فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۱، پیاپی ۷۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۲۷-۷
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.1, Sering.71, Spring 2022, p. 7-27
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

10.22051/JAB.2021.34309.1398

# ارزیابی آزمایشگاهی اثر جاذب آلی برمیزان کاهش مایکوتوکسین زیرالنون

**فاطمه آدمی قمصری،[۱] مریم تاج آبادی ابراهیمی*،[۲] مریم باقری ورزنه،[۳]**

**علیرضا ایرانبخش،[۴] عباس اخوان سپهی[۵]**

## چکیده

***مقدمه:*** *زیرالنون یکی از مهمترین و فراوانترین سموم قارچی است که باعث آلودگی مواد غذایی و خوراک دام و طیور شده و آسیب‌های جدی به انسان و دام وارد می‌کند. پژوهش حاضر به بررسی اثر جاذب آلی حاوی چهار سویه لاکتوباسیلوس (Lactobacillus) بومی ایران و دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae) بر کاهش مایکوتوکسین زیرالنون پرداخته است.* ***روش ها:*** *با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (high-performance liquid chromatography یا HPLC) اثر عوامل مختلف و هم‌افزایی سویه‌ها مورد سنجش قرار گرفت.* ***نتایج و بحث:*** *بر اساس نتایج، جاذب آلی بررسی شده می‌تواند مایکوتوکسین زیرالنون را جذب کرده و مقدار آن را در نمونه کاهش دهد. همچنین جاذب حرارت دیده و فعال در محیط کشت بهترین جذب را داشتند. بررسی ارزیابی هم‌افزایی سویه‌ها نیز کاهش بیشتر سم نسبت به هریک از سویه‌ها به تنهایی را نشان داد. بنابراین، جاذب آلی مورد مطالعه جهت کنترل و کاهش آلودگی مایکوتوکسین زیرالنون پیشنهاد می‌شود.*

***واژه های کلیدی: پروبیوتیک، جذب، دیواره سلولی مخمر، سموم، لاکتوباسیلوس***

---

۱ . دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲ . دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول: M.tajabadi@iauctb.ac.ir)
۳ . استادیار، گروه کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST)، تهران، ایران
۴ . استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵ . دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

## مقدمه

مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی متابولیت‌های سمی هستند که توسط برخی قارچ‌ها تولید می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها در صورت بلعیده شدن غذای آلوده به این سموم، به اندام‌های انسان و حیوان نیز آسیب می‌رسانند (Kemboi *et al.*, 2020). در کشورهای در حال توسعه، بیش از ۴/۵ میلیارد نفر در معرض سطح بالایی از آلودگی غذایی به مایکوتوکسین قرار دارند (Hassan *et al.*, 2015). عوامل مختلفی در بروز و شدت علایم آلودگی با سموم قارچی در دام نقش دارد. از عمده‌ترین عواملی که دخیل هستند می‌توان به مقدار سم، مدت زمانی که حیوان در معرض آن سم قرار دارد، جنس و گونه و نژاد حیوان، وضعیت فیزیولوژیکی حیوان (آبستنی، سن، بیماری، استرس و غیره)، جیره‌ی مورد استفاده، وضعیت مواد مغذی موجود در آن و وجود سموم قارچی در خوراک اشاره نمود. آفلاتوکسین (aflatoxin)، زیرالنون (zearalenone)، داکسی‌نیوالنول (deoxynivalenol)، فومونیسین (fumonisin) و اکراتوکسین (ochratoxin) مهمترین مایکوتوکسین‌های کشاورزی هستند. از آنجا که سموم قارچی ترکیباتی با ماهیت پیچیده هستند و به دلیل سمیت زیاد و فراوانی در غلات و محصولات غذایی یکی از خطرناک‌ترین سموم برای سلامتی انسان و حیوانات به خصوص دام و طیور محسوب می شوند (Franco *et al.*, 2011) لذا باید به نحوی در مزارع مدیریت شوند که مضرات اقتصادی ناشی از آنها به حداقل برسد (Galvano *et al.*, 2001; Whitlow, 2005; Binder, 2007).

زیرالنون (zearalenone) با مخفف ZEA و نام دیگر F2-toxin نیز شناخته می‌شود. این سم یک متابولیت ثانویه است که توسط قارچ‌های جنس فوزاریوم (*Fusarium*) از جمله *F. roseum*، *F. graminearum*، *F. culmorum*، *F. crookwellense*، *F. equiseti*، *F. semitectum*، *F. oxysporum* و *F. moniliform* تولید می‌شود. این قارچ‌ها در محصولات کشاورزی مانند ذرت، برنج، گندم، جو، کنجد، جو دوسر و سویا رشد می‌کنند و در انواع خوراک دام و طیور حضور دارند. قارچ *Fusarium graminearum* عمده‌ترین قارچ مولد مایکوتوکسین زیرالنون است و در سطح جهان به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماریزای قارچی غلات و حبوبات شناخته شده است که خسارات زیادی به صنعت کشاورزی وارد می‌کند (Kabak *et al.*, 2006).

مایکوتوکسین زیرالنون دارای فعالیت استروژنی قوی است و در حیوانات عوارضی مانند کاهش مصرف خوراک، کاهش تولید شیر، افزایش سلول‌های پیکری شیر (somatic cell count)، درد شکم، تورم غدد پستانی، آتروفی تخمدان، سقط جنین، مرده‌زایی، تورم و عفونت واژن، پرولاپس واژن و رکتوم، کاهش مقدار هورمون لوتئینی و پروژسترون و تغییر مورفولوژی بافت رحم، کاهش میل جنسی، آتروفی بیضه، کاهش کیفیت اسپرم، بروز صفات جنسی ماده در حیوانات جوان نر به علت کاهش ترشح تستوسترون و ناباروری را ایجاد می کند (Coppock *et al.*, 1990; Towers *et al.*, 1995; Whitlow, 2005; Gaskill, 2008).

آلودگی خوراک و مواد غذایی با مایکوتوکسین‌ها یک مسئله مهم ایمنی خوراک است که منجر به ضرر اقتصادی زیادی می‌شود. در نتیجه، روش‌های مختلفی برای کاهش و کنترل آلودگی قارچی وجود دارد. بطور کلی عوامل سم‌زدایی را می توان به دو گروه مختلف تقسیم کرد: ۱) جاذب‌ها ۲) اصلاح کننده‌های مایکوتوکسین. این دو گروه نحوه عملکرد متفاوتی دارند. جاذب‌های مایکوتوکسین، سم را در روده جذب می‌کنند، در نتیجه با اتصال جاذب به سم، کمپلکس سم-جاذب تشکیل شده، سم غیر فعال می‌گردد و از دستگاه گوارش خارج می‌شود. در حالی که اصلاح کننده‌های مایکوتوکسین، سم را به متابولیت‌های غیر سمی و یا با سمیت کمتر تبدیل می‌کنند (He & Zhou, 2010; Devreese *et al.*, 2014).

