اثر عصاره برگی آلوئه ورا بر رشد، تولید آفلاتوکسین B1 و الگوی پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط آزمایشگاهی

آرش بابایی[1*]، میلاد منافی[2] و حدیث طوافی[1]

[1] ملایر، دانشگاه ملایر، گروه میکروبیولوژی

[2] ملایر، دانشگاه ملایر، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۸

چکیده

آسپرژیلوس فلاووس از جمله قارچهایی است که آلودگی وسیعی بر روی مواد غذایی ایجاد می کند. در این مطالعه، فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف گیاه آلوئه ورا بر رشد و میزان آفلاتوکسین تولیدی *آسپرژیلوس فلاووس* و همچنین تأثیر این عصاره ها بر الگوی پروتئینهای خارج سلولی این قارچ مورد بررسی قرار گرفت. حلال مختلف استن، اتانول، آب، متانول، کلروفرم و اتیل اتر برای استخراج عصاره از برگهای گیاه آلوئه ورا استفاده گردید. فعالیت ضد قارچی عصاره ها به روش Agar Plate Diffusion Plate انجام گرفت. هر کدام از عصاره ها در غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، آزمایش شدند. بعد از بررسی، از عصاره استنی آلوئه ورا، به منظور ارزیابی و تأثیر عصاره بر میزان تولید آفلاتوکسین B1 و الگوی پروتئینهای خارج سلولی تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب HPLC و SDS-PAGE انجام گرفت. بیشترین فعالیت ضد قارچی در عصاره استن در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر، دیده شد. با توجه به نتایج HPLC میزان مهار تولید آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر، ۴۰/۹۴ درصد و در غلظت ۲ میکرو لیتر،۱۸/۱۴ درصد گزارش شد. نتایج SDS-PAGE نشان داد که با کاهش رشد قارچی، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته است. از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که، عصاره استنی آلوئه ورا می تواند به عنوان عامل ضد قارچی مؤثر تری بر مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* نسبت به حلالهای دیگر باشد.

واژه های کلیدی: آلوئه ورا، *آسپرژیلوس فلاووس* ، فعالیت ضد قارچی، آفلاتوکسین B1 ، HPLC، SDS-PAGE

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۵۱۲۶۲۲ ، پست الکترونیکی: a.babaei@sheffield.ac.uk

مقدمه

از جمله استراتژیهای درمانی که از دیرباز مورد توجه انسان بوده است، استفاده از گیاهان دارویی می باشد. گیاهان دارویی منبع غنی از عوامل ضد میکروبی هستند که این عوامل، جزء متابولیتهای ثانویه گیاهان هستند (۱۳ و ۱۶). از جمله این گیاهان دارویی می توان به آلوئه ورا اشاره کرد. آلوئه ورا گیاهی سبز رنگ و دارای برگهای سخت می باشد که حاشیه و وسط برگها را ژلی شفاف با ویسکوزیته بالا پر کرده است. آلوئه ورا شامل ترکیبات متنوعی از جمله، ترکیبات فنولی، ساپونین ها و آنتروکوئینون ها می باشد. این ترکیبات، دارای فعالیتهای ضد باکتریایی، ویروسی و قارچی می باشند (۲۲). قارچها از جمله میکروارگانیسم های دخیل در فساد مواد غذایی (به خصوص مواد غذایی انباری) هستند و باعث کاهش ارزش مواد غذایی می شوند. از جمله قارچهایی که به صورت غالب بر روی محصولات انباری رشد می کنند، گونه های آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سلیوم ها

