مقایسه‌ی رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* در شرایط مختلف دما، رطوبت و pH

سید مسلم موسویان[۱]، مصطفی درویش‌نیا[۲*] و حشمت‌الله خسروی‌نیا[۳]

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان.
۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان.
۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان.
* مسئول مکاتبه: mdarvishnia44@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۵

چکیده

قارچ‌های *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* از مهم‌ترین عوامل آلوده‌کننده‌ی موادغذایی و دارای قابلیت تولید توکسین‌های سرطان‌زا می‌باشند. آگاهی از شرایط بهینه‌ی رشد، به کنترل و ممانعت از آلودگی و سم‌زایی این قارچ‌ها کمک می‌کند. این آزمایش به منظور بررسی تأثیر دما، pH و میزان رطوبت‌بذر بر رشد این دو گونه قارچ اجرا شد. تاثیر رطوبت بذر (در سطوح ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۰ درصد) و دما (در سطوح ۱۸، ۲۲، ۲۵، ۲۸، ۳۱ و ۳۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) در محیط‌کشت PDA و تاثیر pH (در سطوح ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷) در محیط کشت PDB مورد بررسی قرار گرفت. برای مشخص کردن توکسین‌زا بودن قارچ‌ها از محیط کشت نارگیل-آگار استفاده شد. میزان رشد قطری قارچ ها و وزن خشک میسلیوم قارچی در تیمارهای مختلف در ۴ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی ارزیابی شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. شرایط بهینه‌ی رشد برای *A. parasiticus*، دمای ۳۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، pH=۵ و رطوبت بذری ۲۷ درصد و برای *A. flavus* دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، pH=۶ و رطوبت بذری ۲۷ درصد تعیین گردید. همچنین این دو قارچ دارای قابلیت تولید افلاتوکسین بودند. این قارچ‌ها در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد مطلوبی دارند و کاهش رطوبت بذر و دماهای پایین و خنک در انبار می‌تواند در جلوگیری از رشد قارچ نقش مؤثری داشته باشد. با توجه به تولید افلاتوکسین توسط این دو قارچ می‌توان با رعایت بهداشت و کنترل عوامل محیطی از تولید این توکسین‌ها جلوگیری به‌عمل آورد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، اسیدیته، دما، رطوبت.

مقدمه

قارچ ها از جمله میکروارگانیسم های دخیل در فساد مواد غذایی به ویژه کاهش ارزش غذایی آنها در شرایط انباری هستند (استرانژ و اسکات ۲۰۰۵). ازجمله قارچ‌های غالب روی محصولات انباری، گونه های مختلف جنس *Aspergillus*، *Fusarium* و *Penicillium* هستند که از توانایی آلوده کردن مواد غذایی، انسان و حیوانات برخوردار می‌باشند (تنابریپات ۲۰۱۱). جنس آسپرژیلوس دارای انتشار جهانی و یکی از رایج‌ترین و بزرگ‌ترین گروه‌های قارچی آلوده کننده است. آسپرژیلوس‌ها هنگامی‌که روی غلات، حبوبات، دانه های روغنی و غذاهای دیگر رشد می‌کنند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های تولیدکننده‌ی میکوتوکسین‌ها در نظر گرفته می‌شوند (اسمیت ۱۹۹۳). دو گونه‌ی مهم این قارچ‌ها *A. flavus* و *A. parasiticus* هستند که با انتشار جهانی روی انواع متعددی از مواد آلی فاسدشدنی یافت می شوند. این قارچ‌ها متابولیت ثانویه سمی به نام آفلاتوکسین تولید می‌کنند که برای سلامتی انسان و حیوان مضر است (هسلتین ۱۹۶۵).