یکی از بهتـرین روش‌ها بـــرای کاهش و کنترل آلودگی قارچی خوراک و مواد غذایی، استفاده از میکروارگانیسم‌ها است. چرا که بدون استفاده از مـــواد شیمیـــایی مضر و محدودیت‌ها و مشکلاتی که سایر روش‌ها دارند، استفاده از میکروارگانیسم‌ها بعنوان جاذب آلی، با حفظ ارزش غذایی مواد غذایی و خوراک‌های آلوده، برای کاهش و حذف مایکوتوکسین‌ها روش مناسبتری است (Armando *et al.*, 2012). با توجه به توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد برخی قارچ‌ها، جذب و حذف چندین مایکوتوکسین از جمله سم زیرالنون، این باکتری‌ها می‌توانند نامزدهای خوبی برای کنترل زیستی آلودگی قارچی خوراک باشند (Franco *et al.*, 2011). باکتـــری‌های اسیـــد لاکتیک به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها می‌تواند در جهت بهبود ایمنی خوراک به دلیل تـــوان بـــالقـــوه آنها در کـــاهش سطح آلودگی مایکوتوکسین‌ها استفاده شوند (Haskard *et al.*, 2001). فعالیت اتصالی بـــاکتری‌های اسیـــد لاکتیک به مـــایکوتـــوکسیـــن‌ها را می‌تـــوان به عنوان معیاری در انتخاب پروبیوتیک‌ها در نظر گرفت. پلی‌ساکارید، پپتیدوگلیکان و پروتئین‌های لایه خارجی دیواره سلولی از عوامل شناخته شده اتصال به مایکوتوکسین‌ها هستند (Niderkorn *et al.*, 2009; Piotrowska, 2014).

پژوهش حاضر به بررسی کاهش آزمایشگاهی مایکوتوکسین زیرالنون توسط جاذب آلی حاوی چند سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بومی ایران و جدا شده از محصولات لبنی و تخمیری و دیواره سلولی مخمر با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف و همچنین ارزیابی اثر هم‌افزایی سویه‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (high-performance liquid chromatography یا HPLC) پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد مطالعه، شامل *Lactobacillus brevis* TD4 (IBRC-10790)، *Lactobacillus brevis* TD10 (IBRC-10781)، *Lactobacillus casei* T2 (IBRC-10783) و *Lactobacillus paracasei* TD3 (IBRC-10784) بومی ایران و دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* تهیه شده از شرکت تک ژن زیست می‌باشد.

## آماده‌سازی جاذب آلی

یک گرم پودر منجمد شده‌ی هر یک از چهار سویه لاکتوباسیلوس (نگهداری پودر در یخچال $^{\circ}C$ ۴) در شرایط استریل به ظروف شیشه‌ای حاوی ml ۱۵ محیط کشت MRS broth استریل با pH خنثی به طور جداگانه اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ و ۵ درصد $CO_2$ گرماگذاری شدند. از دیواره سلولی مخمر نیز سوسپانسیونی با غلظت نهایی µg/ml ۱۵۰ تهیه گردید.

## بررسی میزان کاهش سم زیرالنون توسط لاکتوباسیلوس‌های فعال در محیط کشت MRS broth

مقدار ml ۱ از کشت فعال شده هر باکتری بطورجداگانه در ml ۱۰ محیط کشت MRS broth استریل تلیقیح شد. پس از گرماگذاری (گرمخانه شیکردار $^{\circ}C$ ۳۷، rpm ۱۲۰) و رسیدن به غلظت نهایی cfu/ml $۱۰^۹$، سم زیرالنون (cas no:17924-92-4) خریداری شده از شرکت Merck آلمان، (نگهداری در فریزر $^{\circ}C$ ۲۰-) با غلظت اولیه ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر (part per billion یا ppb)، معادل با حد مجاز این سم در خوراک دام به نمونه‌های فوق اضافه شد (Karlovsky *et al.*, 2016). برای باکتری برتر با بیشترین میزان کاهش سم در غلظت اولیه، جذب در غلظت دو برابر حد مجاز سم (۱۰۰۰ ppb) مورد بررسی قرار گرفت (Karlovsky *et al.*, 2016).

محیط MRS broth بدون باکتری حاوی هر دو غلظت سم نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌ها پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری (گرمخانه شیکردار $^{\circ}C$ ۳۷، rpm ۱۲۰) در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت سانتریفوژ شدند ($^{\circ}C$ ۵ ,۲۰ min ,g ۱۴۰۰۰×). سپس مایع رویی نمونه‌ها پس از سانتریفوژ و عبور از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر جمع آوری و مقدار سم باقی مانده در محیط توسط HPLC اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد منفی شامل یک گرم پودر باکتری‌ها (هر کدام جداگانه) در ml ۱۰ محیط کشت MRS brothتهیه و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد.

## بررسی میزان کاهش سم زیرالنون توسط جاذب آلی حرارت دیده و حرارت ندیده در محلول بافرفسفات سالین (phosphate buffered saline یا PBS)

مقدار ml ۱۰ از کشت فعال شده هر باکتری بطور مجزا سانتریفوژ ($^{\circ}C$ ۵ ,۲۰ min ,g ۱۴۰۰۰×) شدند. سپس رسوب سلولی هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه با غلظت نهایی cfu/ml $۱۰^۹$ به ml ۱۰ محلول PBS استریل اضافه و سم زیرالنون با غلظت

اولیه ppb ۵۰۰ به نمونه‌های فوق اضافه گردید. میزان جذب و کاهش سم در غلظت دو برابر سم (ppb ۱۰۰۰) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

جهت بررسی نمونه‌های حرارت دیده، رسوب سلولی هر یک از باکتری‌ها در دمای $^{\circ}C$ ۱۲۱ به مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند و پس از رسیدن به دمای محیط با غلظت نهایی $10^9$ cfu/ml به ml ۱۰ محلول PBS استریل اضافه و سم زیرالنون با غلظت اولیه ppb ۵۰۰ به نمونه‌های فوق افزوده گردید. برای باکتری با بهترین میزان کاهش سم در غلظت اولیه، جذب در غلظت دو برابر سم (ppb ۱۰۰۰) مورد بررسی قرار گرفت.

از دیواره سلولی مخمر سوسپانسیونی با غلظت µg/ml ۱۵۰ در محلول PBS استریل تهیه شد و تحت شرایط فوق الذکر اتوکلاو شد. سپس سم زیرالنون با غلظت‌های فوق و به طور مجزا به سوسپانسیون اضافه گردید. محلول PBS استریل حاوی غلظت ذکر شده از سم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

تمام نمونه‌های فوق پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری (گرمخانه $^{\circ}C$ ۳۷، rpm ۱۲۰)، در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت، سانتریفوژ شدند ($^{\circ}C$ ۵ ,۲۰ min, g ×۱۴۰۰۰). سپس مایع رویی پس از عبور از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر جمع آوری و مقدار سم باقی مانده در محیط توسط HPLC سنجش گردید.

## بررسی اثر هم‌افزایی باکتری‌های جاذب بر میزان کاهش سم زیرالنون

دو سویه لاکتوباسیلوس با بهترین جذب در محلول PBS و محیط کشت MRS broth به منظور تجزیه و تحلیل اثر هم‌افزایی آنها بر میزان کاهش سم زیرالنون به طور جداگانه انتخاب شدند.

*L. brevis* TD4 و *L. paracasei* TD3 به محلول PBS و *L. brevis* TD4 و *L. brevis* TD10 به محیط کشت MRS broth، با غلظت نهایی $10^9$ cfu/ml اضافه شدند. سپس سم زیرالنون با غلظت ppb ۵۰۰ به نمونه‌های فوق اضافه گردید. سوسپانسیون تمام نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (گرمخانه شیکردار دمای $^{\circ}C$ ۳۷ ، rpm ۱۲۰). نمونه‌ها تحت شرایط یکسان سانتریفیوژ شدند ($^{\circ}C$ ۵ ,۲۰ min, g ×۱۴۰۰۰). مایع رویی پس از سانتریفیوژ در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت جمع آوری و میزان سم باقی مانده در نمونه توسط دستگاه HPLC سنجیده شد.