هستند(۲۶). *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* از جمله قارچهای رشته ای هستند که دارای توزیع جهانیند و بر روی انواع کثیری از مواد آلی فاسد شدنی یافت می شوند (۲۳). این قارچها، متابولیت ثانویه سمی و کارسینوژنی به نام آفلاتوکسین تولید می کنند که برای سلامتی انسان و حیوان مضراست (۸)، بنابراین، این نگرانی سبب شده است که محدودیتهای تنظیمی بر روی رشد این قارچها و به مراتب بر تولید آفلاتوکسین توسط آنها اتخاذ شود(۷ و ۱۷). مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین ها باعث بیماریهای حاد و یا مزمن مانند سرطان کبد و اگر در مقادیر بسیار مصرف شوند، منجر به مرگ می شوند (۲۰). از جمله راههای مؤثر برای کنترل مشکلات ناشی از آفلاتوکسین ها، جلوگیری از رشد قارچها بر روی سوبسترا ها می باشد (۱۵). در طی تحقیقات مختلف گزارش شده است که عصاره ها و پودرهای انواع مختلف گیاهان دارویی و روغنهای استخراج شده از آنها، دارای فعالیت ضد قارچی هستند و همچنین تعدادی از آنها حتی تشکیل و تولید آفلاتوکسین را نیز مهار می کنند (۳، ۱۱ و ۲۴). Casion و همکارانش در سال ۲۰۰۷ ، اثرات مهاری برجسته ای از عصاره های هیدرو الکلیک برگهای تازه آلوئه ورا بر رشد میسلیوم های *هتروسپوریوم پرونتی، بوتریتیس گلادیولروم، فوزاریوم اکسیزپوریوم و پنی سیلیوم گلادیولی مشاهده* کردند (۴). گیاهان دارویی متنوعی مانند *آرکا کاتکو، پیپر بتل، سنتلا آسیتیکا، کاسیا باکریانا، سیرتوروس رتیکولیت و مومورديکا کارانتیا* به منظور کنترل رشد *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار داده شدند و نتایج نشان داد که عصاره های خام آتانولیکی برخی از گیاهان دارویی رشد قارچی را مهار می کنند (۲۵). Masood وRanjan نیز دریافتند که عصاره های *آرگمون مکزیکی و سیپروس روتوندوس*، تولید آفلاتوکسین را به واسطه مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مهار کرد و نتایج نشان دادند که مهار تولید و تشکیل آفلاتوکسین در نتیجه مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بوده است (۱۴). روشهای آنالیز آفلاتوکسین ها بر پایه ۳ روش TLC، HPLC و ELISA می باشند (۲۷ و ۲۸). در میان این سه روش، HPLC روشی است که از نظر دقت و تعیین کمی میزان سم تولیدی، از حساسیت بیشتری برخوردار است. HPLC روشی شیمیایی است که قادر است میزان ترکیبات شیمیایی درون مخلوطی از مواد شیمیایی را آنالیز و تعیین مقدار کند. این روش، دارای دقت بالا می باشد و در تشخیص روشی سریع است (۱۲). الایزا نیز روشی است که اخیراً برای تعیین مقدار آفلاتوکسین در مواد غذایی از آن استفاده می شود. اما این روش به دلیل ارائه نتایج کاذب بایستی با روشهای دیگر نیز جهت تأیید نتیجه، همرا گردد (۱۹).

در این مطالعه، گیاه آلوئه ورا با حلالهای آلی استن، اتانول، متانول، کلروفرم، اتیل اتر و آب، عصاره گیری شد و اثر هریک از استخراجها بر ممانعت از رشد شعاعی *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تأثیر عصاره آلوئه ورا بر میزان تولید آفلاتوکسن B1 و الگوی پروتئینی خارج سلولی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب به وسیله روشهای HPLC و SDS-PAGE نیز بررسی شد.

مواد و روشها

آماده سازی اولیه مواد گیاهی: بعد از جمع آوری برگهای تازه گیاه آلوئه و شستشو آنها توسط آب مقطر، به منظور ضد عفونی کردن آنها از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد. سپس به قطعات کوچکی خرد شدند. قطعات ریز شده برگها در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز قرار داده شدند تا به طور کامل خشک شوند. بعد از خشک شدن کامل، برگها توسط دستگاه خردکن الکتریکی پودر شدند.

آماده سازی عصاره ها: ۳۰ گرم از مواد گیاهی پودر شده را با ۱۰۰ میلی لیتر از حلالهای مختلف (استن، اتانول،آب،

متانول، کلروفرم و اتیل اتر) مخلوط کرده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس محتویات گیاهی مربوط به هر حلالی از کاغذ واتمن شماره ۱ گذرانده شدند و مواد فیلتر شده توسط حمام بخار آب در دمای ۷۰ –۶۰ درجه سانتی گراد تبخیر شدند تا خشک گردند. عصاره های خشک شده، پودر شدند و در مقادیر کمی از حجمهای مساوی از حلالهای مربوطه و آب مقطر استریل (۵۰ به ۵۰) دوباره حل گردیدند و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا مورد مطالعه قرار گیرند (۵ و ۱۸).

