدند که کارواکرول می تواند یکی از ممانعت کننده های مهم برای قارچ های آسپرژیلوس فلاووس در محیط مایع و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در تولید آفلاتوکسین باشد .RazzaghiAbyaneh.*etal.*,2008 و Omidbeygi*etal.*,2006 و Dikbas*etal.*,2008 طی تحقیقاتی گزارش کردند که ماده موثره کارواکرول(Carvacrol) میتواند جهت کنترل غلظت آفلاتوکسین در غلات مفید باشد. همچنین Ashok*etal.*,2010 نیز در مطالعه ای اعلام کرد که اسانس مرزه میتواند جهت درمانهای کاندیدیازیز استفاده گردد.همچنین NeslihanDikbas,2008 در زمینه اثرات اسانس مرزه بر روی وزن خشک و خیس میسیلیوم

قارچ پاتوژن آسپرژیلوس فلاووس تحقیقاتی انجام داده و نتایج معنی داری بر روی کاهش وزن میسیلیوم ها بدست آوردند. البته غلظت ۶/۲۵ میکرولیتر بر میلی لیتر اسانس باعث افزایش وزن میسیلیوم های خشک و تر قارچ گردید که دلیل آن نیز مربوط به دمای انکوباسیون و یا ترکیبات شیمیایی اسانس متانولی است . مسکوکی و همکاران نیز در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ داشتند گزارش کردند که اسانسهای آویشن و مرزه قابلیت جلوگیری از رشد قارچهای آلوده کننده محصولات غذایی و محصولات باغی و زراعی را داراست و قادر به جایگزینی مواد ضد قارچی شیمیایی کنونی می باشند.

۲-۱- ترکیب شیمیایی اسانس مرزه *Saturejahortensis*

گونه های مختلف جنس مرزه به دلیل خواص دارویی و کاربرد در طب سنتی در کشورهای مختلف جهان مورد توجه بوده و مورد بررسی قرار گرفته اند. مهمترین ترکیبات شیمیایی موجود در این جنس ترپنوئیدها[۵] و فلاونوئیدها[۶]بخصوص منو ترپنوئیدها می باشد و از میان آنها دو ترکیب فنلی تیمول[۷] و کارواکرول[۸] جز ترکیبات شاخص به حساب می آیند.ترکیبات شاخص دیگر در این جنس سیمن[۹] است که مانند دو ترکیب یاد شده جزء منوترپن های حلقوی می باشدوترپینن[۱۰] استکهدرتعدادی ازگونه هابه مقداربیشاز ۱۰ درصدوجوددارد.لیمونن[۱۱]و ۱و۸ سینئول[۱۲]ازدیگرمنوترپنهای تک حلقه ای هستندکه درتعدادی ازگونه‌های این جنس حضوردارند. ازمنوترپنهای۲حلقه ای که به میزان متوسط درگونه‌های این جنس حضور دارند میتوان ازبورنئول[۱۳]وکامفور[۱۴]نام برد .این گیاه دارای تانن ، مواد چرب ، قندهای مختلف و اسانسی به مقدار یک در هزار استو اسانس آن اگر از گیاه پرورش یافته تهیه شده باشد دارای ۳۰ درصدکارواکرول و ۲۰ تا ۲۵ درصدSymeneاست در حالی که در

5- terpenoid
6- flavonoid
7- Thymol
8-Carvacrol
9-P-Cymene
10-γ- Terpinene
11- limonene
12- 1,8 cyneol
13- borneole
14- camphor

نوع وحشی گیاه مقدار نسبت کارواکرول به ۴۰ درصد نیز می رسد به علاوه دارای ترپن و نوعی فنل با ترکیبی که هنوز به خوبی شناخته نشده می باشد. اسانس مرزه ، مایعی بیرنگ یا مایل به زرد و دارای وزن مخصوصی بین ۸۹۵ و ۹۱۳ است . در اتر، کلروفرم الکل ، اتر و دوپترول و روغنهای چرب نیز حل می شود.

۳-۱- خواص دارویی گیاه مرزه

مرزه به عنوان یک گیاه دارویی به عنوان نیرو دهنده ، تقویت کننده معده ، ضدعفونی کننده ، تسهیل کننده عمل هضم و ... می باشد. اسانس مرزه از مخاط جذب و بعد از ورود به کبد به شکل ترکیبات کنژوکه گلیکورونیک و سولفوریک اسید و کینون از راه ادرار دفع می‌شود. همچنین گیاه مرزه رشد باکتری و قارچ را مهار می کند و دارای اثر ضد عفونی می‌باشد . بر اساس بعضی گزارشات مرزه برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است.

عکس شماره ۱ : تصویر گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) در زمان گل دهی

اهمیت آسپرژیلوس ها از دیدگاه بهداشتی و بیماریزایی به دلیل تولید آفلاتوکسین می باشد. این سموم اگر بطور مستمر استفاده شوند بر روی انسان و دام اثرات سوء خواهد گذاشت که این اثرات به ۳ حالت تولید سم ، اثرات آلرژی زایی و عامل عفونت میتواند ایجاد بیماری کند. تاکنون حدود ۱۲۰ قارچ شناسایی شده اند که قادر به تولید سم می باشند و یکی از آنها آسپرژیلوس فلاووس است که مولد سم آفلاتوکسین است . از این ۱۲۰ نوع

قارچ ۲۴ گونه آن تولید کننده سم آفلاتوکسین می باشند .(۲۱)تاکنون نزدیک ۱۲ نوع آفلاتوکسین نیز شناسایی شده است . بسیاری ازکپک ها آفلاتوکسین تولید می کنند اما مهم ترین کپک های توکسین زا *A.flavus,A.parasiticus*است . برخی از این سوشها بر روی غلات تا ۲۰۰۰ میکروگرم در گرم توکسین تولید میکنند . (۳۵)

با توجه به مطالعه میکروفلور انواع محصولات کشاورزی و در اغلب محیط های جغرافیایی معمولا قارچهای جنس *Aspergillus* همیشه بیشترین تکرار را در جدایه ها دارند و همیشه این قارچ ها در اغلب محیطهای اکولوژیک بعنوان یکی از ساپروفیتهای غالب جدا شده مطرح می باشد. این قارچها در طول دوران طولانی تکامل خودشان توانائی ها را بدست آوردند تا ضمن حفظ بقای خودشان در بدترین شرایط همواره در اغلب محیط ها حضور داشته باشند . یکی از ویژگیهای قارچهای جنس *Aspergillus* این است که این قارچها هم بعنوان قارچهای ساکن خاک شناخته شده اند (بدلیل حضور با جمعیت های بالا در خاک و آداپته شدن به شرایط خاک) و هم بعنوان قارچهای انباری مطرح می باشند و این چیزی نیست جز بدست آوردن تواناییهای خاصی که این قارچها را قادر می سازد در اغلب محیطهای اکولوژیک و جغرافیایی با سایر رقیبان خود به رقابت بپردازند و در حقیقت موفق تر از آنها باشند.برای داشتن محصولی سالم و عاری از سموم قارچی مسئله از دو جنبه قابل بررسی است . یکی شناخت شرایط تولید آفلاتوکسین و روشهای پیشگیری از تولید آن و دیگری شناخت روشهای سالم سازی محصول آلوده به این سموم است. از مهمترین عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین میتوان به ژنوم ارگانیزم ، رطوبت ، درجه حرارت ، نوع سوبسترا واثرات متقابل میکروارگانیزم،PH، ترکیبات گازی ، تعامل میکروبی ، نور و صدمات مکانیسمی اشاره نمود.(۱۸-۲۰)آفلاتوکسین ها پس از جذب انرژی برانگیخته شده و ممکن است تبدیل به محصولات غیر سمی یا با سمیت کمتر شوند لذا یک منبع انرژی مناسب یا شرایط فرایندی که می تواند بطور موثر سبب شکستن ملکول آفلاتوکسین شود برای سم ردایی مناسب است . عوامل متعددی بر جوانه زدن رشد و بقا و تولید متابولیتهای ثانویه بر قارچهای مولد آفلاتوکسین اثر می گذارند. بنابر این برای هر محیط اکولوژیک ویژه شناخت کاملی از عوامل موثری که در آن محیط وجود دارد و بر شرایط زیست و فعالیت میکروارگانیزم ها اثر می گذارد در هر اکوسیستم باید بطور جداگانه مطالعه

شود . یکی ار این عوامل که تعیین کننده و اساسی می باشند رطوبت بوده که در شرایط مختلف تحت عناوین مختلف رطوبت نسبی RH و رطوبت نسبی متعادل HER و فعالیت آبیaw و مقدار رطوبت موجود MC و پتانسیل آبی Q نامیده می شوند. در این تحقیق نیز با توجه به اثرات مهم رطوبت در نمونه هایی که اسانس مرزه اضافه شده بود رطوبت توسط اسانس تامین میشد و در نمونه شاهد نیز به همان میزان آب مقطر اضافه گردید. از آنجایی که هوای محیط اطراف بیشترین رابطه را با مقدار رطوبت در ماده غذایی دارد بنابراین همیشه رطوبت نسبی متعادل تعیین کننده مقدار رطوبت ماده غذایی خواهد بود در این طرح نیز تمامی نمونه های خوراک دام را در شرایط یکسان از نظر رطوبتی قرار دادیم . گونه های مختلف قارچهای آسپرژیلوس در نیازشان به مقدار aw متفاوت هستند برای مثال آسپرژیلوس فومیگاتوس نیاز به ۰/۸۵aw دارد در حالیکه آسپرژیلوس فلاووس در دمای ۳۳ درجه سانتیگراد نیاز به ۰/۷۱-۰/۷۴ aw دارد. Patkar و همکاران در سال ۱۹۴۱ مینیمم رطوبت نسبی برای رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را ۸۰٪ رطوبت نسبی و مینیمم رطوبت نسبی برای اسپور زایی را ۸۵٪ رطوبت نسبی RH ذکر می کند این اطلاعات دلالت بر این دارد که رشد معمولا روی دامنه بیشتری از شرایط محیطی نسبت به اسپورزایی واقع میشود مینیمم فعالیت آبی برای رشد *A.flavus* ۰/۷۸ aw می باشد ولی مینیمم فعالیت آبی برای تولید آفلاتوکسین توسط *A.flavus*۰/۸۲ aw است که این نیاز نیز در قارچهای گوناگون متفاوت است . مطالعات انجام شده نشان داده که شرایط محیطی که در آن ارگانیزم اپتیمم رشد را دارد با شرایط محیطی که بیشترین متابولیت ثانویه یا توکسین را تولید میکند یکسان نیست چه از نظر دما ، رطوبت ،pH و گاها در مورد قارچهای تولید کننده توکسین یا حتی آنتی بیوتیک قارچ زمانیکه در شرایط تنش زا از نظر رطوبت قرار می گیرد بیشترین میزان متابولیت ثانویه را تولید می کند. (۲۰)

دامنه تحمل pH،در بعضی از قارچها خیلی محدود و در بعضی دیگر بسیار وسیع است . اثر pHدر تولید مایکوتوکسینها در انواع قارچها بستگی به شرایط محیط کشت ، ترکیبات غذاییمحیط کشت وگونه قارچ تولید کننده توکسین دارد. برای مثال قارچ آسپر ژیلوس فلاووس در محیط کشت هایی که pHاولیه آنها کمتر از۴ است رشد نمی کند .بررسی ها نشان داده است که تولید آفلاتوکسین به توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس در ابتدای تخمیر که روند درجه pHروبه کاهش است ، پائین می باشد و با افزایش میزان pHتولید آفلاتوکسین نیز

افزایش می یابد و در pH=4.7به حد ماکزیمم خود می رسد .امروزه مشخص شده است که کاهش روند تولید آفلاتوکسین در انواع قارچ ها ودر جه ها ی متفاوتpHناشیاز تأثیرغلظت یونهای هیدروژن برمتابولیسم تولید مواد مختلف درکپک هاست .(۳۹) البته شرایط تنفس (هوازی یا بی هوازی بودن)درجه اسیدیته محیط، نیز روی رشد وتولید انواع مایکوتوکسینها در قارچ ها مؤثراست .(۳۴)اکسیژن نیز یکی دیگر از عوامل مهم برای رشد قارچ است زیرا امکان تنفس را برای قارچها فراهم می کند با توجه به اینکه اکثر کپکها هوازی هستند .یکی از دلایل به هم زدن خوراکهای دام از طریق تکان دادن ظروف هر چند روز یکبار در این تحقیق نیز به همین دلیل بود.(۳۴-۱۸)دی اکسید کربن اتمسفر فاکتور دیگری است که تأثیرویژه ای بر رشد وشکل ظاهری قارچ ها دارد .*A.flavus* در غلظت بالایCO_2 رشدش متوقف می شود .وجود اکسیژن برای رشدقارچ وایجاد اسپور ضرورت کامل دارد ،ولی دی اکسید کربن از تولید توکسین جلوگیری می کند .قارچها می توانند مقادیر زیادCO_2راتحمل نمایند ، به طوری که اگر غلظت CO_2از ۳٪به ۲۰٪ افزایش یابد ، کاهش قابل ملاحظه ای در رشد قارچ و تولید اسپور ایجاد نمی شود .ولی در غلظت ۷۵٪ CO_2،از تولید مایکوتوکسین کاسته می شود.در تراکم ۱۰۰٪C_{O2}،هم رشد قارچ وهم تولید مایکوتوکسین متوقف می شود.بنابراین در این طرح میزان دی اکسید کربن نیز تحت کنترل قرار داشت. ساندرز (Sanders) و همکاران نشان دادند که در یک درجه حرارت ثابت و سطوح بالای CO_2 (۲۰-۴۰٪) و رطوبت نسبی کم (۸۶٪) از تولید آفلاتوکسین جلوگیری شده است. محققین نشان دادند که افزایش غلظت CO_2 موجب کاهش تولید آفلاتوکسین میشود.حساسیت آفلاتوکسینها ، در برابر حرارت نیزتابع شرایط محیطی است .برای مثال وجود رطوبت در مواغذایی باعث افزایش درصد تجزیه واز بین رفتن آفلاتوکسینها دربرابر می شود و این کار تحت تأثیر هیدرولیز حلقه لاکتونی در غلظتهای مؤثر رطوبت ودرجه حرارت انجام می گیردیا اینکه حضور رطوبت در محیط سبب تحریک واکنشهای شیمیایی در موقعیتهای مختلف بعضی مایکوتوکسینهای مختلف شده ودرنتیجه سمیت آنها را تغییر می دهد یاحضور پروتینها وسایر ترکیبات غذایی در محیط باعث حفظ وثبات آفلا توکسینها در مواد غذایی حرارت دیده میشودکه این کار ناشی ازکاهش نفوذ حرارت وتثبیت توکسین بوسیله اتصال باپروتئینها وسایر اجزای تشکیل دهنده ماده غذایی می شود.(۳۲) آزمایشات مربوط به خصوصیات فیزیکو شیمیایی و بیوشیمیایی آفلاتوکسینB_1 نشان