## تعیین میزان سم زیرالنون توسط HPLC

جهت ارزیابی میزان سم باقی مانده در نمونه‌ها از سیستم HPLC مجهز به آشکارساز Gilson 151 UV-Vis، نرم افزار Gilson 712 (Gilson، Inc.، Middleton) و ستون C18 (۵ ˚C ،mm ۴/۶ ×۲۵۰) استفاده شد. فاز متحرک شامل ترکیب استونیتریل ( با درجه HPLC، مرک آلمان) و آب دو بار تقطیر با نسبت (v/v) ۵۵:۴۵ تهیه شد و دستگاه در حالت ایزوکراتیک با سرعت جریان ml/min ۱ و دمای ستون ۳۰˚C تنظیم شد. تزریق با حجم ۵۰µl و تشخیص سم زیرالنون در طول موج ۲۳۶ nm انجام گردید (Vega *et al.*, 2017).

## منحنی استاندارد

منحنی استاندارد سم زیرالنون بر اساس رقت‌های متوالی صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ ppb و از طریق تزریق سه تکرار به دستگاه HPLC رسم شد و معادله خط با استفاده از نرم افزار اکسل محاسبه شد.

## اعتبارسنجی روش HPLC

جهت محاسبه دقت روش (Precision)، غلظت ۵۰۰ ppb از محلول استاندارد سم زیرالنون تهیه و اندازه‌گیری شش بار در یک روز (intra-day) و در سه روز متوالی (inter-day) انجام شد. سپس انحراف استاندارد نسبی (RSD) بر اساس معادله ۱ مربوطه محاسبه گردید.

$$\text{RSD}\ (\%) = \frac{\text{انحراف معیار}}{\text{میانگین}}$$

معادله ۱)

در بررسی حساسیت (sensitivity)، حد تشخیص یا LOD (Limit of Detection) و حد تعیین مقدار یا LOQ (Limit of Quantification) تعیین شد. LOD، کمترین غلظتی است که در یک ماتریکس قابل تشخیص است ولی به دقت قابل اندازه‌گیری نیست و LOQ، کمترین غلظتی است که با دقت و صحت قابل قبول، قابل اندازه‌گیری است. به این منظور، با استفاده از رقت سریال محلول‌های استاندارد سم، LOD و LOQ بر اساس معادلات ۲ و ۳ محاسبه شد که در آن STEYX معادله بازگرداندن خطای استاندارد Y پیش بینی شده به ازای هر X در منحنی استاندارد و Slope شیب خط معادله محاسبه شده بر اساس غلظت‌های مختلف سم است.

$$\mathrm{LOD} = 3.3 \times \left(\frac{\mathrm{STEYX}}{\mathrm{Slope}}\right)$$

معادله ۲)

$$\mathrm{LOQ} = 10 \times \left(\frac{\mathrm{STEYX}}{\mathrm{Slope}}\right)$$

معادله ۳)

همچنین محدوده بازیافت (Recovery) از محلول‌های حاوی غلظت‌های ppb۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ از سم استاندارد بر اساس معادله ۴ بدست آمد:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{مقدار اندازه گیری شده پس از اضافه کردن سم استاندارد}}{\text{مقدار اولیه اندازه گیری شده سم در نمونه} + \text{مقدار اضافه شده از سم استاندارد}} \times ۱۰۰$$

معادله ۴)

همچنین طبق معادله ۵، میزان جذب و کاهش سم نسبت به مقدار اولیه محاسبه و تعیین گردید (Vega *et al.*, 2017).

$$\text{درصد جذب} = ۱۰۰ - \left(\frac{(area) \text{ عدد سطح زیر پیک نمونه} \times ۱۰۰}{(area) \text{ عدد سطح زیر پیک شاهد}}\right)$$

معادله ۵)

## تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار GraphPad Prism 6 استفاده گردید. مقایسات بین میانگین‌ها ($P<۰/۰۵$) با استفاده از آزمون t جفت شده و آنالیز واریانس (ANOVA) تعیین شد.

## نتایج و بحث

کنترل و کاهش آلودگی قارچی خوراک دام و طیور و مواد غذایی در سراسر دنیا بسیار با اهمیت است. به این منظور در بین انواع روش‌های موجود، روش بیولوژیکی، به طور ویژه استفاده از ارگانیسم‌ها می‌تواند مناسب و موثر باشد.

هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی آزمایشگاهی اثر جاذب آلی شامل *Lactobacillus casei* T2 (IBRC-10783), *Lactobacillus brevis* TD4, *Lactobacillus brevis* TD10 (IBRC-10781), (IBRC-10790)

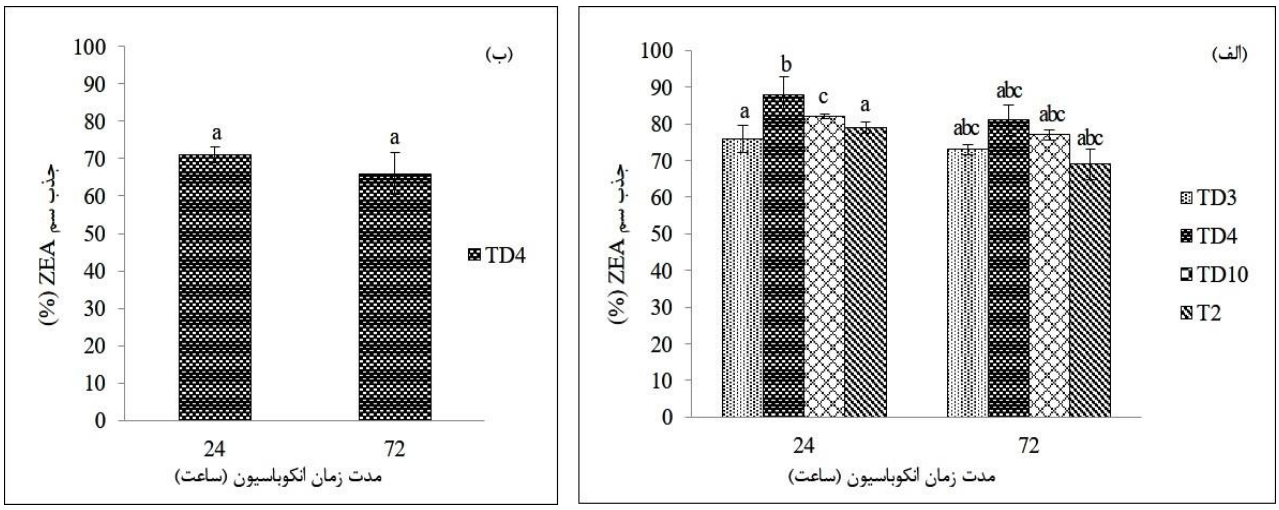
*Lactobacillus paracasei* TD3 (IBRC-10784) بومی ایران جدا شده از محصولات لبنی و تخمیری و دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* می‌باشد. اثر هم‌افزایی باکتری‌های مذکور با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف مانند مدت زمان گرماگذاری (صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت)، حالت جاذب (زنده، حرارت دیده و فعال) و غلظت سم (۵۰۰ ppb و ۱۰۰۰ ppb ) بر میزان جذب و کاهش مایکوتوکسین زیرالنون، با استفاده از روش HPLC بررسی گردید.

## نتایج مقدار کاهش سم زیرالنون و میزان جذب

بهترین جذب و کاهش سم زیرالنون توسط سلول‌های فعال سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb سم (معادل با حد مجاز خوراک دام) در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری به ترتیب با میزان ۸۸ و ۸۱ درصد توسط *L.brevis* TD4 مشاهده شد (شکل ۱. الف).

در بررسی غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb معادل با دوبرابر حد مجاز خوراک دام) نیز میزان کاهش سم توسط *L.brevis* TD4 پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری به ترتیب ۷۰ و ۶۵ درصد بدست آمد. در هر دو غلظت اولیه و دوبرابر سم، با گذشت زمان انکوباسیون، اختلاف معنی‌داری در میزان جذب سم توسط هریک از سویه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱. ب).