استرین قارچی: در این مطالعه، قارچ *ATCC 5004 Aspergillus flavus* از بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. قارچها بر روی محیط کشت شیب دار PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شده بودند. از قارچهای کشت داده شده در آزمایشگاه به عنوان ذخیره قارچی استفاده گردید و بر روی محیط PDA به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پلیتها بعد از ۷روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مطالعه بیشتر نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های استخراج شده به روش Agar Plate Diffusion: به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های استخراج شده توسط حلالهای مختلف از روش Agar Plate Diffusionاستفاده گردید. بدین منظور غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۲۰ میلی لیتر، از عصاره ها به محیط کشت PDA مذاب که حرارت آن در داخل پلیتها به ۷۰ –۶۰ درجه سانتی گراد رسیده بود، اضافه گردید و سپس مخلوط شدند. بعد از جامد شدن محیط کشتها، پلاکهایی از قارچهای کشت داده شده (در حدود ابعاد ۰/۴ میلی متر) را از سویه های استاندارد در مرکز هر پلیت مربوط به غلظتهای مختلف عصاره ها، به صورت نقطه ای قرار داده شد و کشتها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرمادهی شدند. برای هر یک از تیمار ها، ۳ تکرار گذاشته شد. در پایان روز هفتم، میزان رشد شعاعی قارچها بر حسب سانتیمتر گزارش گردید و از نظر آماری، داده ها در هر تیمار مورد آنالیز قرار گرفت. میزان مهار رشد قارچی با توجه به فرمول مورد تحلیل قرار گرفت (۱۰).

قطر کلنی کنترل/ قطر کلنی تیمار شده – قطر کلنی کنترل= ۱۰۰× درصد مهار رشد میسیلیوم

بررسی میزان تولیدآفلاتوکسین B1: با توجه به اینکه عصاره استنی ماکزیمم تأثیر را بر ممانعت از رشد قارچ نشان داده بود، از این عصاره به عنوان عصاره کاربردی برای بررسی میزان تولید آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ارزیابی و تعیین مقدار آفلاتوکسین B1، HPLC انجام گرفت. در ابتدا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت YESB (Yeast Extract Sucrose Broth) که در ارلنهای جدا تحت تأثیر غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی لیتر از عصاره آلوئه ورا قرار داشتند، تلقیح شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز گرمادهی گردیدند. از هر کدام از غلظتها، ۳ تکرار تهیه شد. بعد از ۷ روز میسیلیوم های رشد کرده بر سطح محیط کشت خارج شدند و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و به منظور شاخص رشد قارچی، بعد از خشک شدن، وزن شدند. محیط کشت بعد از گذراندن از پارچه کتانی، از کاغذ واتمن شماره ۱ نیز عبور داده شد و برای آنالیز به وسیله HPLC به آزمایشگاه مرجع فرستاده شد و بعد از پاکسازی نمونه ها به روش KHA- S001 مطابق با رفرنس موجود در استاندارد ملی ۶۸۷۲ مورد آنالیز قرار گرفتند.

بررسی الگوی پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس فلاووس* : جهت بررسی الگوی پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس فلاووس* ، از سویه استاندارد کشت داده شده بر روی محیط PDA استفاده گردید. اسپور ها از سطح پتری دیش قارچ توسط مخلوطی از آب و تریتون X به وسیله لوپ به طور کامل شستشو داده شد و از سوسپانسیون به دست آمده، ۱ میلی لیتر (10^5 اسپور ml^{-1}) در محیط کشت PDB تلقیح شدند و در شرایط استریل غلظتهای مختلف ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر از عصاره استنی به محیط کشتها اضافه گردید و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکر دار قرار داده شدند. این نمونه ها نیز در ۳ تکرار تست شدند. بعد از پایان ۱۰-۷ روز در شرایط استریل، قطعات بزرگ میسیلیوم قارچ، ابتدا توسط پارچه کتانی جدا و سپس مابقی محیط کشت قارچی به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند مایع رویی جمع آوری شدند و برای آنالیز توسط SDS-PAGE در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

الکتروفورز با ژل SDS: به منظور آنالیز پروتئینهای به دست آمده، نمونه ها به وسیله SDS- PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی از ژل جدا کننده ۱۲ درصد و ژل فشرده کننده ۴ درصد طبق روش Laemmli (Laemmli, 1970) استفاده گردید. ۲۰ میلی لیتر از نمونه و ۱۰ میکرولیتر از بافر 2x SDS gel loading در لوله تیوب ریخته و مخلوط گردید و سپس به مدت ۷ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و ۳۰ میکرولیتر از نمونه ها در ژل ریخته شد. در میان نمونه ها، نشانگر استاندارد نیز الکتروفورز گردید، که دارای قطعات پروتئینی در اندازه های ۲۰ تا ۱۲۰ کیلو دالتون بود. رنگ آمیزی ژل نیز توسط محلول آبی کوماسی G-250 انجام گرفت.