میدهد که این ملکول دو ناحیه مهم برای ایجاد فعالیت سمی دارد اولین ناحیه پیوند مضاعف بین کربنهای ۸ و۹ در حلقه فوران است .اثر متقابل بین پروتئینها و DNA با ملکول آفلاتوکسین در این قسمت اتفاق می افتد . قسمت دوم حلقه لاکتون می باشد که به آسانی قابل هیدرولیز است . بنابراین فرایندهایی که برای تخریب آفلاتوکسین اعمال می شوند باید بر بند مضاعف در حلقه لاکتون اثر کنند یا شکافی در حلقه لاکتون بوجود آورند. پس از باز شدن حلقه لاکتون واکنشهای دیگر اتفاق می افتد . همچنین در تحقیق دیگری اثر کلرور سدیم را در از بین بردن قارچ آسپرژیلوس فلاووس موردبررسی قرار داده اند و چنین نتیجه گرفته شده که کلرور سدیم در غلظت ۲۰ درصد فقط باعث جوانه زدن اسپورها شده و رشد قارچ را متوقف میکند. همچنین NeslihanDikbas,2008 در نتایج بدست آمده در این طرح بر روی میوه لیمو در شرایط انبارداری استفاده نمود . Boyraz&Ozcan2006 و Ashok*etal*.,2010 بر روی فعالیت ضد قارچی اسانس *Satureja* و قارچهای فیتوپاتوژنیک در خوراک ها تحقیق کرده اند و به این نتیجه رسیدند که کارواکرول می تواند یکی از ممانعت کننده های مهم برای قارچ های آسپرژیلوس فلاووس در محیط مایع و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در تولید آفلاتوکسین باشد .RazzaghiAbyaneh.*etal.*,2008 و Omidbeygi*etal.*,2006 و Dikbas*etal.*,2008 طی تحقیقاتی گزارش کردند که ماده موثره کارواکرول میتواند جهت کنترل غلظت آفلاتوکسین در غلات مفید باشد . همچنین Ashok *etal*.,2010 نیز در مطالعه ای اعلام کرد که اسانس مرزه میتواند جهت درمانهای کاندیدیازیز استفاده گردد.همچنین NeslihanDikbas,2008 در زمینه اثرات اسانس مرزه بر روی وزن خشک و خیس میسیلیوم قارچ پاتوژن آسپرژیلوس فلاووس تحقیقاتی انجام داده و نتایج معنی داری بر روی کاهش وزن میسیلیوم ها بدست آوردند. البته غلظت ۶/۲۵ میکرولیتر بر میلی لیتر اسانس باعث افزایش وزن میسیلیوم های خشک و تر قارچ گردید که دلیل آن نیز مربوط به دمای انکوباسیون و یا ترکیبات شیمیایی اسانس متانولی است . مسکوکی و همکاران نیز در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ داشتند گزارش کردند که اسانسهای آویشن و مرزه قابلیت جلوگیری از رشد قارچهای آلوده کننده محصولات غذایی و محصولات باغی و زراعی را داراست و قادر به جایگزینی مواد ضد قارچی شیمیایی کنونی می باشند.

٤-١- مایکوتوکسینها

مایکوتوکسین ها ترکیباتی با ساختمانهای شیمیایی متفاوت با وزنمولکولی کوچک ومتابولیت ثانویه کپک ها و قارچها هستند که بر روی محصولات کشاورزی قبل یا بعد از برداشت،طی حمل ونقل و نگهداری رشد میکنند. در قارچها و سایر ارگانیسم ها متابولیتهای اولیه ترکیباتی هستند که جهت رشد و تکثیر ضروری می باشند و متابولیت های ثانویه در انتهای فاز لگاریتمی رشد تشکیل می شوند و اهمیت آشکاری در رشد یا متابولیسم ارگانیسم ندارند. (۳-۴) بطور معمول این ترکیبات زمانی تشکیل می شوند که مقادیر زیادی از پیش ساز های متابولیک اولیه نظیر اسیدهای آمینه، استات، پیرووات و غیره تجمع یابند. در واقع سنتز مایکو توکسین ها توسط قارچ روشی است که از طریق آن، ترکیبات پیش ساز مازاد بر نیاز متابولیک ، کاهش می یابد. حدود ۲۰۰ هزارگونه کپک و قارچ شناخته شده است که اکثر آنها برای انسان مفید است زیرا در تولیدنان، آنتی بیوتیک ها و ..... به کار می روند ، اما بیش از ۲۰۰ گونه اثرات مضرخود را بر روی انسان و حیوان نشان داده اند.

تشکیل مایکوتوکسین ها یک مشکل جهانی محسوب می شود. نظر به اهمیت مایکوتوکسین ها در غذای انسان، استانداردهای بین المللی برای حد مجاز آنها در موادغذایی از جمله خشکبار تعیین شده است که برای حمایت از حقوق مصرف کنندگان و حضور دربازارهای جهانی،تولیدکنندگان را ملزم به رعایت آن می کند. (۲۸-۳۱)

حضور عوامل بیماریزا خصوصا قارچها منجمله قارچ آسپرژیلوس به دو طریق صنعت پرورش آبزیان را تهدید می کند . از سویی موجب بروز بیماری و علائمی در آبزی شده و از سوی دیگر بطور بالقوه باعث ایجاد مسمومیت غذایی در انسان می شود . از سوی دیگر شکی نیست که استفاده بیش از اندازه ازآنتی بیوتیکها منجر به باقی ماندن پسمان دارویی در فراورده های حاصل از آبزیان و ظهور سویه های میکروبی مقاوم به دارو میشود. امروزه در پی افزایش مقاومت میکروبی و هزینه های سنگین درمان بیماری همراه با فشار مصرف کنندگان به تولید فراورده های عاری از دارو و محدودیت استفاده از این فراورده ها در بسیاری از کشورها محققین به دنبال ترکیباتی هستند که بتوان از آنها به جای آنتی بیوتیک ها در رژیم غذایی آبزیان استفاده کنند . (۳۰) .در پی ناکامی های مختلف در بکارگیری داروهای مختلف شیمیایی و ظهور سویه های مقاوم جدید بشر با بکارگیری دانش و تکنولوژی امروزی دنیا اقدام به تولید فراورده های دارویی با منشا گیاهی نموده است . محققین مختلفی

اثرات ضد قارچی اسانسهای گیاهی را مطالعه نموده اند . تحقیقات نشان داده که تیمول و کارواکرول موجود در اسانس مرزه دارای اثرات ضد قارچی در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس می باشد .(۶-۲۷-۲۸) ولی مطالعه ای که در آن اثر ضد قارچی بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس در خوراک آبزیان بررسی شده باشد مشاهده نگردید .در این مطالعه اثرات ضد قارچی اسانس مرزه بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس در خوراک آبزیان جهت جلوگیری از تولید آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت .

۵-۱- آفلاتوکسین ها

آفلاتوکسین ها گروهی از متابولیتهای قارچی هستند که از نظر اقتصادی و بهداشتی برای انسان با اهمیت میباشند . در میان مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها مهمترین آنها هستند و بیماری‌های ناشی از تغذیه مواد آلوده به آفلاتوکسین، خطرات قابل ملاحظه‌ای را برای انسان، دام وطیور و آبزیان به همراه دارد. آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوسپارازیتیکوس دو گونه مهم تولیدکننده آفلاتوکسین، در بین گونه‌های مختلف آسپرژیلوس‌ها هستند(۳۶). این دو قارچ به عنوان یک عامل مولد فساد در فرآورده‌های انباری به حساب می‌آیند و می توانند مولد بیماری آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات اهلی و انسان باشند. آفلاتوکسینها نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان زایی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردارند. (۲۲) . مطالعات اپیدمیولوژیک ، قارچهای آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس را به عنوان مولد سموم حاد و سرطان زا در انسان گزارش کرده است . آفلاتوکسینها در بسیاری از مواد غذایی انسانی و حیوانی یافت میشوند و تولید آنها در این قبیل مواد غذایی تحت تاثیر چندین فاکتور مثل دما، فعالیت آبی ،pH، مواد غذایی در دسترس و رشد رقابتی سایر میکروارگانیسم ها می باشد . زمان دقیق شناسایی آفلاتوکسین‌ها مشخص نشده است، اما به طور یقین، زمان آن به قبل از سال ۱۹۶۰ مربوط می‌شود. به دنبال مسمومیت اتفاقی دربسیاری از گونه‌های حیوانی و در نتیجه مطالعات در این زمینه، بشر برای اولین‌بار به وجود آنها پی برد. در واقع با پی بردن به ارزش غذایی دانه‌های روغنی، برای تغذیه دام وآبزیان انتقال این مواد از مناطق معتدله و اضافه کردن آنها به جیره غذایی حیوان، این مسمومیت‌ها به وقوع پیوست.(۳-۴)

۱-۵-۱-انواع آفلاتوکسین

۱- آفلاتوکسین B_1 :

آفلاتوکسین B_1با وزن مولکولی ۳۱۲ و بافرمول $C_{17}H_{12}O_2$در مقابل نور ماورای بنفش، فلورسانس آبی نسبتاً قوی از خود نشانمی‌دهد. این آفلاتوکسین به شکل بلورهای کریستالی بیرنگی است و در حرارت ۲۶۹-۲۶۸درجه سانتیگراد که نقطه ذوب آن است، تجزیه می‌شود.

۲- آفلاتوکسین G_1 :

آفلاتوکسین G_1با وزن مولکولی ۳۲۸ و با فرمول $C_{17}H_{12}O_7$که در برابر اشعه ماورای بنفش ساطع‌کنندهنور فلورسانس سبز است. شواهد اخیر نشان می‌دهد که فلوسانس سبز آفلاتوکسین G_1احتمالاً به دلیل ناخالصی زردرنگی است که می‌توان آن را جدا نمود. در واقع آفلاتوکسین خالص G_1 فلورسانس آبی از خود نشان می‌دهد. نقطه ذوب این آفلاتوکسین ۲۴۶- ۲۴۴درجه سانتیگراد می‌باشد .(۱۶-۳۲-۱۲)

۳-آفلاتوکسین P_1 :

آفلاتوکسین P_1متابولیتی است که در اثر دمتیلاسیون آفلاتوکسین B_1ایجاد می‌شود. در ادرار حیواناتی چون میمون می‌توان آن را ردیابی کرد. این آفلاتوکسین از کشت آزمایشگاهی قارچ آسپرژیلوس استخراج شده است. (۱۲-۱۶-۱۵-۳۲-۳۸)

۴-آفلاتوکسین B_2و G_2 :

آفلاتوکسین B_2با وزن مولکولی ۳۱۴ و با فرمول $C_{17}H_{14}O_6$وآفلاتوکسین G_2با وزن مولکولی ۳۳۰ و با فرمول $C_{17}H_{14}O_7$می‌باشد. این آفلاتوکسین‌هابه ترتیب در مقابل نور ماورای بنفش، فلورسانس آبی و سبز از خود ساطع می‌کنند. نقطه ذوب آنها نیز به ترتیب ۲۸۹-۲۸۶ و ۲۴۷-۲۴۰ درجه سانتیگراد است. آفلاتوکسین‌های B_1و G_1را از هیدروژناسیون دقیق آفلاتوکسین‌های B_2و G_2می‌توان به دست آورد .(۱۲-۲۳)

۵-آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 و GM_1 :

اگر آفلاتوکسین B_1به تنهایی یاهمراه با آفلاتوکسین‌های دیگر در خورک دام و آبزیان به وسیله حیوانات خورده شود به توکسین‌های دیگری در ترشحات و بافت‌های آنها تبدیل می‌شود که دونوع اینتوکسین‌ها که در شیر

حیوانات مشخص گردیده است تحت عنوان توکسین‌های شیر یا اصطلاحاً آفلاتوکسین‌های M_1وM_2نامیده می‌شوند(M)ازکلمهMilkبه معنای شیر منشاء گرفته است.آفلاتوکسین‌های M_1وM_2از نظر ساختمانی به ترتیب مشتقات ۴ هیدروکسی آفلاتوکسین B_1 است و خاصیت فلورسانس آفلاتوکسین‌های M_1و$M_{2,3}$ بیشتر ازآفلاتوکسین B_1 است و خاصیت سرطان زایی، جهش‌زایی و سمیت آن مشابه آفلاتوکسین B_1است، این توکسین بعد از اینکه آفلاتوکسین B_1به وسیله حیوان خورده شود یا مستقیماً به حیوان تزریق گردد در اوره، مدفوع، عضلات، کبد و کلیه قابل تشخیص و شناسایی است. فرمول مولکولی آفلاتوکسین M_1 یک اکسیژن بیشتر از آفلاتوکسین B_1دارد (فرم هیدروکسی).