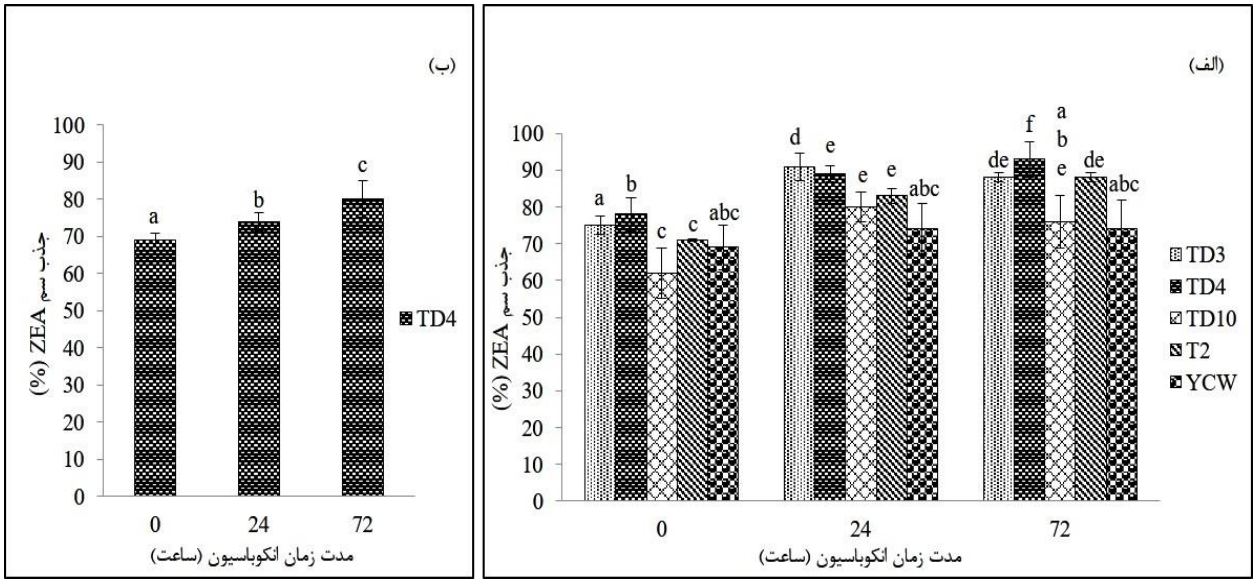
در تحقیق حاضر، ارزیابی مدت زمان گرماگذاری بعنوان پارامتر مهم در میزان جذب و کاهش سم زیرالنون نشان داد که بیشترین میزان کاهش سم توسط سلول‌های فعال سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری می‌باشد که در زمان ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با زمان ۲۴ ساعت نشان نداد. در هر دو غلظت اولیه و دو برابر سم، با گذشت زمان انکوباسیون، اختلاف معنی‌داری در میزان جذب سم توسط هر یک از سویه‌ها مشاهده نشد. بررسی دو سویه باکتری اسید لاکتیک در محیط کشت MRS broth حاوی سم زیرالنون، پس از گرماگذاری در فواصل زمانی صفر تا ۱۲۰۰ دقیقه و سنجش میزان سم باقی مانده در محیط نشان داد که این سویه‌ها قادر به جذب و کاهش معنی‌دار سم مذکور بودند. بیشترین میزان کاهش سم زیرالنون در محلول PBS و نیز در محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد ( Zou *et al.*, 2012; Vega *et al.*, 2017; Król *et al.*, 2018) که با نتایج تحقیق حاضر در توافق است.




**شکل ۱- الف) نمودار مقایسه‌ی میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb توسط باکتری‌های فعال (سویه‌های TD3, TD4, TD10, T2) در محیط کشت MRS broth در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. ب) میزان کاهش سم توسط *L.brevis* سویه TD4 در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار است. (P <۰/۰۵)**

**Figure 1. A) The comparative chart of the adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb by the active bacteria (T2, TD10, TD4, and TD3 strains) in MRS broth medium for 24 and 72 hr incubation time. B) The reduction of toxin with twice concentration (1000 ppb) by L. brevis TD4 for 24 and 72 hr incubation time. The different lowercase letter shows a significant difference (p < 0.05)**

جذب و کاهش سم زیرالنون توسط سویه‌های کشته شده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت دیده، با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb نشان داد *L.brevis* TD4 در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت به ترتیب با میزان ۷۸ و ۹۳ درصد و *L.paracasei* TD3 در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری با میزان جذب ۹۱ درصد، بهترین میزان کاهش سم را نسبت به سایرین داشتند (شکل ۲. الف). میزان جذب در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) توسط *L.brevis* TD4 بعنوان سویه برتر با بهترین میزان کاهش سم در غلظت اولیه، در صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۹ درصد، ۷۳ درصد و ۷۷ درصد بدست آمد (شکل ۲. ب). در هر دو غلظت اولیه و دو برابر سم در بین سویه‌های کشته شده، در سویه TD4 با افزایش زمان انکوباسیون میزان جذب بطور معنی‌داری (P <۰/۰۵) افزایش یافت.

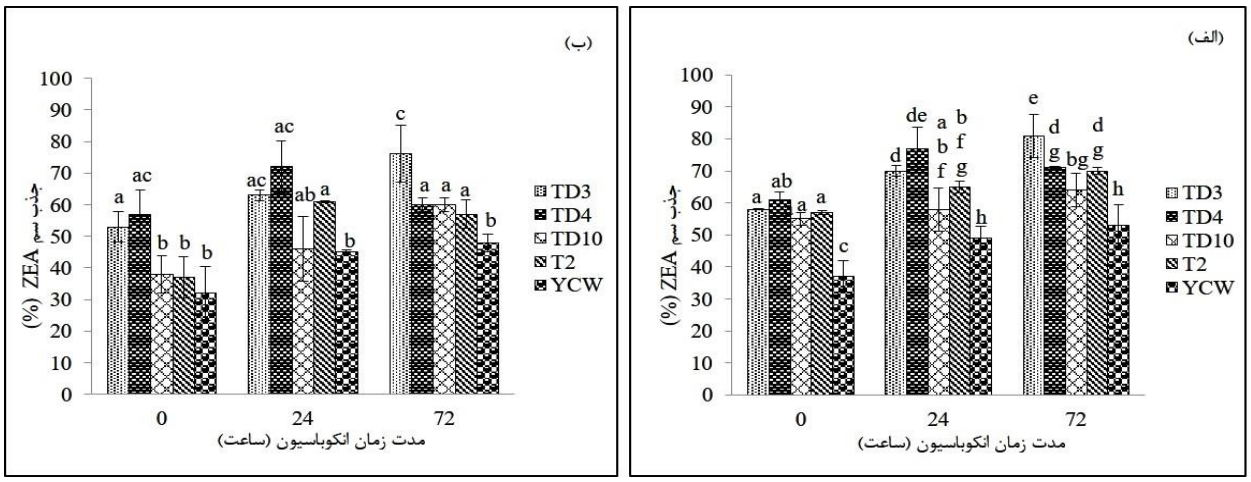



**شکل ۲- الف) نمودار مقایسه ی زمان گرماگذاری بر میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb توسط باکتری‌های کشته شده (سویه‌های TD3, TD4, TD10, T2) و دیواره سلولی مخمر (YCW) حرارت دیده درمحلول PBS. ب) میزان کاهش سم توسط *L.brevis*سویه TD4 در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) در مدت زمان صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار (P <۰/۰۵) است.**

**Figure 2. A) The comparative chart of the incubation time with adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb by the killed bacteria (T2, TD10, TD4, and TD3 strains) and the heated yeast cell wall (YCW) in PBS solution. B) The reduction of toxin with twice concentration (1000 ppb) by L. brevis TD4 for 0, 24, and 72 hr incubation time. The different lowercase letter shows a significant difference (p < 0.05.)**

بهترین جذب و کاهش سم زیرالنون توسط سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده در محلول PBS با غلظت اولیه سم ppb ۵۰۰ در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت گرماگذاری به ترتیب با میزان ۶۱ و ۷۷ درصد توسط *L.brevis* TD4 و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری توسط *L.paracasei* TD3 با میزان ۸۱ درصد مشاهده شد (شکل ۳. الف). Piotrowska (۲۰۱۴) و Chlebicz & Śliżewska (۲۰۲۰)، میزان سم‌زدایی زیرالنون را توسط باکتری اسید لاکتیک و مخمر *S. cerevisiae* با روش HPLC بررسی کردند و کاهش غلظت سم در محلول PBS توسط باکتری‌ها و مخمر را پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری نشان دادند.