آنالیز آماری: نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS وآزمون مربع کای آنالیز گردید و سطح معنی دار ۵ درصد ($P<0.05$) و درجه اطمینان ۹۵ درصد انتخاب گردید

نتایج

فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف آلوئه ورا بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس*: دراین مطالعه فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف آلوئه ورا، بر رشد شعاعی قارچهای *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۲۰میلی لیتر به روش Agar Plate Diffusion مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تحلیل آماری، اختلاف آماری بین نتایج به دست آمده p value < 0.05 به طور معنی داری کاهش رشد در قارچهای مذکور را نشان می دهد. طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، فعالیت ضد قارچی آلوئه ورا در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر از عصاره استنی، اثر مهاری ۱۰۰ درصد را بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* داشته است و کمترین اثر مهاری در غلظت ۲ میکرولیتر از عصاره متانولی به میزان ۶/۲۵ درصد گزارش شد. (جدول ۱)

نتایج به طور معنی داری نشان می دهد که عصاره استخراج شده از استن در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر، ۱۰۰ درصد رشد *آسپرژیلوس فلاووس* را مهار نمود و در کمترین غلظت استفاده شده از این عصاره (۲ میکرو لیتر) مهار رشد ۵۱/۷۲ درصد گزارش شد. عصاره های استخراج شده آلوئه ورا توسط حلالهای اتانول، اتیل اتر، آب، کلروفرم و متانول نشان داد که بالاترین غلطت که ۲۰۰۰(میکرولیتر) می باشد به ترتیب۷۶/۷۲ ، ۶۱/۵۳ ، ۵۸/۳ ، ۴۸ و ۳۷/۵ درصد ممانعت رشد را باعث گردید ودر این عصاره های استخراجی توسط حلالهای دکر شده کمترین غلظت (۲میکرولیتر) به ترتیب ۳۵/۳۴ ، ۳۳/۸۴ ، ۲۸/۳۳ ، ۲۰ و ۶/۲۵ درصد ممانعت رشد را سبب شد. در صورتی که بیشترین و معنی دارترین مهار رشدی در غلظتهای مختلف عصاره استنی عصاره های دیگر دیده شد (طبق جدول ۱).

جدول ۱- تأثیر عصاره های آلوئه ورا بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز

عصاره ها	غلظتها µl/20ml	میانگین ابعاد میسیلیوم cm	میزان مهار رشد بر حسب ٪
عصاره استنی	۰	۵/۸	۰
	۲	۲/۸	۵۱/۷۲
	۲۰	۲/۳	۶۰/۳۴
	۲۰۰	۱/۶	۷۲/۴
	۲۰۰۰	۰	۱۰۰
عصاره اتانولی	۰	۵/۸	۰
	۲	۳/۷۵	۳۵/۳۴
	۲۰	۳/۲۵	۴۴
	۲۰۰	۲/۲۵	۶۱/۲
	۲۰۰۰	۱/۳۵	۷۶/۷۲
عصاره متانولی	۰	۴	۰
	۲	۳/۷۵	۶/۲۵
	۲۰	۳/۲۵	۱۸/۷۵
	۲۰۰	۲/۷۵	۳۱/۲۵
	۲۰۰۰	۲/۵	۳۷/۵
عصاره اتیل اتری	۰	۶/۵	۰
	۲	۴/۳	۳۳/۸۴
	۲۰	۴/۲۵	۳۴/۶۱
	۲۰۰	۴	۳۸/۴۶
	۲۰۰۰	۲/۵	۶۱/۵۳
عصاره کلروفرمی	۰	۶/۲۵	۰
	۲	۵	۲۰
	۲۰	۴	۳۶
	۲۰۰	۳/۷۵	۴۰
	۲۰۰۰	۳/۲۵	۴۸
عصاره آبی	۰	۶	۰
	۲	۴/۳	۲۸/۳۳
	۲۰	۳/۷۵	۳۷/۵
	۲۰۰	۳/۲۵	۴۵/۸
	۲۰۰۰	۲/۵	۵۸/۳