آفلاتوکسین M_1شباهت ساختمانی زیادی با آفلاتوکسین B_1وG_2دارد و محصول هیدروکسیله شده آفلاتوکسین G_1 به نام آفلاتوکسین GM_1خوانده می‌شود و شباهت زیادی به آفلاتوکسین M_1دارد. ترکیب حاصل از هیدروکسیله شدن آفلاتوکسین را می‌خوانند که از نظر ساختمانی شباهت زیادی به آفلاتوکسین M_2دارد.(۳۲) اپتیمم، درجهpHبرای تبدیل آفلاتوکسین B_1به M_1در کبد موجودات زنده‌ای نظیر موش، سنجاب، میمون، گاو،مرغ و انسان در سیستم آنزیمیNADPHحدود ۸/۹ است. البته کبد بعضی از گونه‌های حیوانی از نظر آفلاتوکسین B_1به M_1ممکن است فعالتر باشند. مثلاً سرعت تبدیل درسنجاب و میمون به ترتیب۱ و ۳ درصد است. شرایط آزمایش و پارامترهایی نظیرpH غلظت در سرعت تبدیل دخالت دارند. سمیت حاد آفلاتوکسین M_1 و تأثیر آن در ممانعت ازکدبرداریRNA و سنتز پروتئین‌ها درست به اندازه آفلاتوکسین B_1است ولی تأثیر آن برDNAکمتر از آفلاتوکسین B_1می‌باشد. قدرت جهش زایی و سرطانزایی آفلاتوکسین M_1 مشابه آفلاتوکسین B_1است. آفلاتوکسین M_1درجه حرارت پاستوریزاسیون را تحمل می‌کند و بررسی‌های انجام شده با شیرهایی که به طور طبیعی و مصنوعی با آفلاتوکسین M_1آلوده شده بودند مقاومت آفلاتوکسین M_1 را ثابت کرده‌اند. آفلاتوکسین M_1 حرارت ۶۴ درجه سانتیگراد را به مدت ۲ ساعت تحمل کرده و حالت اولیه خود را حفظ می‌کند ولی افزایش درجه حرارت ثبات ساختمانی آن را کاهش می‌دهد.فرایندهای مختلف حرارتی که برای تهیه انواع فرآورده‌های لبنی به کار می‌روند،نمی‌توانند پایداری آفلاتوکسین M_1را کاهش می‌دهند و همچنین

مشخص شده است که پایداری آفلاتوکسین M_1در طی فرایند حرارتی به نوع آلودگی محصول بستگی ندارد و درشیر با آلودگی طبیعی و مصنوعی مقاومت به حرارت یکسانی داشته است.(۴-۳-۲۶)

از عوامل مؤثر در تولید آفلاتوکسین ها می توان به عوامل ژنتیکی و محیطی مانند نوع قارچ ، نوع سوبسترا ، رطوبت ، دما ، زمان ، رشد و بلوغ محصول ، صدمات ، تهویه،ذخیره سازی ، فرایند ، نور وpHاشاره کرد. ولی باید توجه کرد که رشد قارچ های آسپرژیلوس لزوماً به مفهوم تولید آفلاتوکسین ها نمی باشد. (۳)

٦-۱- روشهای تعیین آفلاتوکسین ها

این روش ها عموماً به صورت فیزیکو شیمیایی بوده وشامل مراحل نمونه برداری ، استخراج ، رسوب ،تصفیه ، جداسازی و کمّی کردن می باشد.آفلاتوکسین مواد غذایی مشکوک پس از نمونه برداری مناسب ، به یکی از دو روشCBوBFکه به ترتیب با کلروفورم و متانول صورت می گیرد ، استخراج شده و سپس ناخالصی های آن توسط ترکیبات مختلف رسوب داده می شود . پس از این مرحله محلول آفلاتوکسین استخراج شده توسط حلال های مناسب مانند کلروفورم از نظر چربی ها ، کربوهیدرات ها و رنگدانه‌ها تصفیه می شود .در مرحلهٔ جداسازی از روش های مختلف مانندTLCوHPLC استفاده می شود . در روشTLCنمونهٔ تصفیه شده ، با حجم مشخصی از محلول های بنزنو استونیتریل حل شده و پس از این مرحله برای نقطه گذاری روی پلیت های کروماتوگرافی استفاده می شود . پس از نقطه گذاری ، درخشندگی نمونه های مورد آزمایش و شاهد ، زیرنورUVباهم مقایسه می شوند . در روشHPLCبرای جدا سازی آفلاتوکسین ها ازکروماتوگرافی جذبی استفاده می‌شود . ذرات آفلاتوکسین نمونهٔ مشکوک ، بر اساس تفاوت در درجهٔ جذب به سطوح جامد ، جداسازی می‌شوند.

۷-۱- آفلاتوکسین در غذای ماهی

آفلاتوکسین B_1 یکی از قویترین آفلاتوکسین عامل ایجاد کننده سرطان بطور طبیعی در حیوانات می باشد.اولین شیوع آفلاتوکسیکوزیس ماهی در هچری ماهی قزل آلا در سال ۱۹۶۰ شناسایی شد.درقزل آلای رنگین کمان

پرورشی که با پلتهای آماده شده با ترکیب تخم پنبه آلوده به آفلاتوکسینها تغذیه شده بودند تومور های کبدی گسترش یافت.(۲) اگرچه تخم پنبه آلوده بمدت طولانی بعنوان اجزای اصلی در ترکیب غذا استفاده نشده بود با وجود این بیش از ۸۵ درصد ماهیها در این هچری تلف شدند.انبارکردن نادرست همه مواد غذایی و تغذیه با غذا های آلوده باعث آلودگی به آفلاتوکسینها می شود.آفلاتوکسیکوزیس اکنون در صنعت قزل آلای رنگین کمان بخاطر مقررات سخت اداره دارو و غذا (F.D.A) به علت غربالگری آفلاتوکسین در دانه های روغنی،ذرت وسایر اجزای خوراکی محدود شده است. به هر حال این سم ، ماهیان پرورشی گرمابی مانند تیلاپیا وگربه ماهی را بدلیل افزایش فرمولاسیون جیره غذایی با اجزای گیاهی به مقدار بیشتر و اجزای حیوانی به مقدار کمتر،بیشتر تحت تاثیر قرار می دهد. دلیل افزایش پتانسیل گسترش آفلاتوکسیکوزیس در این ماهیان مورد توجه سریع قرار گرفت که اجزای گیاهی پتانسیل بالا تری نسبت به اجزای حیوانی برای آلودگی با آفلاتوکسینها را دارند.در شرایط گرمسیری و نیمه گرمسیری پتانسیل گسترش آفلاتوکسیکوزیس بعلت انبار کردن مواد غذایی تحت شرایط رطوبت پایین وحرارت بالا افزایش می یابد . غذای قرار گرفته در معرض سم آفلاتوکسین علاوه بر ضربه اقتصادی باعث تلفات شدید درحیوانات می شود. وسعت بیماری که بوسیله آفلاتوکسینها ایجاد می شود به سن و نوع ماهی بستگی دارد. بچه ماهیها بیشتر از بالغین به آفلاتوکسین حساس هستند و بعضی از انواع ماهیها نسبت به سم آفلاتوکسین بیشتر حساسند.مطالعات انجام شده روی ماهی تیلاپیای نیل نشان داده که وقتی ماهیها با جیره غذایی حاوی ۱/۸ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا بمدت ۷۵ روز تغذیه شده بودند کاهش سرعت رشد بعلاوه ناهنجاریهای بافتی یا زخم هایی در کبد را که علامت شروع و گسترش سرطان بود نشان دادند.درمطالعه دیگرغلظتهای مختلف آفلاتوکسین B_1 را بر روی تیلاپیای نیل ۲/۷ گرمی انجام دادند. ماهیهایی که با جیره غذایی محتوی ۲/۵، ۱۰ یا ۱۰۰ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا بمدت ۸ هفته تغذیه شده بودند کاهش وزن و کاهش شمار سلولهای خونی را نشان دادند.ماهیان تغذیه شده به میزان ۱۰ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلو گرم غذا ناهنجاری کبدی را نشان دادند وماهیانی که با ۱۰۰ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند کاهش وزن همراه باآسیب کبدی و۶۰ درصد ماهیها نیز در پایان آزمایش تلف شدند.سایر مطالعات نشان داد که سطح تحمل آفلاتوکسین برای تیلاپیا با روش پرورش ماهی فرق

میکند. در آب سبز وجاری حضور مقدار ۲۵ تا ۳۹ ppb آفلاتوکسین در آب باعث کاهش رشد بدون تلفات ماهی می شود.در پرورش قفس غلظت آفلاتوکسین بالای ۵ ppb در آب باعث افزایش سرعت مرگ ومیر میشود.قزل آلای رنگین کمان در مقایسه با گربه ماهی به سم آفلاتوکسین B_1 بیشتر حساس می باشد.قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۰۰۴ میلی گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا (ppb۰/۴) بمدت ۱۵ ماه احتمالآ بمیزان ۱۴ درصد تومور ها گسترش می یابند.درقزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا (۲۰ ppb) بمدت ۸ ماه میزان شیوع تومور های کبدی ۵۸ درصد وبا ادامه تغذیه به مدت ۱۲ ماه میزان شیوع تومور ها به۸۳ درصد رسید. گربه ماهی تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ میلی گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا (۱۰۰۰۰ ppb) بمدت ۱۰ هفته کاهش سرعت رشد وزخمهای داخلی خفیف را نشان دادند.

۱-۸-۱- علائم آفلاتوکسیکوزیس در ماهی

علائم اولیه شناسایی شده از ماهیان مبتلا به آفلاتوکسیکوزیس شامل رنگ پریدگی آبششها، کاهش سرعت رشد و کاهش وزن می باشد.تغذیه طولانی مدت با غلظتهای پایین از آفلاتوکسین B_1 باعث ایجاد تومورهای کبدی میشود که بصورت زخمهای رنگپریده ظاهر می شوند که به کلیه نیز انتشار پیدامی کنند.افزایش مرگ و میر ماهیان (شمار بالایی از ماهیان مرده) ممکن است مشاهده شود. آفلاتوکسینها می توانند بصورت غیر مستقیم و با اثر بر روی مواد غذایی موجود در جیره باعث ایجاد بیماری شوند.برای مثال آنتی اکسیدانهای محلول در چربی بمانند ویتامین A وآنتی اکسیدانهای محلول در آب و ویتامینهایی مانند ویتامین C (ویتامین ضروری برای اعمال ایمنی) و تیامین (ویتامین ضروری برای اعمال متابولیک و تغذیه ای) موجود در غذاها بوسیله این سموم غیر فعال می شوند. بنابراین تعجب آور نیست که آفلاتوکسینها ایمنی را کاهش می دهند وماهی را نسبت بیماریهای باکتریائی،ویروسی و انگلی بیشتر حساس می کنند.این اثرات اغلب مورد توجه واقع نمی شود وبه دلیل کاهش بازده تولید (کاهش رشد،کاهش وزن و افزایش مقدار غذا برای رسیدن به وزن بازاری و افزایش هزینه های بهداشتی) منفعت حاصل نمی شود.

۸-۱- مدیریت و کنترل

بایستی غذاهایی که به تازگی آماده شده و بصورت صحیح انبار شده اند برای مراکز پرورش خریداری شوند.خار وخاشاک باید بدور از مواد غذایی باشند ودانه ها بایستی در ساختمانهای تمیز انبار شوند.در حد امکان غذاهای ماهی بایستی در ساختمانهایی که درجه حرارت و رطوبت آنها کنترل می شود انبار شوند.غذاهای ماهی را روی پالتها و بفاصله یک قدمی دیوار (پرهیز از بهم فشردگی) ودر جای خنک و خشک بمدت طولانی تر از ۳ ماه نبایستی انبار کرد و غذارا خارج از انبار بمدت بیش از ۲ هفته نبایستی نگهداری کرد.وقتی که غذا ها بمدت طولانی وتحت شرایط غیر بهداشتی انبار شوند مشکلات بهداشتی ازقبیل رشد کپکها، کاهش ویتامینها و فساد روغنهای موجود در مواد غذایی بوجود می آید.کنترل جوندگان و حشرات درنگهداری کیفیت غذاها وبه دور از آفلاتوکسینها مهم است.با دقت در تاریخ تولید از خریداری غذاهای کهنه اجتناب شود. همچنین موقعی که غذا را خریداری می کنیم بایستی از روشهای انبار کردن غذا بوسیله فروشنده اطلاع کافی داشته باشیم.غذاهایی که بمدت طولانی انبار می شوند احتمال آلودگی با کپکها وجود داشته و تغییر رنگ داده وبصورت بهم چسبیده و بوی کپک زدگی میدهند.غذاهای کهنه از رطوبت اشباع بوده و خیس هستند.هر ظرفی که برای انبار کردن غذا استفاده میشود بایستی کاملاً تمیز بوده و عاری از رشد کپکها بر سطوح شان باشند(ظروف غذا و غذاده اتوماتیک).آزمایش منظم غذا ها از لحاظ حضور آفلاتوکسین عقیده خوبی می باشد. بازرسی ساده در مزرعه انجام شود (جستجوی کپکهای آبی ، سبز روی غذا) بطور مثال نور سیاهی با تشعشع سبز مایل به زرد ممکن است در حضور آسپرژیلوس فلاووس ایجاد شود.در صورتیکه نور سیاه یک روش تشخیصی سریع بوده و شاخص آسپرژیلوس فلاووس می باشد ودر تمام موارد نیز موثر واقع نمی شود.

۹-۱- شرایط نمونه برداری

نمونه گیری وآماده کردن نمونه ها جهت آزمایش از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده در غیر اینصورت ممکن است در تشخیص آفلاتوکسین اشتباهاتی رخ دهد.باتوجه به این موضوع طرحهای اختصاصی وگسترده ای جهت حذف این سموم وبعضی از موادغذائی نظیر ذرت ،بادام زمینی تدوین شده است .

در نمونه گیری باید ابتدا نمونه های اولیه از محموله های مورد نظر برداشت شده وپس از اینکه به طور کامل مخلوط شد،نمونه نهائی اخذ گردد. تمام روشهای آزمایش شامل سه مرحله است:

۱ - استخراج۲ - خالص سازی۳ - تعیین میزان سم

اخیرادر مرحله دوم، توسط روش استخراج فاز جامد ، مواد اضافی به منظورخالص سازی جداشده ودر مرحله آخربرروی عصاره حاصله آزمایشا ت لازم انجام ومیزان سم مشخص می گردد.

۲- مواد و روشها

اسانس گیاه مرزه (*Saturejahortensis*)، سوش قارچ آسپرژیلوس فلاووس *PTCC5006IR6* ، خوراک ماهی شامل مواد اولیه : پودر ماهی ، پودر گوشت،کنجاله دانه های روغنی (ترجیحا سویا و در غیر اینصورت آفتابگردان ، کنجد و پنبه) ،آرد غلات شامل گندم ، ذرت و یا جو ، سبوس غلات (برنج) ، ملاس ، اسیدهای آمینه ضروری (لیزین ، متیونین) ، لستین،مخمر ، ویتامینها (B,E) روغن ماهی و ...، محیط کشت PDA برای کشت و رشد قارچ و افزودن اسانس به محیط کشت و بررسی در شرایط آزمایشگاهی ، میکروسکوپ دوربین دار ، انکوباتور ، میکروپیپت ،کرک برر ، هود میکروبی .

۲-۱- تهیه اسانس مرزه

گیاه مرزه که از باغ کشاورزی شرکت گلکاران کاشان تهیه و در همان محل توسط دستگاه اسانس گیر با بخار آب تهیه گردید و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد در طول انجام آزمایش نگهداری شد .