در بررسی غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) نیز میزان کاهش سم توسط *L.brevis* TD4 در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب با میزان ۵۸ درصد، ۷۲ درصد و ۵۷ درصد و نیز توسط *L.paracasei* TD3 در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۵۳ درصد، ۶۳ درصد و ۷۶ درصد بدست آمد که اختلاف معنی‌داری در میزان جذب توسط TD3 بین زمان صفر و ۷۲ ساعت (P <۰/۰۵) مشاهده شد (شکل ۳. ب).




**شکل ۳ -الف) نمودار مقایسه‌ی میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb توسط باکتری‌های زنده (سویه‌های TD3 TD4, TD10, T2) و دیواره سلولی مخمر (YCW) حرارت ندیده در محلول PBS در مدت زمان صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعته گرماگذاری. ب) غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb). حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P <۰/۰۵) است.**

**Figure 3. A) The comparative chart of the adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb by the live bacteria (T2, TD10, TD4, and TD3 strains) and unheated yeast cell wall (YCW) in PBS solution for 0, 24, and 72 hr incubation time. B) The twice concentration (1000 ppb) of toxin. The different lowercase letter shows a significant difference (p < 0.05)**

در مطالعه حاضر، میزان کاهش سم زیرالنون توسط سویه‌های کشته شده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت دیده در محلول PBS به طور معنی‌داری (P <۰/۰۵) بیشتر از سویه‌های زنده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده مشاهده شد که ممکن است به سبب تغییر شکل دیواره سلول و نیز افزایش اندازه منافذ دیواره و در نتیجه جایگیری بهتر سم در بین اجزای دیواره و کاهش بیشتر سم در محلول باشد. بیشترین کاهش سم توسط سلول‌های زنده و کشته شده سویه‌های لاکتوباسیلوس در محلول PBS در زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری مشاهده شد که با زمان ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت اما هر دو زمان نسبت به زمان صفر معنی‌دار (P <۰/۰۵) بودند که می‌تواند به دلیل پایداری اتصال کمپلکس جاذب-سم باشد. بنابراین مشاهده گردید مدت زمان گرماگذاری در میزان جذب سم توسط جاذب اثر دارد. با افزایش مدت زمان گرماگذاری میزان کاهش سم افزایش یافته است بطوری که پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری میزان کاهش سم بطور معنی‌داری (P <۰/۰۵) بیشتر از صفر ساعت گرماگذاری بدست آمد. در حالی که میزان کاهش سم زیرالنون توسط سلول‌های کشته شده سویه‌های لاکتوباسیلوس در محلول PBS با سلول‌های فعال سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بدست نیامد. بنابراین بهترین میزان کاهش سم، توسط سویه‌های کشته شده و فعال در محیط کشت مشاهده شد.

سه باکتری *L. plantarum*، *L. brevis* و *L. sanfranciscensis* غیرفعال شده با حرارت میزان کاهش بیشتری از مایکوتوکسین اکراتوکسین A را در محلول PBS نسبت به سلول‌های زنده دارند؛ به طوری که این اتصال تا حدی برگشت پذیر است که می‌تواند به دلیل خاصیت آبگریز بودن دیواره سلولی باکتری‌های مذکور باشد (Piotrowska, 2014). همچنین در مطالعه Čvekو همکارانش (۲۰۱۲)، سلول‌های کشته شده سویه‌های لاکتوباسیلوس توانایی بیشتری برای کاهش سم زیرالنون نسبت به سلول‌های زنده در محلول PBS و فعال در محیط کشت نشان دادند.

مهمترین اجزاء دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک عبارتند از زنجیره پپتیدوگلیکان، پلی‌ساکارید و پروتئین‌ها (Haskard *et al.*, 2001; Niderkorn *et al.*, 2006). این اجزاء دیواره سلولی عمدتا وظیفه چسبندگی باکتری‌های اسید لاکتیک به سموم را به عهده دارند (Hathout & Aly, 2014). Niderkorn و همکاران (۲۰۰۹)، Hathout & Aly (۲۰۱۴) و Piotrowska (۲۰۱۴)، ایجاد پیوند بین ترکیبات کربوهیدراتی بویژه گلوکان، پلی‌ساکارید، پپتیدوگلیکان، پروتئین، اسید تیکوئیک و بخش‌های آب گریز دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک با بخش‌هایی از مایکوتوکسین که از نظر ساختمانی مناسب اتصال است را عامل جذب آن بیان نمودند. بر اساس مطالعه Niderkorn و همکارانش (۲۰۰۹)، با حذف پپتیدوگلیکان در باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله *L. lactis*، اتصال به مایکوتوکسین فومونیسین انجام نمی‌گیرد که این امر در مورد سایر مایکوتوکسین‌ها نیز می‌تواند صدق کند. این اجزا در اوایل چرخه رشد باکتری‌ها سنتز می‌شود در حالی که اتصال در مرحله تأخیر مشاهده شد. به علاوه بیشترین میزان اتصال در پایان مرحله نمایی از چرخه رشد بدست آمد.

غیرفعال شدن توسط حرارت تاثیر زیادی بر توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در حذف مایکوتوکسین دارد (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Franco *et al.*, 2011). پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک همچون *Lactobacillus rhamnosus* توانایی اتصال و کاهش سم زیرالنون در شرایط آزمایشگاهی را دارند (Haskard *et al.*, 2001; Niderkorn *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2018). سلول‌های *L. acidophilus* CIP 76.13T و *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP 101027 توانایی حذف زیرالنون، آفلاتوکسین B1، اکراتوکسین A و داکسی‌نیوالنول از محیط کشت MRS broth و محلول PBS در طی ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ $^{o}$ C را دارند. صرف نظر از محیط، سلول‌های غیرفعال در اثر حرارت، به طور قابل توجهی سبب کاهش بیشتر مایکوتوکسین نسبت به سلول‌های زنده شدند. نتایج حاصل از این یافته‌ها حاکی از آن است که استفاده از سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جهت کاهش آلودگی ناشی از مایکوتوکسین‌ها در صنعت خوراک می‌تواند امکان‌پذیر باشد (Ragoubi *et al.*, 2021).

*L. casei* ،*L. brevis* ،*L. lactic* و *L. plantarum* می‌توانند مایکوتوکسین زیرالنون را در محیط کشت MRS broth در دمای ۳۷ °C و پس از مدت زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری کاهش دهند. باکتری‌های تیمار شده با حرارت در مقایسه با سلول‌های زنده در محلول PBS قادر به حذف میزان بیشتری از سم هستند (Zou *et al.*, 2012). *Lactobacillus paracasei* جدا شده از کشت آغازگر خمیر ترش قادر به کاهش و سم‌زدایی سم زیرالنون از طریق اتصال سطحی و تجزیه آنزیمی از محیط مایع است (Hassan *et al.*, 2015).