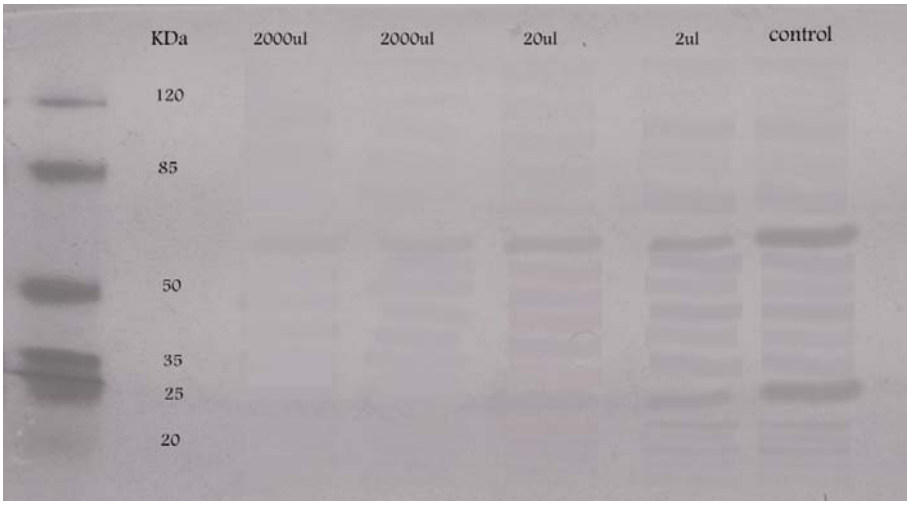
اثر عصاره استنی آلوئه ورا بر تولید آفلاتوکسین B1 به وسیله *A. flavus* : همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، عصاره آلوئه ورا بر کاهش تولید آفلاتوکسین B1 توسط قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تأثیر داشته است. با توجه به نتایج HPLC، در نمونه کنترل (بدون تأثیر عصاره) میزان آفلاتوکسین تولیدی، ۷۷/۲ نانوگرم / گرم یافت شد و میزان مهار تولید آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی لیتر ، ۴۰/۹۴ درصد و در کمترین غلظت از عصاره (۲ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی لیتر) ۱۸/۱۴ درصد گزارش شد و در غلظتهای ۲۰ و ۲۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰

میلی لیتر از عصاره، میزان آفلاتوکسین تولید شده به ترتیب ۵۹/۸ و ۵۲/۶ نانوگرم / گرم گزارش شد. وزن خشک میسیلیوم های ایجاد شده توسط قارچ (به عنوان معیار میزان رشد قارچ) در محیط YES در غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر به ترتیب: ۳/۵۸، ۳/۰۲، ۲/۸۶، ۲/۴۳ و ۱/۹۳ گرم بود.

جدول ۲- ارزیابی عصاره استنی آلوئه ورا بر بیوماس میسیلیومی (g) و میزان تولید آفلاتوکسین از *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط YES

میزان مهار تولید آفلاتوکسین ٪	آفلاتوکسین B1 ng/g	وزن خشک میسیلیوم (g)	غلظتها µl/50ml
۰	۷۷/۲	۳/۵۸	۰
۱۸/۱۴	۶۳/۲	۳/۰۲	۲
۲۲/۵۴	۵۹/۸	۲/۸۶	۲۰
۳۱/۸۷	۵۲/۶	۲/۴۳	۲۰۰
۴۰/۹۴	۴۵/۶	۱/۹۳	۲۰۰۰

اثر عصاره استنی آلوئه ورا بر الگوی پروتئینهای خارج سلولی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*: با توجه به انحلال برخی از ترکیبات فعال گیاه آلوئه ورا در حلالهای مختلف، اثرات قابل توجه ای بر تولید و سنتز برخی از متابولیتها و ترکیبات سلولی می تواند داشته باشد. برخی از ترکیبات عصاره آلوئه ورا مانند آنزیمهای مختلف از جمله آلیاز، آلکالین فسفاتاز ها، آمیلاز ها، کربوکسی پپتیداز ها، کاتالاز، سلولاز، لیپاز، پراکسیداز می تواند بر تولید پروتئینهای حاصله از قارچ، در طی مسیر بیوسنتز آنها تأثیر گذار باشد. الگو تولید پروتئینهای خارج سلولی قارچ در غلظتهای مختلف ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر در محیط کشتPDB تلقیح شده با *آسپرژیلوس فلاووس* به وسیله روش SDS-PAGE مورد آنالیز قرار گرفت. بعد از گرمادهی به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و جداسازی میسیلیوم ها و آماده سازی نمونه ها، SDS-PAGE انجام گرفت (شکل ۱). در این آنالیز، ۲۴ باند پروتئینی دیده شد که وزن مولکولی آنها بین ۱۰ تا ۱۴۰ کیلو دالتون بود. این نتایج نشان دادند که در نتیجه کاهش رشد میسیلیوم قارچی، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته است.