۲-۲- تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ

قارچ آسپرژیلوس فلاووس *PTCC5006* که ایزوله ای از مغز پسته شهرستان رفسنجان در استان کرمان بود و در بخش کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران توسط متدهای مورفولوژیک استاندارد شناسایی و تحت عنوان قارچ با توکسین زایی بالا و بصورت لیوفیلیزه برای انجام طرح در اختیارمان قرار گرفت. ابتدا قارچ را در محیط کشت PDA به مدت ۷-۱۰ روز در ۲±۲۸ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری کرده تا تولید اسپور کند. از این محیط کشت پس از ۴ مرحله پاساژ و تهیه کشت خالص استفاده گردید. یک کشت نیز بر روی محیط PDA در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری و در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. سپس محیط مذاب PDA استریل حاوی غلظت های ۰، ۳۰۰،۴۰۰ ، ۵۰۰ و ۶۰۰ پی پی ام اسانس مرزه آماده شده و به ازای هر غلظت در ۴ پلیت توزیع شد. سپس یک قطعه از محیط کشت حاوی قارچ رشد یافته به ابعاد نیم سانتی متر توسط کرک برر برداشته و در مرکز محیط کشت ها ی حاوی غلظت های مختلف اسانس قرار دادیم و پس از

گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت به مدت ۱۳ روز و نهایتا ۲۱ روز قطر کلنی را اندازه گیری و میزان تاثیرگذاری غلظت مختلف اسانس را بر روی میزان رشد قارچ در شرایط *In vitro*بررسی نمودیم . همچنین میزان اثر بازدارندگی یا کشندگی قارچ توسط اسانس را نیز بررسی نمودیم این مرحله در۴ تکرارانجام شد . در مرحله بعد ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور در پلیت های PDA حاوی غلظت های مختلف اسانس تلقیح و تعدادی را در تمام سطح محیط و تعدادی را نیز بصورت خطی در طول محیط کشت پخش نمودیم . پلیتها را در ۲±۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم . ابتدا پس از مدت زمان ۱۲ ساعت و سپس هر ۲۴ ساعت یک بار به مدت ۲۱ روز میزان رشد قارچ یا رشد ریسه ها و میزان اسپور زایی را بررسی نمودیم.جهت شمارش اسپورها و بررسی میزان اسپورزایی بطور راندوم هر دفعه دو پتری دیش را توسط ۲۰ میلی لیتر آب مقطرشستشو داده و تعداد اسپورها توسط هموسایتومتر شمارش گردید. برای اطمینان از صحت آزمایش این مرحله در ۳ تکرار انجام گردید و در هر دفعه نتایج تقریبا یکسانی بدست آمد. پس از انجام آزمایش در محیط کشت و شرایط آزمایشگاهی مرحله بعدی کار یعنی بررسی نقش اسانس مرزه در خوراک آبزیان جهت جلوگیری از تولید آفلاتوکسین انجام گردید. بدین صورت که ابتدا خوراک ها را با اوزان مساوی به مقدار ۳۰۰ گرم (با توجه به هماهنگی با آزمایشگاه مرجعان خاتم جهت انجام اندازه گیری آفلاتوکسین) در ظروف درب دار توزین و برای هر غلظت ۳ تکرار در نظر گرفته شد . ظروف آماده شده را در دستگاه اتوکلاو قرار داده وتا درجه حرارت ۱۲۱درجه سانتی گرادبه مدت ۱۵ دقیقه استریل نمودیم . پس از استریل شدن خوراکها ظروف را در دسته های ۱۸ تایی تقسیم نمودیم . سپس میزانهای مختلف اسانس بسته به غلظت و وزن خوراک با ۳ سی سی آب مقطر استریل (جهت تامین میزان رطوبت) در شرایط کاملا استریل و زیر هود میکروبی مخلوط نمودیم . برای نمونه های شاهدبعنوان جایگزین اسانس مرزه فقط از آب مقطر استریل استفاده گردید. سوسپانسیون اسپور نیز پس از آماده نمودن به میزان ۲ سی سی به تمامی نمونه های خوراک اضافه گردید. سپس ظروف را در انکوباتور۲±۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از هر۲۴ ساعت یکبار محیط ها را تکان داده تا از نظر اکسیژن رسانی ،کل محیط در شرایط یکسان قرار گیرند و هم با توجه به اینکه اسانس مرزه حالت فرار دارد میزان ماده ای که در سطح قرار گرفته بود با تکان دادن در سراسر محیط پخش شود . همچنین آلودگی قارچی نیزدر تمام محیط یکسان پخش

گردد. شرایط نور ، دما ، اکسیژن برای تمامی نمونه ها یکسان بود. اولین نمونه برداری پس از گذشت۲۰ روز بصورت تصادفی انجام شد و هر ظرف بصورت سربسته سریعا به آزمایشگاه مرجعان خاتم جهت اندازه گیری میزان آفلاتوکسین ارسال گردید. دومین نمونه برداری پس از۴۰ روز و سومین نمونه برداری نیزپس از۶۰ روز انجام گردید ونمونه ها به آزمایشگاه منتقل و نتایج دریافت گردید. داده ها بصورت جدول در قسمت نتایج آمده است . روش اندازه گیری آفلاتوکسین نیز بر طبق گزارش آزمایشگاه مرجعان خاتم کرمان استفاده از دستگاه HPLC و با روش آزمون ISIRI6872 می باشد.

برای شناسایی ترکیبهای اسانس از دستگاه GC (گاز کروماتوگرافی) و گاز کروماتوگرافی متصل شده به طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. پس از تزریق اسانس به دستگاه های فوق با استفاده از زمان بازداری ترکیبات (tr) اندیس بازداری (RI) طیف جرمی و مقایسه این مولفه ها با ترکیبهای استاندارد یا با اطلاعات موجود در کتابخانه ها و نرم افزار Saturn ترکیبهای تشکیل دهنده اسانسها مورد بررسی کیفی و کمی قرار گرفت.

گاز کروماتوگرافی GC : کروماتوگراف گازی مدل Shinadzu-9A مجهز به دتکتور F.I.D(یونیزاسیون شعله هیدروژن) و داده پرداز Chromatepac ستون DB-5 و به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون گاز حامل هلیم سرعت جریان گاز حامل ۲۲/۷ cm/s و انرژی یونیزاسیون در طیف سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت است برنامه حرارتی ۲۲۰-۱۰۰درجه سانتیگراد با سرعت۲C̊/minودمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سانتیگرادبود.

گازکروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی(GC/Ms)

از گاز کروماتوگراف گازی Varin-3400 متصل شده به طیف سنج جرمی (Saturn2) مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون استفاده شد. دتکتورIontrap گاز حامل هلیم سرعت جریان گاز حامل ۵۰ cm/s و انرژی یونیزاسیون در طیف سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت بوده است . برنامه حرارتی ۲۴۰-۶۰ درجه سانتیگراد با سرعت۳c̊/minودمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتیگرادبود.

۳- نتایج

اثر غلظت های مختلف اسانس مرزه روی رشد و تولید اسپور آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت PDA در جدول شماره ۱ آورده شده است. در شرایط آزمایشگاهی*In vitro*اسانس گیاه مرزه دارای خاصیت ممانعت از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس می باشد. غلظت ppm۵۰۰ و بالاتر بیشترین تاثیر جلوگیری از رشد قارچ رادارد.شایان ذکر است که پس از انجام مراحل تکمیلی این تحقیق که بر روی سایر فاکتورهای فیزیولوژیک بدن آبزیان انجام خواهد گرفت میزان دقیق غلظت اسانس مرزه مورد استفاده در خوراک ، مشخص میگردد.

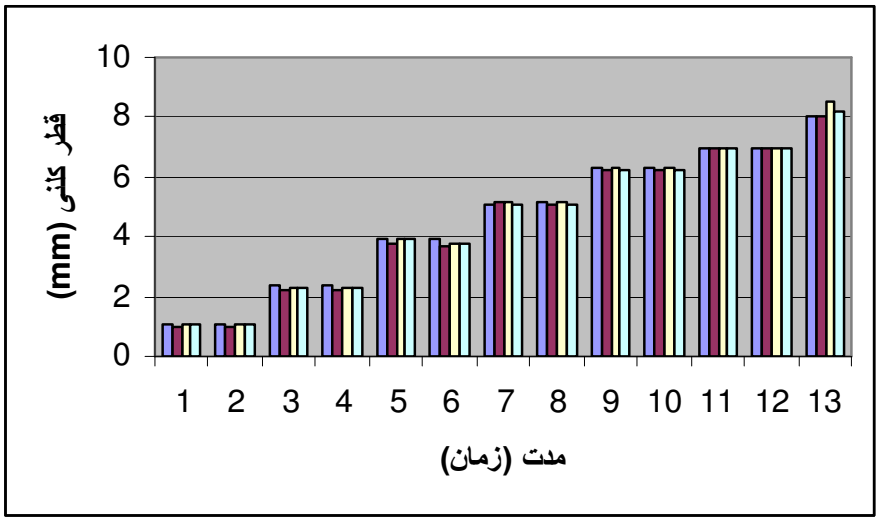
جدول ۱-۳ : اثر غلظت های مختلف اسانس مرزه روی رشد و تولید اسپور بوسیله آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت PDA

غلظت اسانس ppm	میانگین قطر کلنی ها در ۱۳ روز و در ٤ تکرار (میلی متر)	درصد مهار رشد	تعداد اسپور در هر سانتی متر مربع	درصد مهار تولید اسپور
۰	۴/۶۳۹	۰	۵۰	۰
۳۰۰	۲/۱۳۴	٪۲۰	۵۰	٪۵
۴۰۰	۱/۹۳۹	٪۶۰	۵۰	٪۵۰
۵۰۰	۰	٪۱۰۰	۵۰	٪۱۰۰
۶۰۰	۰	٪۱۰۰	۵۰	٪۱۰۰

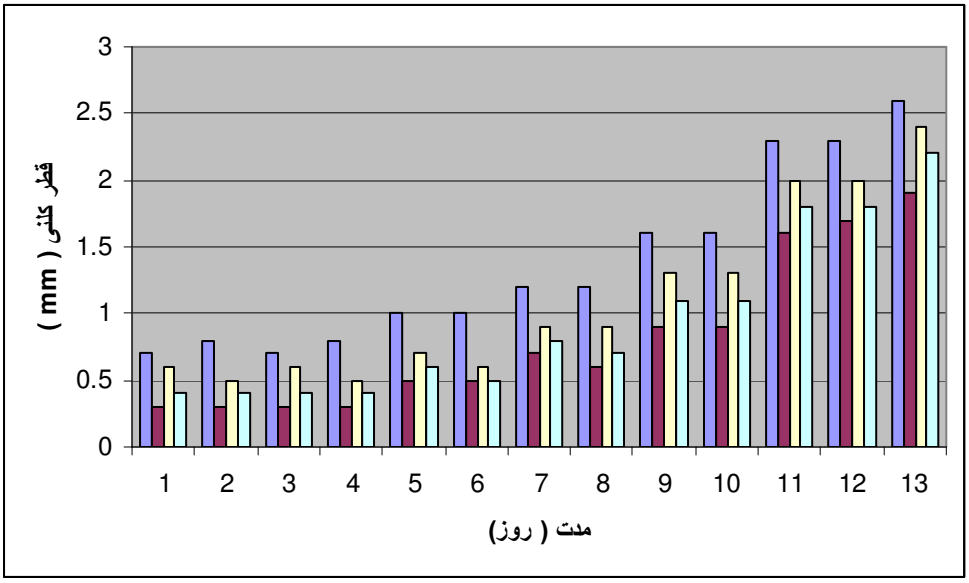
اثر اسانس بر اسپور زایی بیشتر از اثر بر رشد میسیلیوم بود. در بررسی های به عمل آمده اسپورزایی شدید گروه شاهد در مقابل اسپوزایی اندک گروه تیمار مشاهده گردید.

جدول۲-۳ :اندازه گیری قطر رشد کلنی(cm) پس از گذشت زمان ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۳روز در نمونه شاهد و محیطهای دارای اسانس مرزه با رقت های مختلف و قارچ آسپرژیلوس فلاووس

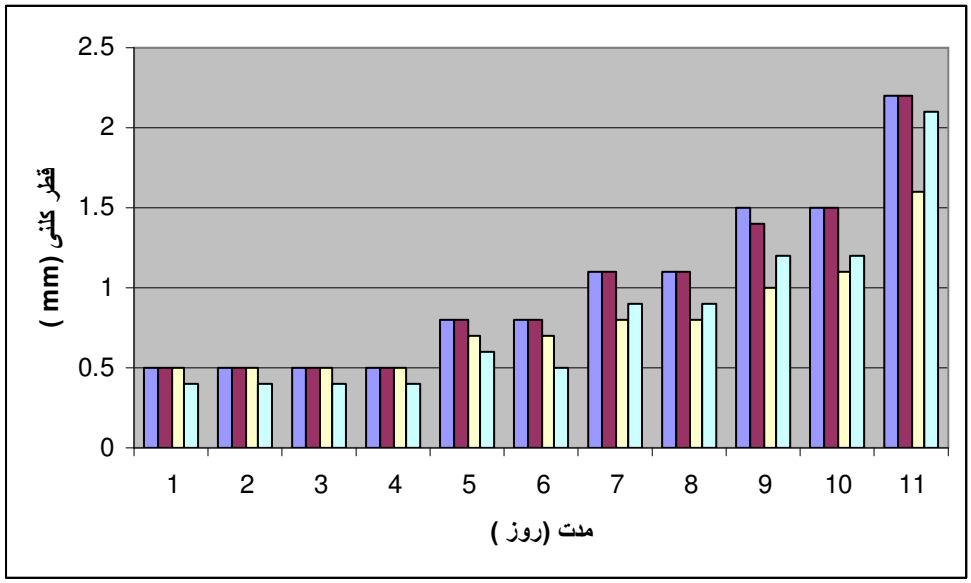
Treatment	2th days	4th days	6th days	8th days	10th days	12th days	13th days
Control(only patogen was inoculated)	2.3	5.15	7	9.73	11.23	13.42	14.53
300 ppm	0.475	0.85	2.037	2.675	3.12	3.612	4.3
400 ppm	0.5	0.875	1.937	2.587	3.01	3.6	3.875
500 ppm	0	0	0	0	0	0	0
600ppm	0	0	0	0	0	0	0



نمودار ۱ : بررسی میزان رشد قطر کلنی قارچ آسپرژیلوس فلاووس درپلیت طی مدت ۱۳ روزدر نمونه شاهد



نمودار ۲ : بررسی میزان رشد قطر کلنی قارچ آسپرژیلوس فلاووس درپلیت طی مدت ۱۳ روزبا غلظت ۳۰۰ ppmاسانس مرزه



نمودار۳ : بررسی میزان رشد قطر کلنی قارچ آسپرژیلوس فلاووس درپلیت طی مدت ۱۳ روزبا غلظت اسانس ٤۰۰ ppm

به علت اینکه در غلظت ۵۰۰ و ۶۰۰ppm اسانس مرزه در نمونه ها هیچ گونه رشد قارچی مشاهده نشد از آوردن منحنی ها خودداری گردید.