در پژوهش حاضر، میزان کاهش سم زیرالنون توسط دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده و حرارت دیده در محلول PBS در صفر ساعت به ترتیب ۳۷ و ۶۹ درصد، در ۲۴ ساعت ۴۹ درصد و ۷۴ درصد و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری ۵۳ و ۷۴ درصد مشاهده شد. دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* مورد بررسی، جذب قابل توجهی از سم زیرالنون را دارد که احتمالا به دلیل ماهیت ساختاری و ترکیبات موجود در دیواره است که می‌تواند به همراه سویه‌های لاکتوباسیلوس در میزان جذب بیشتر و بهتر سم مؤثر باشد. در مطالعه حاضر، مقایسه‌ی میزان جذب وکاهش سم زیرالنون توسط دیواره سلولی حرارت دیده و حرارت ندیده نشان داد که حرارت اثر معنی‌داری در جذب سم داشته است؛ بطوری که میزان کاهش سم توسط دیواره سلولی مخمر حرارت دیده بطور معنی‌داری، بیشتر از دیواره سلولی حرارت ندیده است. اتصال مخمر *S. cerevisiae* به مایکوتوکسین زیرالنون به شرایط فیزیولوژیکی و محیطی مانند سطح آبگریزی دیواره سلول مرتبط است و بهترین جذب پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (Kregiel *et al.*, 2012) که با نتایج حاصله در پژوهش حاضر مطابقت دارد. دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* در شرایط آزمایشگاهی، توانست سم زیرالنون را در خوراک آلوده جذب کند (Kurochkina & Krasnoshtanova, 2020).

بتا گلوکان و مانان دیواره‌ی سلولی مخمر *S. cerevisiae* قادر به جذب و کاهش مایکوتوکسین زیرالنون است (Liu *et al.*, 2021). اتصال مشابه با باکتری‌های اسید لاکتیک در مخمر *S. cerevisiae* نشان داده شده است. بتا گلوکان دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* قادر به اتصال به سم زیرالنون بوده و سم موجود در محیط را کاهش می‌دهد (Shetty & Jespersen, 2006).

پدیده‌ی اتصال مایکوتوکسین آفلاتوکسین، یک پدیده‌ی فیزیکی بوده که درسطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می افتد. که از طریق اتصال (کلاته کردن) به مولکول‌های آفلاتوکسین و حذف آن از دستگاه گوارش انجام می شود. پلی‌ساکاریدها و مانوالیگوساکارید استخراج شده از دیواره‌ی سلولی مخمر *S. cerevisiae* قادر به جذب آفلاتوکسین بوده بدون اینکه تغییری در ساختارش ایجاد شود. Yiannikouris و همکارانش (۲۰۰۶)، نشان دادند که B-(1,3and1,6)-D-glucans قسمت‌های جدا شده در دیواره سلولی مخمر که بوسیله عصاره‌گیری قلیایی به دست آمده قادرند زیرالنون را با تمایل بیش از ۵۰ درصد جذب نماید.

در چندین تحقیق پیرامون بررسی دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* بعنوان اتصال دهنده مایکوتوکسین، میان‌کنش بین β-D-glucans و مایکوتوکسین ZEA عامل اتصال بیان شده است. نتایج بدست آمده از روش 1H-NMR نشان داد که پیوندهای شیمیایی همچون پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی در اتصال و جذب دیواره سلولی مخمر به ZEA نیز نقش دارند (Yiannikouris *et al*., 2004a, b, 2006).

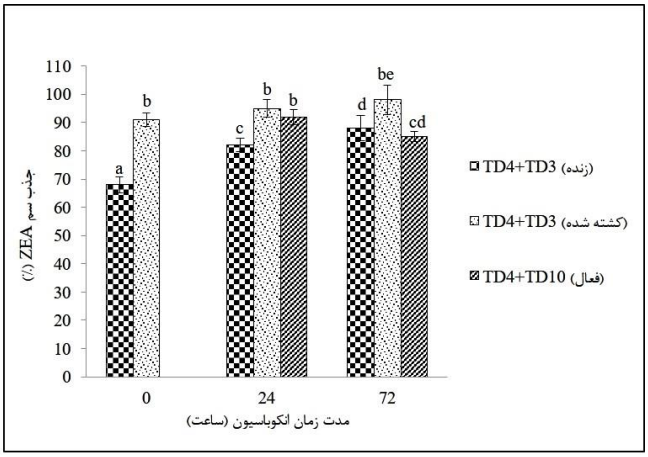
مانوپروتئین‌ها، گلوکان، پروتئین‌های لایه خارجی دیواره سلولی مخمر پویا بوده و در اتصال به مایکوتوکسین نقش دارند. تفاوت در کربوهیدرات دیواره سلولی و محتوای کیتین در بین سویه‌های مخمر در میزان اتصال با اهمیت است (Niderkorn *et al*., 2009). تعادل بین گروه‌های قطبی و آبگریز موجود در دیواره سلولی مخمر و مایکوتوکسین سبب اتصال می‌گردد. همچنین ساختار سه بعدی اجزای دیواره سلولی مخمر به ویژه D-glucans، شباهت مولکولی هندسی اتصال دهنده و سم، فعل و انفعالات آبگریزی بین واحدهای گلوکز در یک مارپیچ واحد در D-glucans و ZEA بعنوان عامل کلیدی در بازده جذب است (Freimund *et al*., 2003).

در مطالعه حاضر، بررسی اثر غلظت سم زیرالنون بعنوان یک پارامتر مهم دیگر در میزان جذب نشان می‌دهد سویه‌های لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر قادر به جذب و کاهش قابل توجهی از سم در غلظت بالاتر (دو برابر حد مجاز خوراک دام) هستند. اگر چه با افزایش غلظت سم میزان جذب کاهش غیر معنی‌داری یافت.

بررسی پارامترهای مختلف نشان می‌دهد که میزان جذب و کاهش مایکوتوکسین‌ها به عوامل مختلفی از جمله غلظت سم، مدت زمان گرماگذاری، نوع جاذب، محیط و غلظت جاذب بستگی دارد (Čvek *et al*., 2012). اگرچه مکانیسم سم‌زدایی مایکوتوکسین‌ها بطور کامل مشخص نشده است اما می‌توان از طریق دو عامل تجزیه و یا غیرفعال شدن سم توسط جاذب‌ها توضیح داده شوند. میزان تمایل اتصال باکتری‌های اسید لاکتیک و دیواره سلولی مخمر به عنوان جاذب مایکوتوکسین‌ها به سموم با یکدیگر متفاوت است که می‌تواند به دلیل اختلاف در ساختمان شیمیایی و سایر خصوصیات مایکوتوکسین‌ها باشد (Franco *et al*., 2011; Čvek *et al*., 2012).