شکل ۱- الگوی پروتئینهای خارج سلولی قارچ در غلظتهای مختلف استون ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر در محیط کشت PDB تلقیح شده با *آسپرژیلوس فلاووس* به وسیله روش SDS-PAGE

نتیجه و بحث

با توجه به رشد سریع قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی محصولات غذایی و خسارتهایی که در زمینه صنایع غذایی، سلامتی و اقتصادی ایجاد کند، بنابراین مهار رشد این قارچ می تواند کمک شایانی به جامعه سلامتی انسانی و حیوانی کند. نتایج حاصله از این مطالعه می تواند اطلاعات پایه ای در زمینه کارآیی و اثر بخشی عصاره های مختلف گیاه آلوئه ورا به منظور کاهش رشد این قارچها و فعالیت ضد قارچی و ضد سمی این گیاه در اختیار قرار دهد. مطالعاتی در زمینه فعالیت ضد قارچی آلوئه ورا توسط محققین انجام گرفته است. در سال ۲۰۰۷، Cooposamy و Magwa ثابت کردند که عصاره آلوئه ورا، اثر ضد قارچی بر روی *کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، تریکوفیتون منتاگروفیتس، تریکوفیتون روبروم، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس گلاوکوس* داشته است (۶). طبق مشاهدات و نتایج به دست آمده توسط Arunkumar و Muthuselvam در سال ۲۰۰۹، بالاترین فعالیت ضد قارچی گیاه آلوئه ورا در عصاره استنی آن بر روی رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* گزارش داده اند(۱)، که این نتایج موافق با نتایجی که در این مطالعه به دست آمده، است. Sitra و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثر قارچی ژل آلوئه ورا را بر روی رشد ۵ قارچ پاتوژن گیاهی مورد بررسی قرار دادند و گزارش دادند در غلظت ۰/۳۵ درصد از ژل آلوئه ورا رشد دو قارچ *Drechslera hawaiensis* و *Penicillium digitatum* به طور کامل مهار شدگی دیده شد و در غلظتهای ۰/۱۵ ، ۰/۲۵ و ۰/۳۵ درصد از ژل آلوئه ورا به طور معنی داری کاهش رشد در قارچهای *A. niger*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *Alternaria alternata* را گزارش کردند (۲۱). Casian و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ دریافتند که عصاره های هیدرو الکلیک از برگهای گیاه آلوئه ورا، اثر مهاری بر رشد میسیلیوم های *هتروسپوریوم پرونتی، بوتریتیس گلادیولروم، فوزاریوم اکسیزپوریوم و پنی سیلیوم گلادیولی* داشته است (۴). Jasso و همکارانش نیز اثر عصاره این گیاه را در زمینه فعالیت ضد قارچی ارزیابی کردند و آنها نیز گزارش کردند که عصاره آلوئه ورا رشد میسیلیوم ها را در قارچهای *فوزاریوم اکسیزپوریوم، ریزوکتوما سولانی و کولکتوتریکوم کوکودس* ممانعت کرده است وکاهش معنی داری در غلظت 10^5میکرو لیتر بر لیتر مشاهده کردند (۱۰).

مطالعات فراوانی نیز در جهت یافتن روشهای مناسب برای کنترل آلودگی قارچها از مواد غذایی، صورت گرفته است. در مطالعه ای که توسط Horn و همکارانش در سال ۱۹۸۳انجام دادند، اثر *آسپرژیلوس نایجر* ، به عنوان یک مداخله کننده با عملکرد تولید آفلاتوکسین توسط *آسپرژیلوس فلاووس*، بررسی شد و آنها نتیجه گرفتند که ذرتهایی که با *آسپرژیلوس نایجر* نیز آلوده شده بودند، آفلاتوکسین از آنها جدا نشد. این گروه غلظت آفلاتوکسین را با کمک روش TLC آنالیز کردند و در تیمار های مختلف، دریافتند که pH پایین ۳-۲/۸ تولید آفلاتوکسین را به طور کامل متوقف می کند (۹).

Christiane و همکارانش در سال ۲۰۱۰، اثر روغن نیم را به صورت *in vitro* بر رشد، مورفولوژی و تولید آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کردند. در غلظتهای ۰/۵ تا ۴ درصد از روغن تقریباً ۹۵ درصد تولید آفلاتوکسین مهار شده بود و اما رشد قارچ را کاهش نداده بود (۵).

Priyanka و همکارانش در سال ۲۰۱۰، نیز اثر دو روغن *سیتروس رتیکولیت و سیمبوپوگن سیتراته* را بر روی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کردند. این تیمارها به طور کامل رشد قارچ را در ۷۵۰ ppm مهار کرده بودند و دو روغن به طور کامل تولید توکسین را در غلظتهای ۷۵۰ ppm و ۵۰۰ ppm مهار کرده بودند (۱۸).