این سموم اثراتی شامل سمیت حاد و مزمن، سمیت عصبی، اثرات سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی، ناقص الخلقه‌زایی، جهش زایی و سرطان زایی دارند که مایکوتوکسیکوزیس[1] خوانده می‌شوند (رزاقی و همکاران ۲۰۰۸ و بودی ۱۹۸۹). قارچ‌های آسپرژیلوس به‌طور گسترده در محیط‌های مختلفی مانند خاک، روی سبزی ها، مواد آلی در حال فساد، بقایای موادغذایی، داروها و بافرها یافت می شوند. کلیه‌ی گونه‌های آسپرژیلوس به حرارت مقاوم بوده و قادرند خود را با گرمای بافت سازگار کرده و بیماری ایجاد کنند. بهترین شرایط برای رشد و تولید مایکوتوکسین در این قارچ‌ها، محیط‌هایی با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۸۵ درصد است (پیت و هاکینگ ۱۹۹۷ و زئینی و همکاران ۲۰۰۴). علاوه بر این، آسپرژیلوس‌ها در شرایط ویژه قدرت تولید و ترشح توکسین‌های دیگری همچون گلایوتوکسین[2]، اکراتوکسین[3]، پاتولین[4] و سیترینین[5] را نیز دارند که از نظر بهداشت مواد غذایی و مسمومیت های حاد و مزمن حائز اهمیت است (کمائی و وطناب ۲۰۰۵ و نیلسن و همکاران ۲۰۰۹). حدود ۲۰ متابولیت مرتبط با افلاتوکسین وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1، G_2 و M_1 می‌باشند که گاهی در غلظت‌های بالا در موادغذایی و خوراک آلوده یافت می‌شوند (سوونی و همکاران ۱۹۹۸). رشد کپک‌ها در غذاها و خوراک بستگی به اثرات متغیرهای متعدد مانند pH و آب فعال، غلظت املاح، دما، ترکیب اتمسفر، زمان و غیره دارد اما به‌طورکلی رطوبت و دما به‌عنوان عامل اصلی کنترل برای تعیین پتانسیل رشد در نظر گرفته می‌شوند (پلازا و همکاران ۲۰۰۳ و دانتیگنی و همکاران ۲۰۰۵). گزارش شده است که دما، رطوبت محیط و رطوبت در زمان فرآوری، انبارداری و حمل‌ونقل ازجمله عوامل مؤثر در توسعه آلودگی قارچی بعد از برداشت هستند (دینر و همکاران ۱۹۷۸). دو گونه‌ی *A. parasiticus* و *A. flavus* بسیار بهم نزدیک هستند و نرخ رشد مشابهی در pHهای مختلف نشان می‌دهند (کاترین و همکاران ۱۹۹۱). مغزهای خوراکی پسته و دیگر محصولات مستعد آلودگی مثل ذرت، کشمش، بادام و در کل مواد غذایی خشک انباری ممکن است در حین برداشت، حمل‌ونقل و فرآوری دچار آلودگی های قارچی شوند که در صورت وجود شرایط مناسب از جمله دما و رطوبت نسبی، رطوبت مواد و فعالیت آبی مغز این محصولات افزایش یافته که خود منجر به رشد و گسترش قارچ و تولید متابولیت‌های ثانویه ازجمله مایکوتوکسین‌ها می گردد. در سال ۱۳۷۶، پسته ایران به دلیل وجود سم آفلاتوکسین در آن مورد تحریم اتحادیه‌ی اروپا قرار گرفت و این موضوع باعث شد آلودگی مواد غذایی به این سموم قارچی بیشتر مورد توجه قرار بگیرد و باعث پژوهش‌های دامنه‌داری در این زمینه، توسط دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی شد (توکلی‌پور و همکاران ۲۰۱۱). برای داشتن محصولی سالم، عاری از سموم قارچی، شناخت شرایط تولید آفلاتوکسین و روش‌های پیشگیری از تولید آن ضروری است. درجه‌ی حرارت، میزان رطوبت، غلظت اکسیژن، نوع سوبسترا، pH ماده غذائی، اثرات متقابل میکروبی، وجود یا عدم وجود مواد بازدارنده نظیر اسیدهای آلی و صدمات مکانیکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در تولید آفلاتوکسین هستند. بدیهی است با کنترل دقیق عوامل مذکور می توان تا حد زیادی از تشکیل آفلاتوکسین جلوگیری کرد (زینی و همکاران ۲۰۰۴). ازجمله راه های مؤثر برای کنترل مشکلات ناشی از آفلاتوکسین‌ها، جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی سوبستراها[6] می‌باشد (مورنو-مارتینز و همکاران ۲۰۰۰). در نظر گرفتن نقش مهم آسپرژیلوس‌ها در صنعت مواد غذایی، پزشکی، دامپزشکی و گیاه پزشکی، دانستن شرایط مطلوب رشدی این قارچ‌ها بخصوص دو قارچ *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* لازم و ضروری می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر بررسی سه عامل مهم محیطی دما، رطوبت و pH در رشد این دو قارچ و مقایسه رشد آن ها با هم می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند برای