جدول۳-۳ : غلظت اسانس مرزه بر روی رشد آسپرژیلوس فلاووس در طی دوره انکوباسیون در محیط PDA

غلظت ۵۰۰ ppm	غلظت ۴۰۰ ppm	غلظت ۳۰۰ ppm	نمونه شاهد	دوره انکوباسیون(روز)
۰	۰	۲	۳	۳
۰	۱	۳	۴	۶
۰	۲	۴	۵	۹
۰	۳	۵	۵	۱۲
۰	۴	۵	۵	۱۵
۰	۵	۵	۵	۱۸

۰ = اصلا رشد نکرده
۱= خیلی کم رشد کرده
۲= ۲۵٪ پوشیده شده با میسیلیوم
۳= ۵۰٪ پوشیده شده با میسیلیوم
۴= ۷۵٪ پوشیده شده با میسیلیوم
۵= تمام محیط پوشیده شده با میسیلیوم

۱-۳- نتایج در نمونه خوراک آبزیان

جدول ٤-۳ : مقایسه میزان آفلاتوکسین B_1 پس از ۳ دوره زمانی ۲۰ – ٤۰- ٦۰ روز در غلظتهای مختلف ٤۰۰-۵۰۰-٦۰۰ppm اسانس مرزه و نمونه شاهد

غلظت اسانس مرزه ppm / زمان ←	۲۰ روز	۴۰ روز	۶۰ روز
غلظت ۴۰۰	۰/۵۳	۰/۵۸	۰
غلظت ۵۰۰	۰/۵۶	۰/۲۲	۰
غلظت ۶۰۰	۰/۵۶	۰/۱۵	۰
نمونه شاهد بدون افزودن اسانس مرزه	۰/۲۳	۰/۵۷	۱/۱۳

جدول ۵-۳ : مقایسه میزان آفلاتوکسینG_1پس از ۳ دوره زمانی ۲۰ – ٤۰- ٦۰ روز در غلظتهای مختلف ٤۰۰-۵۰۰-٦۰۰ppm اسانس مرزه و نمونه شاهد

غلظت اسانس مرزه ppm / زمان ←	۲۰ روز	۴۰ روز	۶۰ روز
غلظت ۴۰۰	۲/۱۰	۱/۱۱	۰/۴۸
غلظت ۵۰۰	۱/۱۹	۰/۶۴	۰/۲۴
غلظت ۶۰۰	۰/۸۷	۰/۴۴	۰/۱۵
نمونه شاهد بدون افزودن اسانس مرزه	۰/۲۰	۱/۲۱	۱/۴۹

جدول ٦-۳ : مقایسه میزان کل آفلاتوکسین هایB_1,B_2,G_1,G_2 پس از ۳ دوره زمانی ۲۰ – ٤۰- ٦۰روز در غلظتهای مختلف ٤۰۰-۵۰۰-٦۰۰ppm اسانس مرزه و نمونه شاهد

غلظت اسانس مرزه ppm / زمان ←	۲۰ روز	۴۰ روز	۶۰ روز
غلظت ۴۰۰	۲/۵۲	۰/۸۲	۰/۸۲
غلظت ۵۰۰	۱/۷۵	۰/۸۶	۰/۵۲
غلظت ۶۰۰	۱/۴۶	۰/۸۴	۰/۱۵
نمونه شاهد بدون افزودن اسانس مرزه	۰/۴۳	۱/۷۸	۲/۶۲

جدول ۷-۳: نتایج GC/MS اسانس مرزه

No	Name of Compound	Tot AR ٪
1	Alpha – thujene	1.008
2	Alpha- pinene	1.480
3	Beta- pinene	0.588
4	myrcene	1.788
5	Alpha- phellandrene	0.287
6	Alpha-terpinene	4.498
7	p- cymene	10.082
8	limonene	0.755
9	Gamma-terpinene	36.498
10	thymol	0.718
11	carvacrol	41.239
12	e- caryophyllene	0.538
13	Beta-bisabolene	0.527

همانطور که مشاهده میشود بالاترین درصد مربوط به مواد موثره کارواکرول و گاما ، ترپینن می باشد .

۲-۳- آنالیز واریانس فاکتوریل

در جدول زیر اثر تیمار(غلظت) روی صفت B_1 در سطح ۱٪ معنی دار است یعنی با احتمال ۹۹٪ اطمینان یا بعبارتی با احتمال کمتراز ۱٪ خطا میتوان گفت که بین میانگین تیمارهای موردبررسی (چهار غلظت + شاهد) اختلاف معنی دار وجود دارد که با مقایسه میانگین به روش دانکن در جدول بعد مشخص شد بین غلظت های اعمال شده در این آزمایش(۳ غلظت۴۰۰ و۵۰۰ و ppm۶۰۰) اختلاف معنی داری وجود ندارد و در یک کلاس قرار میگیرند ولی بین این ۳غلظت وغلظت های ۳۰۰ و شاهد همان اختلاف مذکور در سطح ۱٪ وجود دارد بطوری که شاهدو غلظت ۳۰۰ نیزدر یک کلاس جداگانه قرارگرفته است.همچنین با توجه به نتایج آنالیز در جدول زیر اثر زمانها (۲۰روز،۴۰ روز و ۶۰روز) در سطح ۵٪ معنی دار است که بیانگر این موضوع است که زمانهای اعمال شده بر روی صفت B_1 اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ ایجاد کرده اند که با توجه به مقایسه میانگین زمانهای مختلف در صفت مذکور مشخص شد که زمان ۲۰روز و ۶۰روز دارای اثرات معنی دار مشخصی در سطح ۵٪ داشته اند که در دو کلاس جداگانه (BوA) قرار گرفته اند و اثر ۴۰روز در کلاس حد واسط این دو کلاس یعنی AB قرار میگیرد که اختلاف این کلاس با هرکدام از دو کلاس AوB به تنهایی معنی دار نیست.چون مقادیر صفت B_2برای غلظتهای مختلف و در زمانهای مختلف همگی صفر بودند لذا تجزیه واریانس برای این صفت انجام نشده که البته نتیجه گیری از این حالت یعنی موثر بودن هرکدام از غلظتها و عدم وجود مقدار صفتB_2 مذکور میباشد.

جدول ۸-۳ : جدول آنالیز تجزیه واریانس صفت B_1 (آفلاتوکسین B_1)

منابع تغییرات : صفت B_1

صفات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	f	
تکرار	۵/۲۴۲ E-۰۲	۲	۲/۶۲۱ E-۰۲	ns۱/۲۷۷	
تیمار	۰/۹۳۴	۳	۰/۳۱۱	۱۵/۱۷۱	**
زمان	۰/۲۱۵	۲	۰/۱۰۷	۵/۲۳۳	*
تیمار× زمان	۲/۶۳۹	۶	۰/۴۴۰	۲۱/۴۲۱	**
خطا	۰/۴۵۲	۲۲	۲/۰۵۳ E-۰۲		---

جدول ۹-۳ : آنالیزداده ها ی غلظت اسانس و مدت زمان تاثیرآن بر روی میزان آفلاتوکسین به روش آزمون دانکن

زیرمجموعه	زمان (روز)	زیر مجموعه	غلظت (ppm)
۰/۲۸۲۵a	۶۰	۰/۲۳۶۷a	۶۰۰
۰/۳۸۱۷ab	۴۰	۰/۲۶۲۲a	۵۰۰
۰/۴۷۱۷b	۲۰	۰/۳۷۲۲a	۴۰۰
---	---	۰/ ۶۴۳۳b	۰

حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده معنی دار بودن می باشد .

اثر تیمار(غلظت) و زمان روی صفت G_1نیز مورد آنالیز و بررسی قرار گرفته است و نتایج بدست آمده موید این نکته است که به جز اثر متقابل تیمار × زمان که درسطح ۵٪ معنی دار است بقیه تیمارها در صفت مذکور معنی دار نمیباشد و بنابراین نیازی به مقایسه میانگین نمیباشد.

چون مقادیر صفت G_2برای غلظتهای مختلف و در زمانهای مختلف همگی صفر بودند لذا تجزیه واریانس برای این صفت انجام نشده که البته نتیجه گیری از این حالت یعنی موثر بودن هرکدام از غلظتها و عدم وجود مقدار صفتG_2 مذکور میباشد.اثر تیمار(غلظت) و زمان روی مجموع صفات(B_1 ، B_2 ، G_1 وG_2) نیز مورد آنالیز و بررسی قرار گرفته است.نتایج حاکی از آن است که به جز اثر متقابل تیمار * زمان که درسطح ۵٪ معنی دار است بقیه تیمارها در صفت مذکور معنی دار نمیباشد و بنابراین نیازی به مقایسه میانگین نمیباشد.

٤- بحث

امروزه رویکردهای جدیدی نسبت به استفاده از گیاهان دارویی از جمله اثرات ضد میکروبی آنها ایجاد شده است بطوریکه مطالعات بسیار زیادی بر روی اثرات ضد میکروبی اسانسهای گیاهان مختلف صورت می گیرد. (۳۳)بنا بر تحقیقات انجام شده در ادویه جات و چاشنی ها نیز خاصیت ضد میکروبی بویژه ضد قارچی مشاهده شده است. Kumarو همکارانش (۲۰۰۶) گزارش کرده اند که خردل ، سیر سبز ، دارچین و رازک بازدارنده رشد قارچ هستند در حالی که فلفل ، میخک ، آویشن ، چای سبز، دارچین و رازک باز دارنده توکسین به تنهایی میباشند. Blumaو همکارانش(۲۰۰۷) نشان دادند که میخک ، دارچین ، خردل و سیر بازدارنده رشد کپک های توکسین زا هستند. Daferaraو همکارانش (۲۰۰۰) نشان دادند که دارچین ، میخک و خردل خاصیت ضد مایکوتوکسینی دارند و آویشن خاصیت ضد آفلاتوکسینی دارد . بطور کلی تحقیقات انجام شده نشان داده که ادویه جات در غلظت ۲ درصد تولید آفلاتوکسین را تا ۹۷ درصد کاهش میدهد. این مطالعه نیز با هدف یافتن راه حلی برای مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس وتائیدی بر خاصیت ضد قارچی و ضد آفلاتوکسینی گیاه مرزه انجام گرفت. نتایج بر روی محیط کشت (*Invitro*) نشان داد که اسانس گیاه *Saturejahortensis* دارای اثرات ضد قارچی قوی بر علیه آسپرژیلوس فلاووس می باشد . در این تحقیق حداقل غلظت بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس توسط اسانس مرزه ۵۰۰ ppm بود. با توجه به منحنی ها و داده های بدست آمده این نتایج نشان می دهد که بین نمونه شاهد واستفاده از۳۰۰ppmاسانس مرزه با غلظت های ۴۰۰ppmبه بالا تفاوت هایی وجود دارد و هر چه غلظت اسانس استفاده شده بالاتر رود اثر مهار کنندگی بر روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بیشترو معنی دارتر میشود بطوریکه غلظت ۳۰۰ پی پی ام تفاوت چندانی با نمونه شاهد از نظر رشد قارچ (بر طبق رسم منحنی) وجود ندارد ، ولی هر چه غلظت از ۴۰۰ بالاتر میرود تفاوت معنی دار تر میگردد . بطوریکه غلظت ۵۰۰ پی پی ام اسانس مرزه کاملا بر روی محیط کشت اثرات بازدارندگی از رشد را بر روی قارچ در بر دارد . این اثرات ضد قارچی اسانس مرزه رامیتوان به ۲ ماده موثره تیمول و کارواکرول مربوط نمود. همانطور که Gianni *et al.*,2004 و Gullucе*etal.*,2003و *Gowda et al.,2003*و Boyrazandozcan,2006 در گزارشاتشان به این مطلب اشاره کرده اند. البته NeslihanDikbas,2008 به این نتیجه رسید که کارواکرول اثر ممانعت کنندگی

بیشتری از تیمول بر روی آفلاتوکسین دارد..در نتایج بدست آمده میزان تولید آفلاتوکسین در برابر ۴۰۰ ppm اسانس مرزه تا ۴۰ روز اول به صورت تصاعدی بالا رفته و پس از آن شدیدا کاهش یافته و چنین تفسیر میشود که این کاهش ، به علت اثر گذاری اسانس مرزه بر چرخه بیوسنتز آفلاتوکسین می باشد که در اثر گذشت زمان توانسته یکی از آنزیمهای موجود در چرخه را بلوکه کند و جلوی سنتز آفلاتوکسین بعد از ۴۰ روز گرفته شود. ترکیبات موثره اسانس مرزه که در این مورد بررسی قرار گرفتند دارای خاصیت ضد قارچی می باشند و میتوان این پیشنهاد را داد که فعالیت این ترکیبات از طریق مهار مسیر بیوسنتز تولید آفلاتوکسین حتی بدون اینکه عملا روی رشد قارچ تاثیر گذارند قادر به کاهش تولید آفلاتوکسین هستند . بهر حال بهترین ترکیبات ضد قارچی آنهایی هستند که هم رشد قارچ و هم تولید توکسین را متوقف کنند.در طی ارزیابی ترکیبات گیاهی که توسط GowdaN.K.Sانجام داد عصاره میخک بهترین ترکیبات ضد قارچی در ۱-۰/۵٪ یا ۱۰۰٪ کاهش در تولید آفلاتوکسین داشت .همچنین زردچوبه ۸۵-۷۷٪ ، سیر ۸۴-۸۰٪ و پیاز ۷۷-۷۳٪ کاهش در تولید آفلاتوکسین ایجاد نمودند. رسولی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۷ نتایجی حاکی از امکان استفاده از اسانسهای گیاهی در کنترل رشد قارچ و پیشگیری از تولید آفلاتوکسین بدست آوردند.Razzaghi-Abyaneh*etal*.,2008 در تحقیقی که بر روی اثرات ممانعت کنندگی اسانس مرزه بر روی رشد و تولید آفلاتوکسین بر روی قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس داشتند به این نتیجه رسیدند که اسانس مرزه یک پتانسیل ممانعت کننده مهم بر روی تولید آفلاتوکسین B_1 و G_1 تولید شده از قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس می باشد و در جداسازی مواد موثره که توسط RP-HPLC انجام دادند آنها نیز تائیدی بر اثرات مواد موثره تیمول و کارواکرول داشتند. محبوبی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۶ در طی انجام تحقیقی به این نتیجه رسیدند که اثرات قارچ کشی اسانس مرزه از اثرات ضد باکتریایی آن بیشتر است . نتایج بدست آمده نشان داد که اسانس مرزه تفاوت معنی داری نسبت به دیگر اسانسهای مورد استفاده در تحقیق در قطر هاله عدم رشد نشان میدهد ($P<0.001$) بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیبات مرزه و آویشن بود.(۴۵ میلی متر). گزارشات بدست آمده از تحقیقات نشان داده که اثرات ضد میکروبی اسانسها وابسته به خاصیت هیدروفوبیسیتی و لایه های غشاء پلاسماتیک میکروبهاست. یونهای موجود نیز بر روی غشاء پلاسماتیک بیشترین اثر را روی نیروی محرک پروتون و مقدار ATP درون سلول و همچنین فعالیتهای میکروبها

شامل اتساع غشا پروتوپلاسم گیاهی جهت کنترل فشار ، انتقال محلول ها و تنظیم متابولیسم دارند که این عوامل خود میتواندعلت موفقیت تحقیقات در استفاده از اسانسهای گیاهی بر علیه بیماریها گردد . (۲۴)در این تحقیق این نتیجه بدست آمدکه با استفاده از غلظتهای مختلف اسانس مرزه میتوان از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس (مولد آلودگی قارچی درگیاهان ، خوراک انسان ، دام ، آبزیان) و کنترل تولید آفلاتوکسین توسط این قارچ جلوگیری بعمل آورد.