برخی از ترکیبات عصاره آلوئه ورا مانند آنزیمهای مختلف از جمله آلیاز، آلکالین فسفاتاز ها، آمیلاز ها، کربوکسی

پپتیداز ها، کاتالاز، سلولاز، لیپاز، پراکسیداز و ... می تواند بر تولید پروتئینهای حاصله از قارچ، در طی مسیر بیوسنتز آنها تأثیر گذار باشد. در این مطالعه، اثر عصاره آلوئه ورا بر تولید پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس فلاووس* نیز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر، پروفایل تولید پروتئینهای خارج سلولی قارچ در غلظتهای مختلف ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر در محیط کشت به وسیله SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که در نتیجه کاهش رشد میسیلیوم قارچی، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته است. در مطالعه ای که Basaran در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر پرتوUV-C بر الگوی پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* داشت، با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، نتیجه گرفت که تولید ۱۲ پروتئین تولید شده توسط این قارچ با اثر پرتوی UV-C کاهش یافته بودند (۲). در این مطالعه نیز ۲۴ باند پروتئینی مشاهده شد که در نتیجه کاهش رشد میسیلیوم قارچی با اثر عصاره گیاه آوئه ورا، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته بود.

در این مطالعه آنالیز داده ها نشان می دهد که در روش Agar Plate Diffusion Plate اثر ضد قارچی عصاره های مختلف آلوئه ورا بر رشد قارچ مورد مطالعه اختلاف معنی داری را در همه غلظتهای تست شده دارد($p$valu<0.05). در این مطالعه در میان عصاره های مورد بررسی شده، عصاره استنی بیشترین فعالیت ضد قارچی خود را در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر روی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داده است (جدول ۱). بنابراین به نظر می رسدکه عصاره آلوئه ورا استخراج شده توسط حلال استن می تواند به عنوان عامل ضد قارچی مؤثرتری نسبت به حلالهای دیگر در نظر گرفته شود. همچنین در این مطالعه نتیجه گرفته شد که با کاهش رشد میسیلیوم قارچی، میزان تولید پروتئینهای خارج سلولی و میزان تولید آفلاتوکسین B1 نیز کاهش یافته است. اگر چه جلوگیری از رشد قارچ، از بهترین عملکرد ها برای جلوگیری از آلودگی به وسیله آفلاتوکسین در مواد غذایی است، اما معیار های دیگر نیز ضروری هستند. بنابراین می توان مزیت استفاده از ترکیبات تولید شده گیاهی را به عنوان منبعی بی خطر و ماده کنترلی مؤثرتری نسبت به عوامل ضد میکروبی ساختگی در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین شرکت خدماتی، آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم به خاطر همکاری با گروه، در خصوص آنالیز آفلاتوکسین در نمونه ها، تشکر و قدردانی به عمل می آید. همچنین از جناب آقای دکتر رزاقی (انستیتو پاستور ایران- بخش قارچ شناسی) که در تهیه سویه استاندارد آسپرژیلوس فلاووس با این گروه همکاری داشتند نیز تشکر می گردد.

منابع

1- Arunkumar S, Muthuselvam M. 2009. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (5): 572- 576.

2- Basaran. P. 2009. Reduction of Aspergillus parasiticus on hazelnut surface by UV-C Treatment, *International Journal of Food Science and Technology*. 44 (9): 1857–1863.

3- Bullerman LB, Lieu Y, Sieier SA. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by Cinnamon and Clove oils,Cinnamic aldehyde and eugenol, *J. food SCi*, 42(4): 1107-1109.

4- Casian OR, Parvu M, Vlase L, Tamas M. 2007. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia*.78 (3): 219-222.

5- Christiane L. da Costa, Marcia R. F. Geraldo, Carla C. Arrotéia, Carlos Kemmelmeie. 2010. In vitro activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and Aflatoxins B1and B2 production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 1(1): 292- 299.

6- Coopoosamy RM, Magwa ML. 2007. Traditional use, antibacterial activity and antifungal activity of crude extract of *Aloe excelsa*. *African Journal of Biotechnology*. 6(20): 2406-2410.

7- Ehrlich KC, Kobbeman K, Montalbano BG, Cotty PJ. 2007. Aflatoxin- producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*. 114(2): 153–159.

8- Hesseltine CW. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycologia*, 57(2): 149-197

9- Horn B W, Wicklow DT. 1983. Factor influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Canadian. Journal of Microbiology*. 29(9): 1087- 1091.

10- Jasso de Rodriguez D, Hernandez-Castillo, R. Rodriguez-Gracia, J. L. Angulo-Sanchez. 2005. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenicfungi. *Industrial Crops and Products*. 21(1): 81-87.

11- Krishnamurthy Y L, Shashikala J. 2006. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* isolated from soybean seeds by certain natural plants products. *Letters in Applied Microbiology*.43(5): 469-474.