[1] Mycotoxicosis
[2] Gliotoxin
[3] Ochratoxin
[4] Patolin
[5] Citrinin
[6] Substrates

ارائه توصیه های کاربردی برای شرایط محیطی مانع از رشد و تکثیر و درنتیجه تولید توکسین این قارچ و پیامدهای ناشی از آن مفید باشد.

مواد و روش‌ها

ایزوله قارچ *Aspergillus parasiticus* Speare s286 از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و قارچ *Aspergillus flavus* Link از بخش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

از ایزوله های قارچی با استفاده از آب مقطر استریل سوسپانسیون تهیه شد و این سوسپانسیون در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل روی محیط کشت آب – اگار[1] مخطط شد. تک اسپورهای جوانه‌زده بعد از ۱۲ تا ۱۸ ساعت به تشتک پتری و لوله های آزمایش حاوی محیط کشت شیب‌دار PDA انتقال داده شدند. کشت‌های درون لوله و پتری بعد از ۵-۴ روز رشد در محیط انکوباتور، به داخل یخچال با دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد جهت تثبیت و استفاده از کشت مجدد آن‌ها برای انجام آزمایش منتقل شدند (سلما و همکاران ۲۰۰۸).

برای بررسی توکسین‌زا بودن جدایه‌های قارچی، از محیط کشت نارگیل-آگار[2] استفاده شد. برای تهیه این محیط، مقدار ۲۰۰ گرم پودر نارگیل تهیه و در یک لیتر آب جوش ریخته شد، پس از پنج دقیقه و بهم زدن در چند نوبت، زمانی که عصاره نارگیل کاملاً خارج شد، مایع حاصل از چهار لایه پارچه ململ عبور داده شد و ۲۰ گرم آگار به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد در اتوکلاو سترون و به تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری منتقل گردید. پس از رشد جدایه‌ها روی این محیط، تشتک‌ها در زیر نور UV در اتاقک TLC جهت تولید یا عدم تولید افلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند (دیویس و همکاران ۱۹۸۷).

برای اعمال تیمارهای دمایی، قارچ های مورد نظر به پتری‌های حاوی محیط کشت PDA انتقال یافته و در دماهای ۱۸، ۲۲، ۲۵، ۲۸، ۳۱ و ۳۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای تیمار رطوبت بذر، قارچ ها روی بذر ذرت با رطوبت بذری ۱۸، ۲۲، ۲۵، ۲۸ و ۳۱ درصد درون ارلن مایر کشت داده شدند، بدین منظور از قارچ های کشت داده شده، زیرکشت گرفته و به محیط کشت PDA جدید انتقال یافتند. بعد از رشد مجدد قارچ در محیط کشت از کشت‌های ۵-۳ روز، سوسپانسیون اسپوری با غلظت 1×10^6 در آب مقطر تهیه و به بستره ذرت مایه زنی شدند. قبل از مایه زنی، در هر ارلن ۱۰۰ گرم بذر ذرت سالم قرار گرفت و درب هر ارلن با پنبه و فویل آلومینیومی پوشش داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱/۱ اتمسفر در اتوکلاو قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت، مجدداً اتوکلاو گردیدند تا آلودگی احتمالی و اندام های مقاوم آن ها از بین بروند. سوسپانسیون‌های قارچی مورد نظر در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل به ارلن‌های حاوی بذر ذرت انتقال داده شدند و با تکان دادن ارلن، از پخش یکنواخت اسپورها در داخل ذرت اطمینان حاصل شد. برای تعیین رطوبت اولیه و رطوبت‌های مورد نظر، مقدار معینی از نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه‌ی سانتی‌گراد درون آون آزمایشگاهی قرار داده شد (سوتار و داس ۱۹۹۶) و بر اساس روش استاندارد وزنی مقدار رطوبت اولیه بذرها اندازه‌گیری شد و برای به دست آوردن نمونه‌های با رطوبت مشخص، مقدار آب مقطر مورد نیاز طبق رابطه‌ی زیر محاسبه و به نمونه‌ها اضافه شد (محسنین ۱۹۷۰).