۱-٤- مدیریت و پیشگیری از آفلاتوکسین

همانطور که گفته شد آفلاتوکسینها سمومی هستند که بطور عادی بوسیله کپکها تولید می شوند. این کپکها اغلب روی دانه ها وغذاهای آماده ای که در درجه حرارت ۲۷ درجه سانتی گراد یا بالاتر ودر رطوبت بیش از ۱۴ درصد نگهداری شده اند یافت می شوند. برای جلوگیری از بروز آفلاتوکسیکوزیس ، باید از تاریخ تولید وتاریخ انقضاء غذاهای خریداری شده ونیز از روشهای انبار کردن غذاها اطلاع کافی داشته باشیم .(۱۷-۱۴)

زیانهای اقتصادی ناشی از آلوده شدن مواد غذائی وخوراک آبزیان ، دام وطیور به افلاتوکسین ها شامل خسارات اقتصادی وارده به صنعت آبزی پروری ،دامپروری ،تلفات ماهی ،دام وطیور ،ضعیف شدن سیستم ایمنی آبزیان ،کاهش رشد وتولید ،افزایش ضریب تبدیل مواد غذائی ،هزینه های برنامه ریزی جهت کاهش خطرات می گردد. طی نگهداری باید میزان تنفس دانه‌ها به حداقل رسیده و ثابت باقی بماند، این عمل با نگهداری رطوبت دانه در سطح پائین میسر می‌گردد. محصولات مرطوب و خیس نباید انبار گردند. کنترل حشرات و جوندگان در انبار خیلی مهم است چون فعالیت تنفسی آنها منجر به ایجاد نقاط مرطوب در روی دانه شده و همچنین باعث انتقال اسپورهای قارچی به دانه‌ها می‌گردند از طرف دیگر با صدمه رساندن به غلاف و دانه سبب آسان شدن حملهٔ کپکها به محصول می‌گردند.کنترل دما و رطوبت انبار یک عامل مهم در جلوگیری از کپک‌زدگی است. هوادهی کافی در انبار باعث پخش یکنواخت رطوبت و دما می‌گردد محدودیت هوادهی باعث تجمع رطوبت به علت تنفس دانه شده واین عمل به توسعه حمله قارچی و سایر آسیبهای میکروبی کمک می‌کند. متأسفانه معمولاً انبارهای بعد از برداشت محلی بوده و شرایط کنترل شده در آنها رعایت نمی‌گردد. همچنین انبار و لوازم آن باید

تمیز و عاری از کپک باشند تا منبع آلودگی محصول به کپک نگردند. (۱۱) از بکار بردن غذاهایی که تغییر رنگ داده ،بصورت قلمبه و بهم چسبیده اند و بوی کپک می دهند پرهیز کنیم.بطور منظم ظروف غذا،انبارمواد غذایی وغذاده های اتوماتیک را نظافت کنیم. انبارکردن غذا بصورت صحیح (در مکان خنک، خشک،روی پالتها وبه فاصله حداقل یک قدمی دیوار) می توانند از ضربات اقتصادی بیش از حد جلوگیری کنند.تاکید میشود قبل از مصرف از شرایط انبارداری (رطوبت ، دما ، نور و...) از مواد تشکیل دهنده خوراک و تمامی مسائلی که باعث آلوده شدن به آفلاتوکسین میگردد اطلاع و آگاهی کافی داشته باشند. خوراک آبزیان بایستی از محلی مناسب و شناخته شده و غیرآلوده به بیماری، تهیه شود.

بنابر آنچه ذکر گردید در حال حاضر پیشگیری وخنثی کردن این سموم در خوراک آبزیان ، دام وانسان از مسائل مهمی است که صنایع غذائی دنیا باآن روبرو است وبایستی جهت حفظ بهداشت وسلامتی افراد جامعه با برنامه ریزیهای دقیق نسبت به حذف آنها از مواد غذائی اقدام نمود.

جدول ۱-٤: تاثیر عصاره‌های گیاهی بر روی تولید آفلاتوکسین

نام	غلظت	تاثیر بر روی آفلاتوکسین
روغن دارچین	۲۰۰-۲۵۰ ppm	ممانعت از تشکیل آفلاتوکسین
روغن سیر	۲۰۰-۲۵۰ ppm	ممانعت از تشکیل آفلاتوکسین
سیر	٪۰/۱	ممانعت از تشکیل آفلاتوکسین
زیره سبز	٪۵	کاهش تشکیل آفلاتوکسین تا ٪۱۰۰
نعناء	٪۱۰	کاهش تشکیل آفلاتوکسین تا ٪۱۰۰
فلفل سیاه	٪۱۰	کاهش تشکیل آفلاتوکسین تا ٪۱۰۰
زنجبیل	٪۱۰	کاهش تشکیل آفلاتوکسین تا ٪۱۰۰

پیش گیری ، اولین خط دفاعی در کاهش آلو دگی قارچی (کپک) و تولید آفلاتوکسینمی باشد ونمونه گیری و بکار گیری روش های دقیق جهت کاهش خطر مایکوتوکسیکوز امری ضروری می باشد. برخی مواد خوراکی

ممکن است دارای ترکیباتی باشند که برای رشد کپک و تولید مایکوتوکسین ها اثر بازدارندگی داشته باشند . گیاهان دارویی خاص ، ادویه ها و روغن های ضروری شامل ترکیبات ضد قارچ طبیعی هستند . (۷) گزارش شده است که خردل ، سیر ، پوست درخت دارچین و رازک اثر بازدارندگی بر رشد کپک دارند در حالیکه فلفل ، میخک ، آویشن و چای سبز فقط اثر بازدارندگی بر تولید سم دارند . (۱۹)همچنین عسل خاصیت ضد قارچی و ضد سمی در برابر *A.flavus* و *A.parasiticus* دارد. به طور کلی هدف ، توصیه اقداماتی برای جلوگیری از سموم قارچی در مواد غذایی انسان و خوراک آبزیان ، دام و طیور و محصولات آنها می باشد .

۵- نتیجه گیری

از نتایج بدست آمده چنین برآورد میشود که اسانس مرزه دارای خاصیت ضد قارچی قوی می باشد و قادر به جلوگیری از رشد آسپرژیلوس فلاووس است. شایان ذکر است که پس از انجام مراحل تکمیلی این تحقیق که بر روی سایر فاکتورهای فیزیولوژیک بدن آبزیان انجام خواهد گرفت میزان دقیق غلظت اسانس مرزه مورد استفاده در خوراک ، مشخص می گردد.

تشکر و قدردانی

از اساتید گرامی جناب آقایان دکتر شریف روحانی، دکتر شریف پور، دکتر سپهداری، دکتر درویشی و آقایان مهندس ولی،مهندس کدوری قدردانی می نمایم .همچنین از جناب آقای دکتر پناهی ریاست محترم مرکز که با تدابیر اندیشمندانه خود بنده را در اجرای طرح یاری فرموده اند کمال تشکر را دارم . از جناب آقای مهندس امینایی با مشاوره های ارزشمند و مهندس امامی فر که در تمامی مراحل آزمایشگاهی طرح با بنده همکاری نموده اند مراتب تقدیر را اعلام میدارم. از جناب آقای دکتر داوود درویشی و جناب آقای مهندس ذبیح الله راوری نیز که بنده را در آنالیز داده ها رهنمون شدند کمال تشکر را دارم .

منابع

۱- دادار ،م.،ه.میزان زاده .، ر.مهرجردی. (۱۳۸۵) . مقایسه سطوح مختلف عصاره مرزه و تاثیر آن بر جوجه های گوشتی.(www.plant.Mihanblog.com)

۲- رسولی ، ا.، وهمکاران . ۱۳۸۷ . مهار تولیدآفلاتوکسین قارچ *Aspergillus parasiticus* توسط روغن های اسانسی . مجله پژوهش و سازندگی .ویژه نامه منابع طبیعی.

۳- سالمی ، ا.، ف. بهارلو .، ع ، حیدری. ۱۳۸۷.قارچ شناسی و بیماری های قارچی در دامپزشکی انتشارات دانشگاه تهران.

۴- مرتضوی،ع.، ف.طباطبایی. ۱۳۷۶. توکسینهای قارچی . انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۵- محبوبی ، م.،م.م، فیض آبادی. ۱۳۸۸. بررسی اثر ضد میکروبی اسانس های آویشن ، مرزنجوش ، مرزه و اکالیپتوس بر باکتریهای اشرشیا کلی ، سالمونلا تیفی موریوم و قارچهای آسپرژیلوس نایجر وآسپرژیلوس فلاووس. فصلنامه گیاهان دارویی .

۶- مسکوکی ،ع.، س،ع، مرتضوی . ۱۳۸۵. کنترل رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس توسط اسانسهای طبیعی در محیط کشت مصنوعی . فصلنامه گیاهان دارویی.

7-Ashok kumar,Ravindra shukla, Priyanka singh, Anuradha,Nawal K.Dubay.2010.Efficacy of extract and essential oil of Lantana indica Roxb.against food contaminating moulds and aflatoxin B_1 production. International journal of food science & technology,45(1),179-185.

8- Bluma R,Amadian MR, Daghero j, Etcheverry M(2007). Control of *Aspergillus* section Flavi growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils .J.Appl. Microbiol.1723:1364-5072.

9-Boyraz, N., Ozcan, M.,2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil , hydrosol, ground material and extract of summer savory (satureja hortensis l.) growing wild in Turkey. International Journal of food Microbiology 107,238-242.

10- Daferera DJ, Ziogas BN and Polissiou MG.GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. J. of Agriculture and Food chemistry 2000; 48, 6: 2576 - 81.

11- David M.Wilson and Edward Jay.1975. Influence of Modified Atmosphere Storage on Aflatoxin Production in High Moisture Corn. Applied Microbiology , p.224-228.

12- Dikbas,N.,Kotan, R.,Dadasoglu,F.,and F.Sahin (2008). Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol of food microbiology ,124,179-182.

13-Dusanee Thanaboripat, Yaowapa Suvathi, Prapaporn Srilohasin, Saowalak Sripakdee Oraphan Patthanawanitchai and Sittichai Charoensettasilp.(2007).Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*.Kmttl Sci. Tech. J. Vol. 7 No. 1

14-Fan JJ and Chen JH. Inhibition of aflatoxinproducing fungi by welsh onion extract. J. of Food Protection (1999); 62, 4: 414 - 7.

15- Gianni Sacchetti, Silvia Maietti, Mariavittoria Muzzoli, Martina Scaglianti, Stefano Manfredini, Matteo Radice, Renato Bruni.2004. Comprative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradical and antimicrobials in foods. Food Chemistry 91.621-632

16-Gowda,N.K.S.,Malathi,V.,Suganthi,R.u.,2003. Screening for aflatoxin and effect of moisture , duration of storage and from of feed on fungal growth and toxin production in livestock feeds. Anim.Nutr.Feed Technol.3,45-51.

17- Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M.,Sökmen, A., Sahin, F., 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51 (14), 3958–3965

18-H.E.Pattee, Sandra L.Sessoms and J.W.Dickens. 1966. Influence of Biologically Modified Atmospheres on Aflatoxin production by *Aspergillus flavus.* Oleagineux,21.annee,n12.

19-Irkin, R., Korukluoglu, M., 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. African Journal of Biotechnology 6 (4), 384–387.

20-Jayashree T and Subramanyam C. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Letters in Applied Microbiology 1999; 28: 179 - 83.

21- J.Varga,J.C.Frisvard and R.A.samson.(2009).A rappraisal of fungi producing aflatoxins. World mycotoxin journal,2(3):263-277

22-Kumar R, MishraAK, Dubey NK and Tripathi YB. Evaluation of Chenopodium ambrosioides as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. International J. of Food Microbiology 2006; 115: 159 - 64.

23- Liu Ruiqian , Yang Qian,Dusanee Thanaboripat, Prapimpuk Thansukon.,2010. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin production. J. of Agriculture and Food chemistry.

24-Lokman Alpsoy.(2010) Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. African Journal of biotechnology vol. 9 (17) , pp.2474-2481.

25-Neslihan Dikbas, Recep kotan, Fatih Dadasoglu, Fikrettin Sahin. 2008. Control of Aspergillus flavus with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* .International Journal of food microbiology 124. 179-182

26- Newbold,C.J.,Mclntosh,F.M.,Williams,P.,Losa,R.and Wallace , R.J.(2000).Effects of essential on rumen fermentation. Animal Science.

27- N.K.S.Gowda, V.Melati, R.u.Saganthi.,2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Animal feed science and technology 116(2004)281-291

28-Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and close essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control. doi:10.1016/j. foodcont. 2006. 12.003.

29-Patkar K, Usha C, Shetty H, Paster N and Lacey. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B_1 production by *A. flavus.* Letters in Applied Microbiology 1993; 17: 49 – 51.

30- Rasooli I, Rezaei MB and Allameh A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlok. Food Control 2006; 17: 359 - 64.

31-Rasooli I and Owlia P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Phytochemistry. 2005; 66:

2851 - 6.

32- Razzaghi- Abyaneh, .,ShamsGhahfarokhi,M.,Yoshinari,T.,Rezaee,M.B.,Jaimand, K.,Nagasawa, H.,and S.Sakuda(2008). Inhibitory effects of *satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Hnternational Journal of food Microbiology, 123, 228-233.

33-Sadeghi nejad, Batool.2010., Antifungal activity of *satureja Khuzestanica* Leaves. Journal of Microbiology.

34-Sa´nchez E, Heredia N, Garcıa S. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. International J. of Food Microbiology 2005; 98: 271 -9

35-Sefidkon, F., Abbasi, K., Khaniki, G.B., 2006. Influence of drying and extraction method on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. Food Chemistry 99, 19–23.

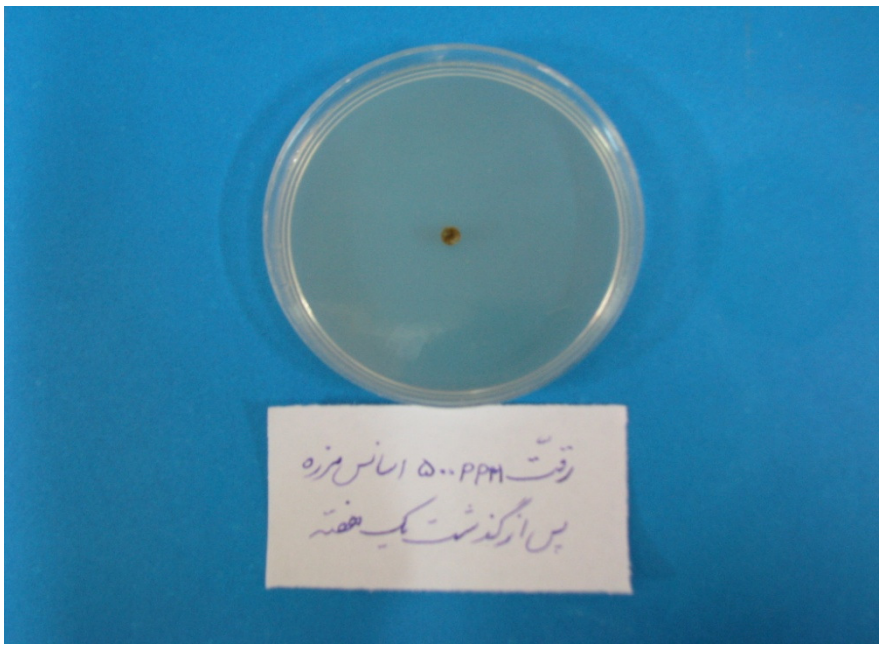
36- Singh G, Maurya S, Lampasona MP and Catalan C. Chemical constituent, antifungal and antioxidative potential of Foeniculum vulgare volatile and its acetone extract. Food Control 2006; 17: 745 – 52

37-Soliman KM, BadeaaRI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and chemical toxicology. 2002; 40: 1669 - 75.