12- Lee LS, Wah JH, Cotty PJ, Bayman P. 1990. Integration of enzyme- linked immunosorbent assay with conventional chromatographic procedures for quantitation of aflatoxin in individual cotton bolls, seeds and seed sections. *Anal, Chem J*, 73(4): 581-584

13- Mahesh B, Satish S. 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World J. Agri. Sci* . 4(S): 839- 843.

14- Masood A, Ranjan K S. 1991. The effect of aqueous plant extracts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letter in Applied Microbiology*. 13(1): 32- 34.

15- Moreno-Martinez E, Vazquez-Badillo M, Facio-Parra F., 2000. Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stored grains of maize. *Agrociencia.* 34(4): 477-484.

16- Muhammad BI. 1997. Anti-microbialeffects of extract leaf, stem and root bark of *Anogeissus leiocarpus* on *Staphylococcus aureaus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris*, *J. Pharma. Devpt*. 2(S), 20-30.

17- Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C., 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia*162 (3): 179–189.

18- Priyanka S, Ashok Kumar, Shubhra Singh, Ravindra Shukla, Bhanu Prakash, Nawal Kishore Dubey. 2010. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production on *Asparagus racemosus*.. *Mycopathologia*. 170(3):195–202.

19- Sabino M, Milanez T V, Lamardo L C. A, Navas S A, Stofer M, Gracia C B. 1997. Evaluation of the efficiency of two immunoassay kits for detection of aflatoxin B1in corn, fish feed, peanuts and its products, *Cienciae Tecnologia de Alimentos*,; 17(2): 107-110

20- Sergent T, Ribonnet L, Kolosova A. 2008. Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. *Food and Chemical toxicology*. 46(3): 813–841.

21- Sitara U, Hassan N, Naseem J. 2011. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. *Pak. J. Bot*. 43(4): 2231-2233

22- Surjushe A, Vasani R, Saple D G. 2008. *Aloe vera*: a short review. *Indian J Dermatol*; 53 (4): 163-6.

23- Thanaboripat D. 2011. Control of Aflatoxins in Agricultural Products using Plant Extracts. *KMITL Sci. Tech. J*. 11(1): 35- 42

24- Thanaboripat D, Mongkontanawut N, Suvathi Y, Ruangrattametee V. 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Science Journal*, 4(1):1-8.

25- Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohas Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O., Chareonsettasilp, S. 2007.Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 6(1), 18-24.

26- Thiruppathi S. Ramasubramanian V. Sivakumar T. Thirumalai Arasu V. 2010. Antimicrobial activity of *Aloe vera* (L.) Burm. f. against pathogenic microorganisms. *J. Biosci. Res.* 1(4): 251- 258.

27- Whitaker T, Horwitz W, Albert R, Neshim S. 1996. Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. *AOAC,Int. Mar*. 79 (2): 476- 485.

28: Zhonghua Pan, Yan Fang XU. 1995. Improvement of analyzing methods of aflatoxin. *Agro-environ, Develop*; 12(2): 30- 34.

Effect of the Leaf Extract of *Aloe vera* on Growth, Production of Alatoxin B1 and profile of Extracellular Proteins of *Aspergillus flavus* in vitro

Babaei A.[1], Manafi M.[2] and Tavafi H.[1]

[1] **Microbiology Dept., Malayer University, Malayer, Iran**

[2] **Animal Science Dept., Malayer University, Malayer, Iran**

Abstract

Aspergillus flavus is the fungi that caused massive contamination on feed. In this study antifungal activity of different extracts of Aloe Vera plant on the growth, aflatoxin production and extract effects on profile of extracellular proteins of Aspergillus flavus were study. This research conducted on *Aloe vera* utilizing sex solvent including acetone, ethanol, water, methanol, chloroform and ethyl ether for extraction from *Aloe Vera* fresh leaves. Antifungal activity of the extracts was evaluated by Agar Plate Diffusion Plate method. Each of extract in different concentrations of 0, 2, 20, 200 and 2000µL in 20mL was tested. HPLC and SDS-PAGE techniques in order of evaluation of acetone extract of *Aloe Vera,* and its extract effect on the production of aflatoxin B_1 and extracellular protein patterns produced by *A. flavus* were used respectively. The maximum antifungal activity was observed in acetone extract, in concentration of 2000µL. Results obtained from HPLC analysis revealed the inhibition of aflatoxin production in 2000µL and 2µL was 40.94% and 18.14% respectively. The SDS-PAGE results showed, with decrease in fungal mycelium growth, the proteins production rate was also decreased. Generally result showed that the acetone extract of *Aloe Vera* can be used as a more effective antifungal agent to inhibit the growth of *A. flavus* compared to other solvents.

Key words: *Aloe Vera*, *Aspergillus flavus*, Antifungal activity, Aflatoxin B1, HPLC and SDS-PAGE.