با مقایسه میزان کاهش سم توسط باکتری‌ها، دو سویه با بهترین میزان جذب و کاهش سم در هر محیط، جهت بررسی اثر هم‌افزایی انتخاب شدند. در این بررسی، میزان کاهش سم زیرالنون توسط ترکیب دو سویه TD4 و TD3 به حالت زنده در محلول PBS در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۷ درصد، ۸۲ درصد و ۸۸ درصد مشاهده شد. میزان جذب ترکیب دو سویه TD4 و TD3 به حالت کشته شده در صفر ساعت ۹۰ درصد، در ۲۴ ساعت ۹۳ درصد و در ۷۲ ساعت ۹۸ درصد بدست آمد. ترکیب دو سویه TD4 و TD10 به حالت فعال در محیط کشت MRS broth در ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۹۷ درصد و ۹۵ درصد

بهترین جذب را نشان دادند (شکل ۴). در ارزیابی اثر هم‌افزایی باکتری‌ها در تحقیق حاضر، مشاهده شد ترکیب دو باکتری *L.* TD3 *paracasei* و *L. brevis* TD4 در محلول PBS و *L. brevis* TD4 و *L. brevis* TD10 در محیط کشت MRS broth میزان بیشتری از سم زیرالنون را در مقایسه با هر یک از باکتری‌ها به تنهایی کاهش دادند. بنابراین می‌توان گفت دو باکتری اثر یکدیگر را در جذب و کاهش سم زیرالنون تقویت کردند. در ترکیب دو سویه TD3 و TD4 زنده در محلول PBS با افزایش زمان انکوباسیون میزان جذب بطور معنی‌داری افزایش یافت. بعلاوه ترکیب دو سویه کشته شده TD3 و TD4 پس از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون، بیشترین میزان جذب را نشان دادند ($P <$ ۰/۰۵). ترکیب سویه‌های لاکتوباسیلوس مطالعه حاضر بر میزان جذب سم زیرالنون پیش‌تر توسط محققین مورد ارزیابی قرار نگرفته است. ترکیب سه سویه *L. fermentum* ،*L. reuteri* و *L. plantarum* جهت ارزیابی میزان جذب آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A موجود در ذرت آلوده، افزایش جذب و کاهش بیشتر سموم را نسبت به هریک از سویه‌ها به تنهایی نشان دادند (Zielińska & Fabiszewska, 2017).



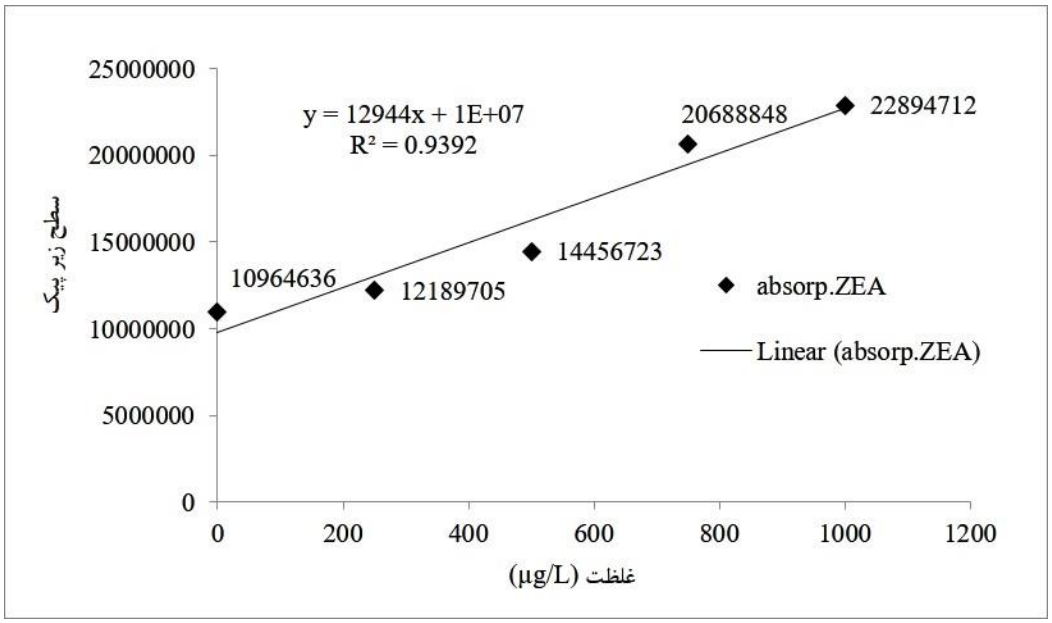

**شکل ۴ -نمودار مقایسه‌ی اثر هم‌افزایی سلول‌های زنده Lactobacillus brevis سویه TD4 و Lactobacillus paracasei سویه TD3 در محلول PBS و سلول‌های فعال Lactobacillus brevis سویه TD4 و TD10 در محیط کشت MRS broth بر میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb در مدت زمان صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P <$ ۰/۰۵) است.**

**Figure 4. The comparative chart of the synergistic effect of the live cells of Lactobacillus brevis TD4 and Lactobacillus paracasei TD3 in PBS solution and the synergistic effect of the active cells of Lactobacillus brevis TD4 and TD10 in MRS broth medium on the adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb for 0, 24, and 72 hr incubation time. The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$).**

باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک از جمله لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان یک استراتژی پاکسازی و یا کنترل ارزان، ایمن و امیدوار کننده پیشنهاد شده است که می‌تواند با کاهش آلودگی مایکوتوکسین‌ها امنیت و سطح کیفیت مواد غذایی را بهبود بخشند (Zielińska & Fabiszewska, 2017). استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک بعنوان پروبیوتیک و نیز به عنوان کنترل کننده زیستی آلودگی‌های قارچی خوراک حیوانات و انسان، می‌تواند مفید باشد (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Franco *et al.*, 2011).

## معتبرسازی روش HPLC

منحنی استاندارد برای پنج غلظت صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ ppb از سم زیرالنون رسم شد و معادله خط بدست آمد (شکل ۵). در مطالعه حاضر، عرض از مبداء بالای به دست آمده ناشی از صفر نبودن سیگنال است، اگر چه در زمان انجام آزمایش عواملی همچون کالیبره بوده دستگاه، صفر بودن دستگاه دتکتور و دقت در تهیه غلظت‌های استاندارد بررسی شده است. از طرف دیگر صفر نبودن سیگنال برای همه نمونه‌های مورد بررسی یکسان بوده و در منحنی کالیبراسیون جهت محاسبه کلیه نتایج منظور شده است.




**شکل ۵- نمودار استاندارد مایکوتوکسین زیرالنون**

**Figure 5. The calibration curve of zearalenone mycotoxin**

ضریب همبستگی ($R^2$) سم زیرالنون به میزان $R^2$= ۰/۹۳۹۲ به دست آمد. محاسبه دقت روش (Precision) به وسیله معیار تکرارپذیری در یک روز (intra-day) و در سه روز متوالی (inter_day) انجام شد. در ارزیابی دقت روش، انحراف معیار نسبی (RSD) سم زیرالنون در یک روز و در سه روز متوالی به ترتیب ۳/۰۵ و ۵ درصد محاسبه شد. مقادیر LOQ و LOD برای سم زیرالنون به ترتیب ppb ۱۱۶/۱۳ و ppb ۳۸/۳۲ و محدوده بازیافت (Recovery) ۱۱۰- ۸۵ درصد به دست آمد.

## نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، ارزیابی توانایی جذب مایکوتوکسین زیرالنون توسط چند سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بومی ایران از جمله *L. casei* T2 (IBRC-M10783) ،*L. brevis* TD4 (IBRC-M10790) ،*L. brevis* TD10 (IBRC-M10781) *L. paracasei* TD3 (IBRC-M10784) و دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* به روش HPLC نشان می‌دهد که این جاذب آلی با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف قادر به کاهش مایکوتوکسین زیرالنون بوده و می‌تواند به عنوان یک جاذب مایکوتوکسین برای کنترل و کاهش مایکوتوکسین زیرالنون استفاده شود و جهت بررسی اثر بخشی آن در خوراک دام آزمایشات درون تنی در دام پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه دوره دکترای تخصصی میکروبیولوژی مصوب و دفاع شده در دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از جناب آقای دکتر عبدالامیر قدکساز برای حمایت و مشاوره مفید اعلام دارند.

## منابع

Aguilar-Uscanga, B. and François, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology, 37: 268-274.