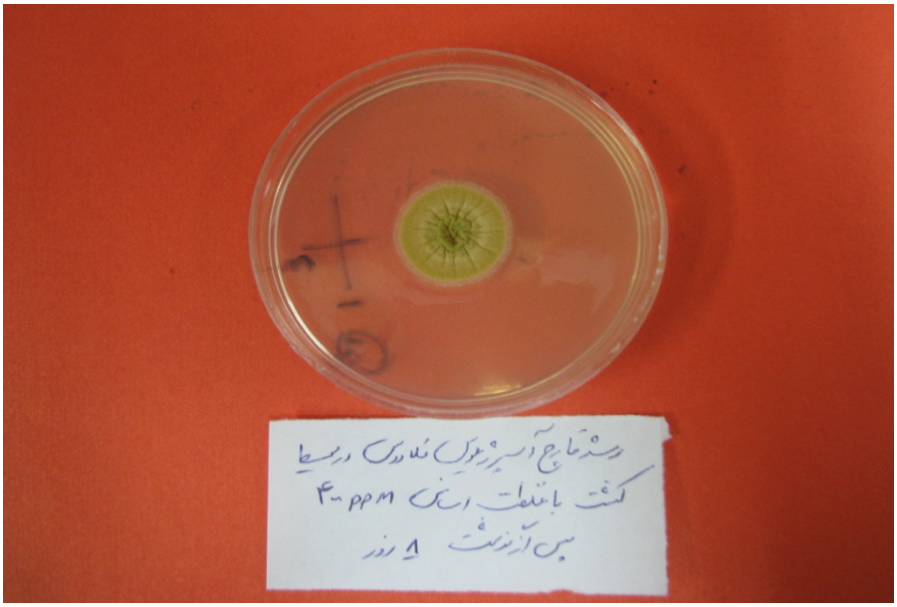
38-Sokovic M, Tzakou O. Pitarokili D,Couladis M . Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. Nahrung . 2002; 46:317-20

39-Tatjana mihajilov krstev,Dusanka kitic ,.2010 . Antimicrobial activity of *satureja hortensis*.L essential oil ageinst pathogenic microbial strains. Arch.Biol.sci.,Belgrade,62(1),159-166

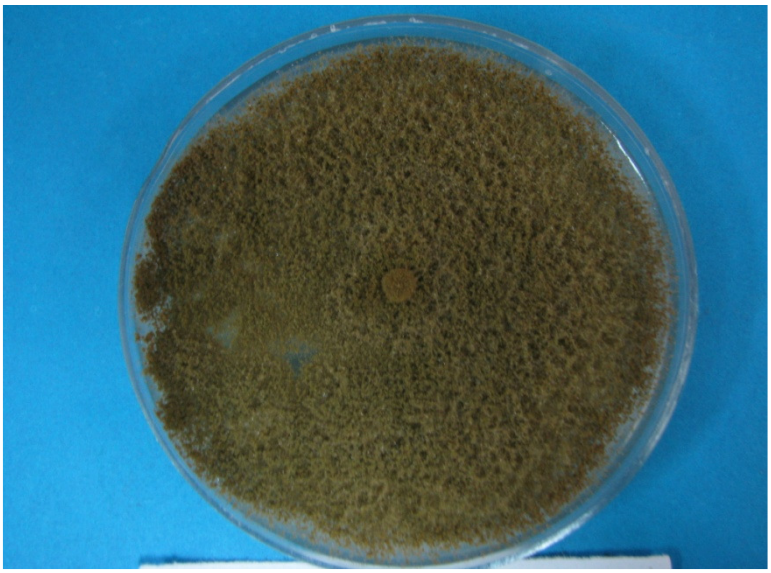
پیوست



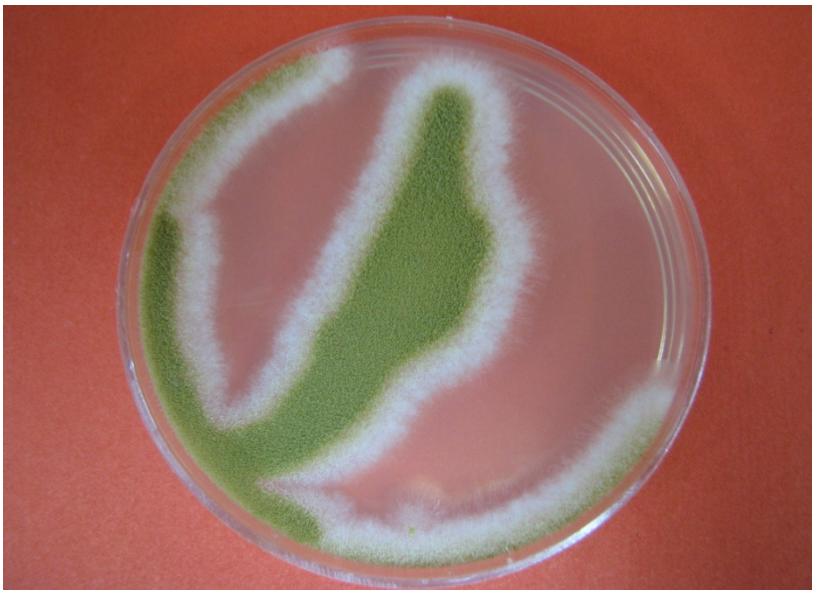
تصویر ۱ :رشد کلنی قارچ پس از گذشت یک هفته با استفاده از رقت ۵۰۰ ppm اسانس مرزه



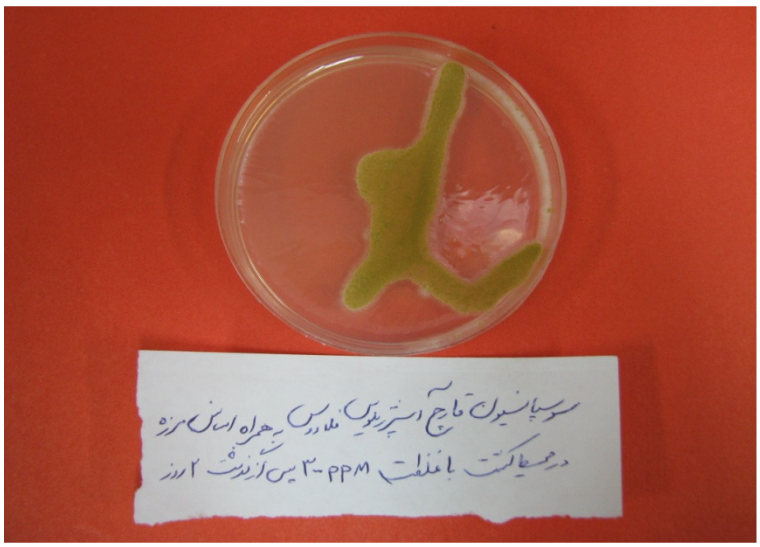
تصویر۲ : رشد کلنی قارچ پس از گذشت ۸ روز با استفاده از رقت ٤۰۰ ppm اسانس مرزه



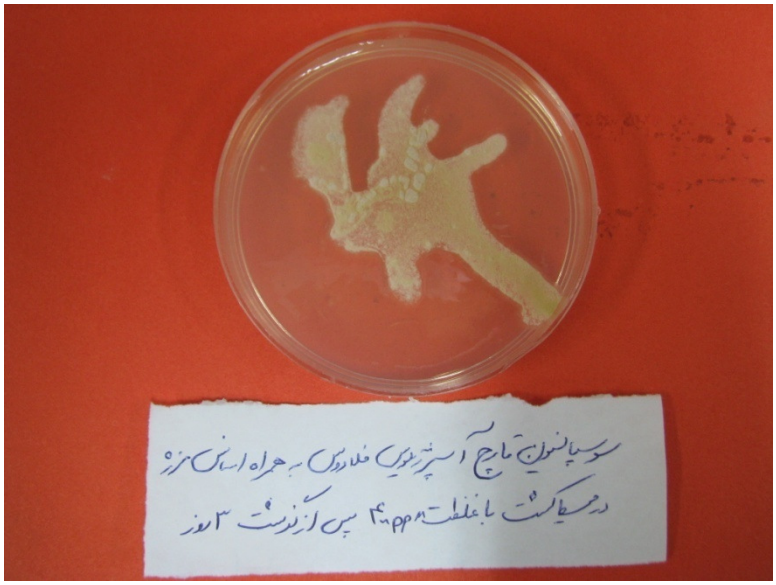
تصویر۳: رشد کلنی قارچ در نمونه شاهد پس از گذشت ۷ روز



تصویر٤ : تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ آسپرژیلوس فلاووس به محیط PDA در نمونه شاهد پس از گذشت ۲ روز

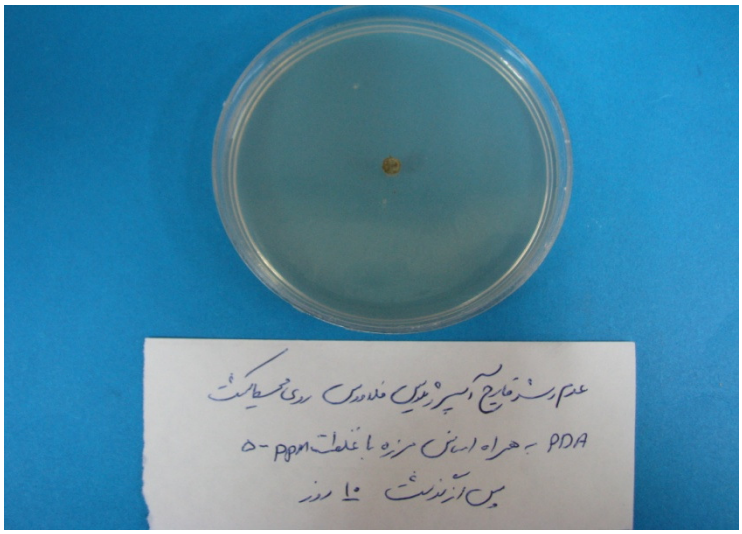


تصویر۵ : تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ به محیط حاوی ۳۰۰ ppm اسانس مرزه پس از گذشت ۲ روز

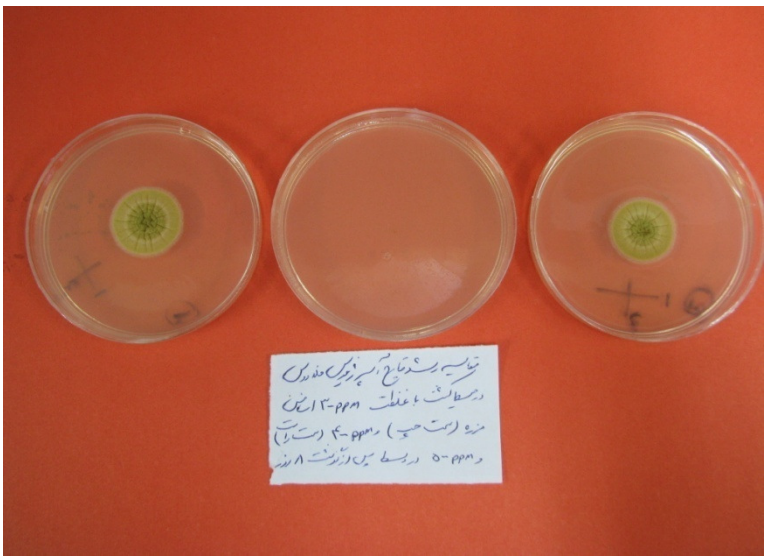


تصویر٦ : تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ به محیط حاوی ٤۰۰ ppm اسانس مرزه پس از گذشت ۳ روز

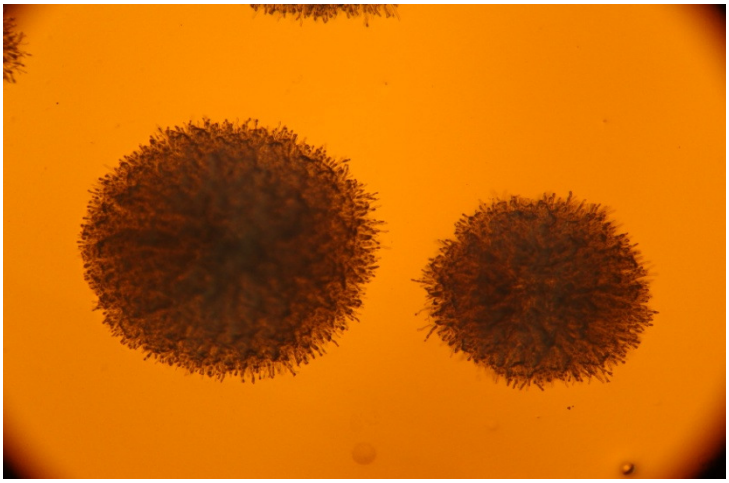
تصویر۷ : مقایسه تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ به محیط حاوی ۵۰۰ ppm اسانس مرزه با نمونه شاهد پس از گذشت ۳ روز