$$W_2 = W_1\left(\frac{M_1 - M_2}{100 - M_1}\right) \qquad (۱)$$

در این فرمول، W_2؛ جرم آب مقطر (گرم)، W_1؛ جرم نمونه (گرم)، M_1؛ میزان رطوبت نهایی و M_2؛ میزان رطوبت اولیه می‌باشد.

برای اعمال تیمار pH، از محیط کشت PDA در پتری استفاده شد، pH محیط کشت با استفاده از KCl و NaOH روی pHهای ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ تنظیم شدند. همچنین برای

[1] Water-agar
[2] Coconut-agar

اندازه‌گیری وزن قارچ رشد کرده در تیمار رطوبتی، بعد از ۷ روز رشد قارچ، محتویات ارلن‌ها درون ظروف مناسب تخلیه گردید و در آون با دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و وزن آن‌ها محاسبه گردید. با توجه به اندازه‌گیری وزن خشک ذرت‌ها قبل از تلقیح قارچ به آن‌ها با استفاده از فرمول زیر وزن خشک قارچی هر تیمار محاسبه گردید (پاندی و همکاران ۱۹۸۲).

$$Ws=Wt-(Wd+Ww) \qquad (۲)$$

در این فرمول Ws: وزن خشک میسلیوم قارچ در مورد کشت روی بستره ذرت، wt: وزن خشک کل محتویات ارلن بعد از اتمام دوره کشت و wd: وزن خشک بذر ذرت قبل از مایه زنی قارچ بود.

برای اندازه‌گیری میزان رشد در دو تیمار دمایی و pH، بعد از کامل شدن رشد قارچ‌ها در محیط PDA قطر کلونی‌های قارچی روزانه اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد. هرکدام از سه تیمار دمایی، رطوبت و pH در چهار تکرار و در شرایط ۱۲ ساعت نور در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت، دادهای به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه وتحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن[1] در سطح احتمال یک درصد انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

اندازه گیری وزن میسلیوم قارچ در محیط کشت PDA برای اعمال فاکتور دما و PDB برای pH و بستره ذرت (شکل ۱) نشان داد: هر دو قارچ در رطوبت ۲۴ و ۲۷ درصد بیشترین میانگین وزنی دارند. در این رطوبت‌ها میانگین وزنی برای قارچ *A. parasiticus* به ترتیب ۱/۳۹ و ۱/۴۱ گرم و برای قارچ *A. flavus* به ترتیب ۱/۴۰ و ۱/۴۳ گرم می‌باشد و این رطوبت‌ها با دیگر تیمارهای رطوبتی در سطح یک درصد آماری تفاوت معنی‌داری نشان داد و هر دو قارچ در رطوبت ۱۵ و ۱۸ درصد کمترین میزان رشد را داشتند (شکل ۲ و جدول ۱).

نتایج بررسی‌های این آزمایش روی pH نشان داد قارچ *A. parasiticus* در pH=۵ با میانگین رشدی ۳/۵۷ گرم وزن خشک میسلیوم قارچی بهترین رشد را دارد و نسبت به تیمار pH ۳ و ۴ (که رشد کمتری داشتند) تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد آماری نشان داد. بهترین رشد را بعد از pH =۵، pH های ۶ و ۷ نشان دادند که از این نظر با pH=۵ تفاوت معنی‌داری ایجاد نکردند. تأثیر pH روی *A. flavus* نشان داد این قارچ در pH=۶ با میانگین رشدی ۳/۳۵ گرم وزن خشک میسلیوم قارچی بهترین رشد را نشان می‌دهد که با pH های ۳ و ۴ تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد ولی با pH=۷ تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۳ و جدول ۲).