Armando, M.R., Pizzolitto, R.P., Dogi, C.A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcero, A.M. and Cavaglieri, L.R. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic Saccharomyces cerevisiae strains and its relation with cell wall thickness. Journal of Applied Microbiology, 113: 256-264.

Binder, E.M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Anim Feed Sci Technol, 133: 149-166.

Chlebicz, A. and Śliżewska, K. (2020). In Vitro Detoxification of Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Fumonisins, T-2 Toxin and Zearalenone by Probiotic Bacteria from Genus Lactobacillus and Saccharomyces cerevisiae Yeast. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12: 289-301.

Coppock, R., Mostrom, M., Sparling, C., Jacobsen, B. and Ross, S. (1990). Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. Veterinary and Human Toxicology, 32: 246-248.

Čvek, D., Markov, K., Frece, J., Friganović, M., Duraković, L. and Delaš, F. (2012). Adhesion of zearalenone to the surface of lactic acid bacteria cells. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 7: 49-52.

Devreese, M., Antonissen, G., De Backer, P. and Croubels, S. (2014). Efficacy of active carbon towards the absorption of deoxynivalenol in pigs. Toxins, 6: 2998-3004.

Franco, T.S., Garcia, S., Hirooka, E.Y., Ono, Y.S. and dos Santos, J.S. (2011). Lactic acid bacteria in the inhibition of Fusarium graminearum and deoxynivalenol detoxification. J Appl Microbiol, 111: 739-748.

Freimund, S., Sauter, M. and Rys, P. (2003). Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. Journal of environmental science and health, 38:243-255.

Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A. and Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. Journal of food protection, 64: 120-131.

Garcia, S.O., Feltrin, A.C.P. and Garda-Buffon, J. (2018). Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. Food Additives & Contaminants: Part A, 35: 1819-1831.

Gaskill, C. (2008). Veterinary toxicology—basic and clinical principles. The Canadian Veterinary Journal, 49: 591.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S. and Ahokas, J.T. (2001). Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. Applied and environmental microbiology, 67: 3086-3091.

Hassan, Y.I., Zhou, T. and Bullerman, L.B. (2015). Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. Food Science and Technology International, 22: 79-90.

Hathout, A.S. and Aly, S.E. (2014). Biological detoxification of mycotoxins: a review. Annals of Microbiology, 64: 905-919.

He, J. and Zhou, T. (2010). Patented techniques for detoxification of mycotoxins in feeds and food matrices. Recent patents on food, nutrition & agriculture, 2: 96-104.

Kabak, B., Dobson, A.D. and Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 46: 593-619.

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I.P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T. and Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. Mycotoxin Research, 32: 179-205.

Kemboi, D.C., Antonissen, G., Ochieng, P.E., Croubels, S., Okoth, S., Kangethe, E.K., Faas, J., Lindahl, J.F. and Gathumbi, J.K. (2020). A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in sub-Saharan Africa. Toxins, 12: 222.

Kregiel, D., Berlowska, J. and Ambroziak, W. (2012). Adhesion of yeast cells to different porous supports, stability of cell-carrier systems and formation of volatile by-products. World journal of microbiology & biotechnology, 28: 3399-3408.

Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Walczak, J. and Buszewski, B. (2018). Microbiology neutralization of zearalenone using Lactococcus lactis and Bifidobacterium sp. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410: 943-952.

Kurochkina, A.S. and Krasnoshtanova, A.A. (2020). Study of the sorption capacity of soluble forms of yeast beta-glucan. Butlerov Communications, 63: 43-50.

Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S.A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y. and Wang, Y. (2021). Structure, preparation, modification, and bioactivities of β-glucan and mannan from yeast cell wall: A review. International journal of biological macromolecules, 173: 445-456.

Nafezi, m., Tajabadi Ebrahimi, m. and Eidi, m. (2015). Investigation of the Probiotic effect of Iranian Native Lactobacillus paracasei against Toxicity Induced by Aflatoxin B1 in vivo. Journal of Arak University of Medical Sciences, 18: 72-80.

Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D. P. (2006). Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. Journal of Applied Microbiology, 101: 849-856.

Niderkorn, V., Morgavi, D. P., Aboab, B., Lemaire, M and Boudra, H. (2009). Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology, 106: 977-985.

Piotrowska, M. (2014). The adsorption of ochratoxin a by lactobacillus species. Toxins (Basel), 6: 2826-2839.

Ragoubi, C., Quintieri, L., Greco, D., Mehrez, A., Maatouk, I., D'Ascanio, V., Landoulsi, A. and Avantaggiato, G. (2021). Mycotoxin Removal by Lactobacillus spp. and Their Application in Animal Liquid Feed. Toxins (Basel), 13.

Shetty, P.H. and Jespersen, L. (2006). Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends in food science & technology, 17: 48-55.

Towers, N., Sprosen, J. and Webber, W. (1995). Zearalenone metabolites in cycling and non-cycling cows: In: A Toxinology and Food Safety. Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand.

Vega, M.F., Dieguez, S.N., Riccio, B., Aranguren, S., Giordano, A., Denzoin, L., Soraci, A.L., Tapia, M.O., Ross, R., Apás, A. and González, S.N. (2017). Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs. Brazilian Journal of Microbiology, 48: 715-723.

Whitlow, L., 2005. Molds and mycotoxins in feedstuffs–Prevention and treatment. Proceedings—Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp. 123-142.

Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., François, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G. and Jouany, J.P. (2006). Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β-d-Glucans. Biomacromolecules, 7:1147-1155.

Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and Jouany, J.P. (2004a). Alkali Extraction of β-d-Glucans from Saccharomyces cerevisiae Cell Wall and Study of Their Adsorptive Properties toward Zearalenone. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 3666-3673.

Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and Jouany, J.P. (2004b). Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the Saccharomyces cerevisiae cell wall. Journal of Food Protection, 67:1195-1200.

Zielińska, K.J. and Fabiszewska, A.U. (2017). Improvement of the quality of maize grain silage by a synergistic action of selected lactobacilli strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34: 9.

Zou, Z.-Y., He, Z.-F., Li, H.-J., Han, P.-F., Meng, X., Zhang, Y., Zhou, F., Ouyang, K.-P., Chen, X.-Y. and Tang, J. (2012). In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. Food Science and Biotechnology, 21: 1677-1683.

# In vitro evaluation of the effect of the organic adsorbent on the reduction of mycotoxin Zearalenone

**F. Adami Ghamsari,[1] M. Tajabadi Ebrahimi [*,2] M. Bagheri Varzaneh,[3]**

**A. Iranbakhsh,[4] A. Akhavan Sepahi[5]**

Received: 2021.03. 12

Accepted: 2021.08.24

**Abstract**

*Zearalenone (ZEA) is one of the most important and abundant fungal toxins that cause contamination of food and feed of livestock and poultry as well as serious damage to humans and livestock. The present study investigated the effect of organic adsorbent containing four strains of native Lactobacillus and the yeast cell wall of Saccharomyces cerevisiae on the reduction of the ZEA mycotoxin. Using high-performance liquid chromatography (HPLC), the effects of different factors including incubation time, temperature, as well as synergism of the strains were measured. Based on the obtained results, the investigated organic adsorbent can adsorb the mycotoxin ZEA and reduce its amount in the sample. Also, the heated and culture medium activated adsorbents possessed the best absorption. Evaluation of synergistic strains showed a greater reduction of the toxin than each strain alone. Therefore, the studied organic adsorbent is proposed to control and reduce mycotoxin ZEA contamination.*

***Keywords: Adsorption, Lactobacillus, Probiotic, Toxins, Yeast cell wall***

---

1 PhD Graduate, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 Associate professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran *(corresponding author: M.tajabadi@iauctb.ac.ir)

3 Assistant professor, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

4 Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5 Associate professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Teheran, Iran