تصویر۸ : رشد کلنی قارچ در محیط حاوی ۵۰۰ ppm اسانس مرزه پس از گذشت ۱۰ روز

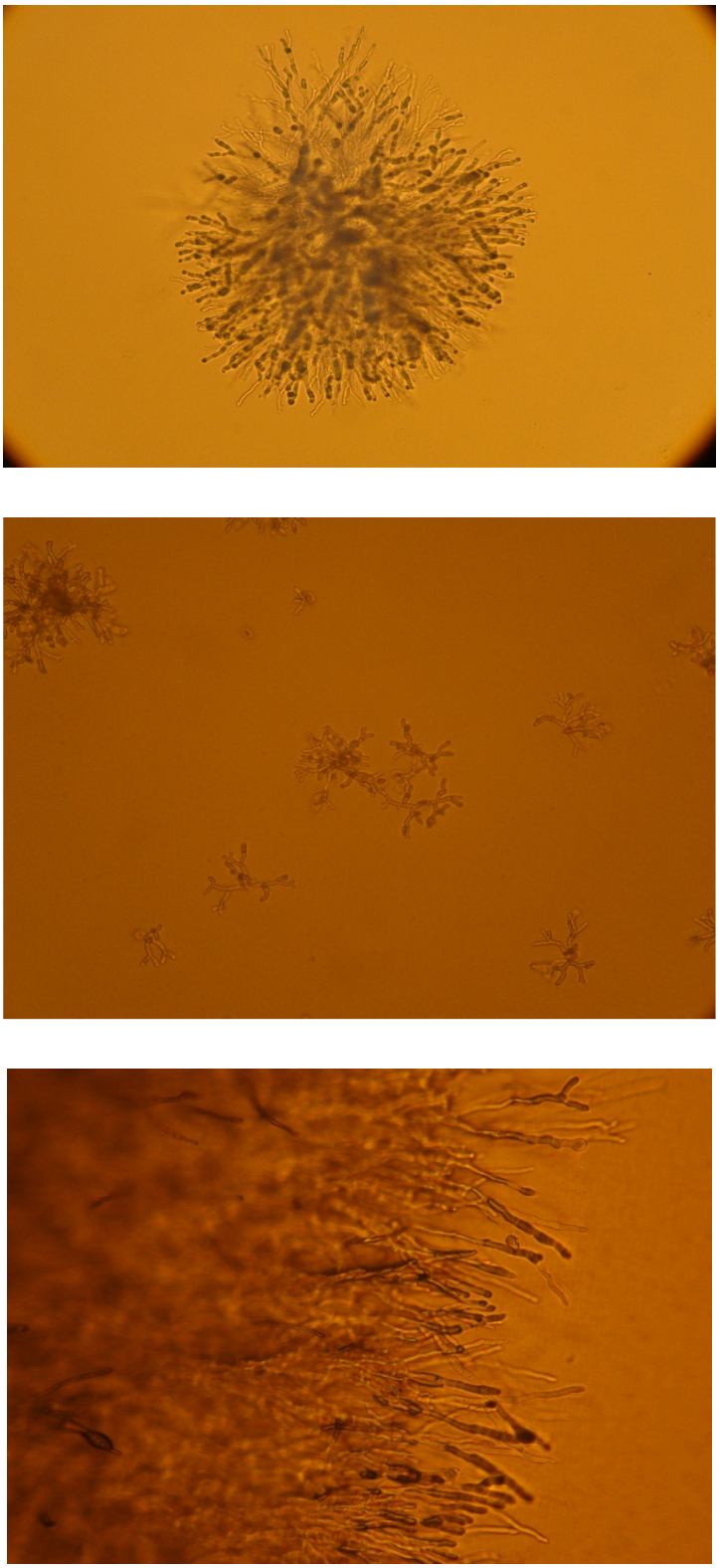


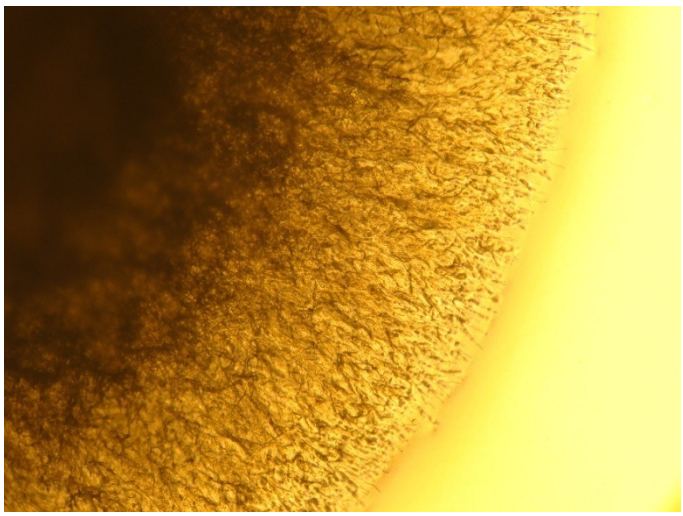
تصویر۹: مقایسه رشد کلنی قارچ در محیط کشتهای حاوی ۳۰۰- ٤۰۰ – ۵۰۰ ppm اسانس مرزه پس از گذشت ۸ روز

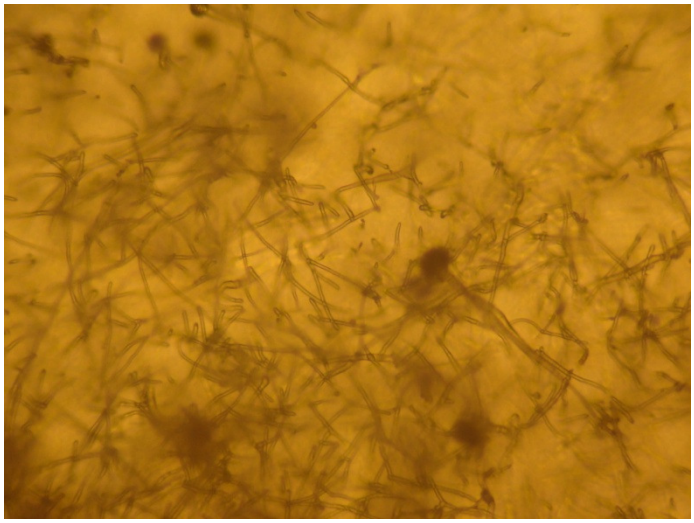


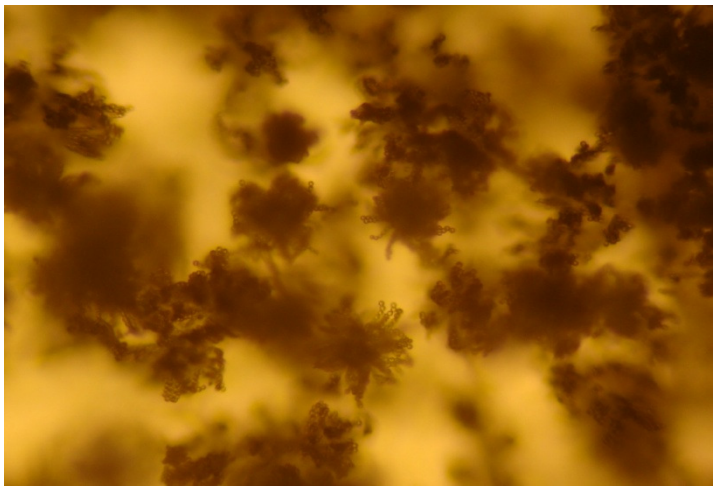
تصویر۱۰: تصویر میکروسکوپی رشد کلنی قارچ آسپرژیلوس فلاووس

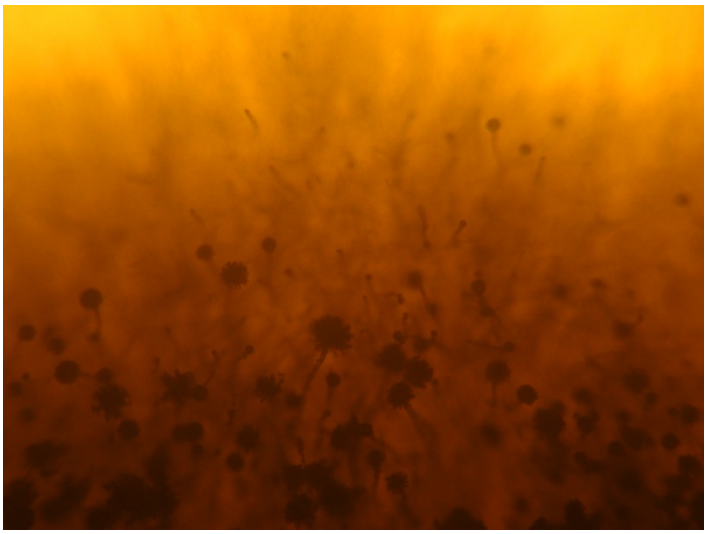
تصویر ۱۱: تصاویر میکروسکوپی از قارچ آسپرژیلوس فلاووس

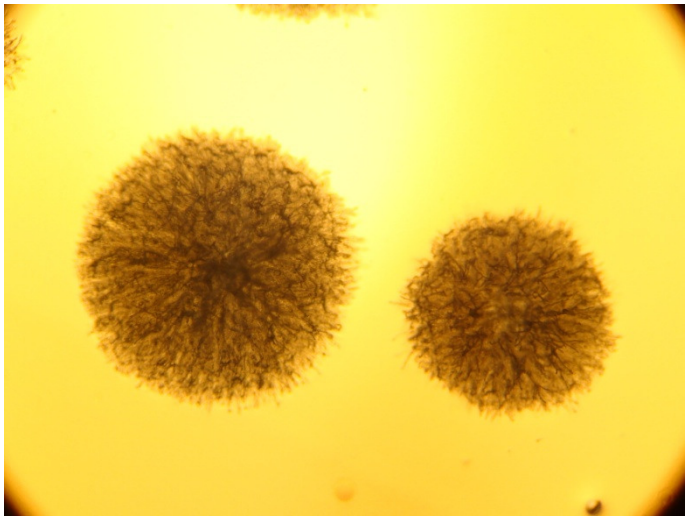


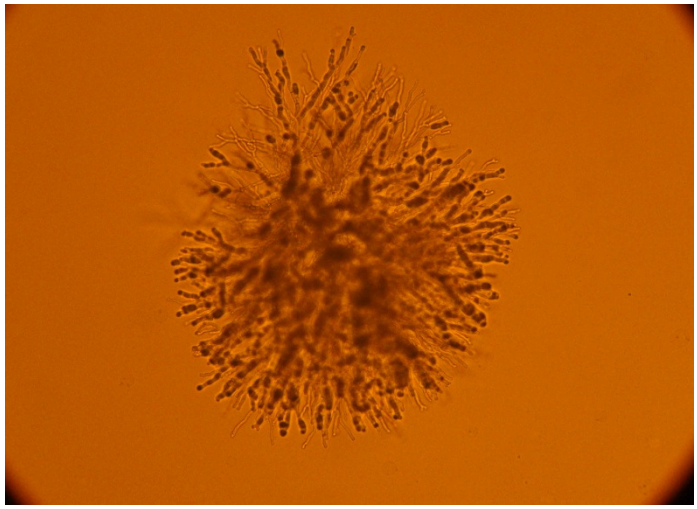


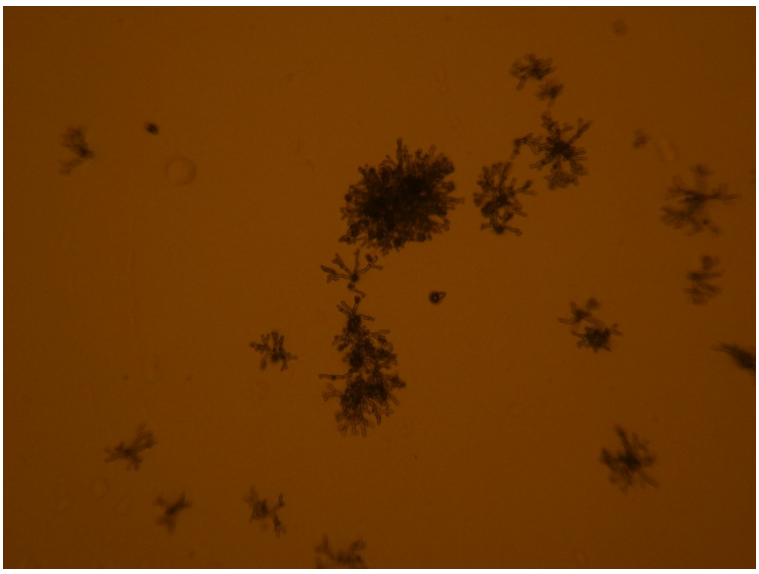


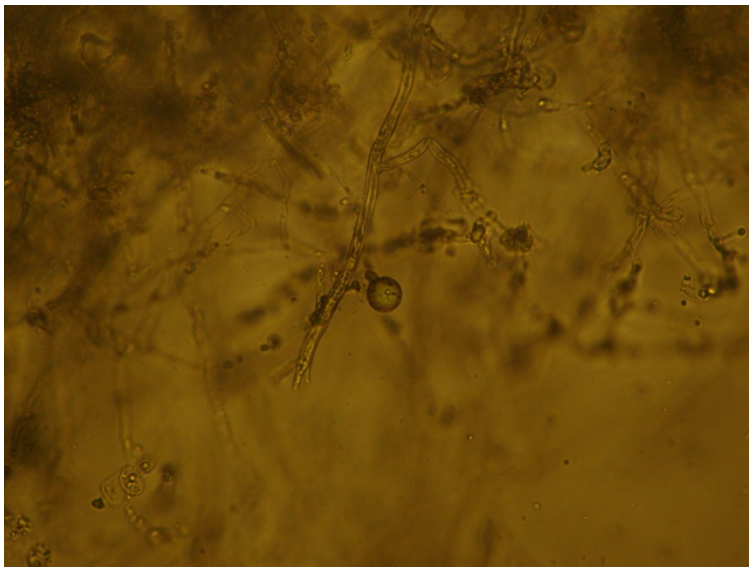












ABSTRACT

In a preliminary study, the antifungal properties of essential oil of *Satureja hortensis* at different tenderness were tested on potato – dextrose agar (PDA). The fungus *Aspergillus flavus PTCC 5006* was isolated from pistachio nut obtained from Rafsanjan area, Iran. Among the essential oil compounds, 500 ppm concentration was completely inhibited *Aspergillus flavus* growth. After determination of the most effective concentration, it was added to fish feeds compound which inhibited fungal growth and production of aflatoxin. Its concentration was determined as 500 ppm and over of essential oil of *Satureja hortensis*. The essential oil of *Satureja hortensis* was analyzed by means of GC-MS and their effective factors were evaluated for fish feeds and their results are shown in tables.

key word : antifungal properties - *Satureja hortensis*- *Aspergillus flavus*- fish feeds

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Natural Resource & Agriculture Research Center of Kerman province

---

Title : Effect of *Satureja hortensis* extracted oil on *Aspergillus flavus*in fish feed
Apprpved Number: 4-45-12-88026
Author: Laleh Yazdanpanah goharrizi
Executor *:* Laleh Yazdanpanah goharrizi
Collaborator *:* M.Sharifrohani, I.Sharifpour ,A.Sepahdari; D. Darvishi; A. Vali; M. Kodoori; N. Nakhai
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Kerman province
Date of Beginning :2010
Period of execution : *8 Months*
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : ***20***
Date of publishing : 2012
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Natural Resource & Agriculture

Research Center of Kerman province

Title:

Effect of *Satureja hortensis* extracted oil on *Aspergillus flavus* in fish feed

Executor :

Laleh Yazdanpanah goharrizi

Registration Number

40270