همچنین نتایج در مورد تأثیر دما روی این دو قارچ نشان داد قارچ *A. parasiticus* به ترتیب در دماهای ۳۱ و ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد مناسب و قوی‌تری از خود نشان داد و نسبت به بقیه تیمارها این تفاوت رشدی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود و دو دمای ۱۸ و ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد کمترین رشد را داشتند. قارچ *A. flavus* در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشترین رشد و در دمای ۱۸ درجه‌ی سانتی‌گراد کمترین رشد را دارد (شکل ۴ و جدول ۳). بررسی توکسین‌زایی قارچ‌ها، توانایی توکسین‌زایی دو قارچ را به اثبات رساند. با توجه به اینکه افلاتوکسین درزیر نور UV قابلیت فلورسانس[2] دارد از این خاصیت برای مشخص شدن توکسین‌زایی قارچ استفاده شد و بعد از کشت قارچ روی محیط نارگیل آگار، هر دو قارچ خاصیت فلورسانس را از خود نشان دادند (شکل ۵).

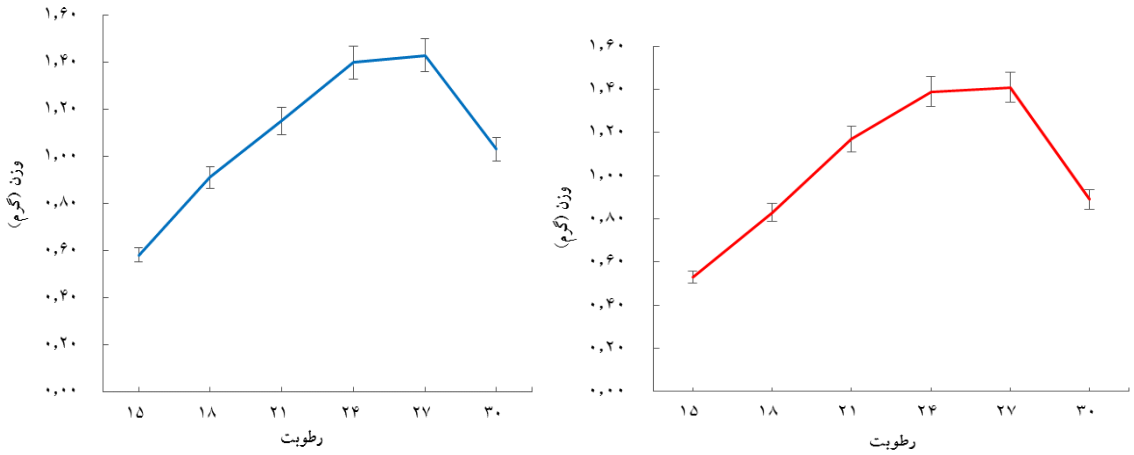
حمله‌ی قارچی و تولید آفلاتوکسین در غذا ممکن است در طول مدت قبل از برداشت محصول و یا بعد از آن در سطح مزرعه، در طول مدت ذخیره، حمل‌ونقل و در جریان فرآوری مواد خوراکی صورت پذیرد که سبب کاهش ارزش غذایی مواد خوراکی می‌گردد. قارچ‌های آسپرژیلوس ازجمله قارچ‌هایی است که در حین مراحل مختلف فرآوری مواد غذایی فعالیت دارد و با تولید افلاتوکسین خطر جدی

[1]Duncan

[2]Fluorescence

برای سلامت انسان می‌باشد سه عامل مهم یعنی رطوبت و pH بذر و همچنین دما روی رشد این قارچ و تولید افلاتوکسین نقش بسزایی دارد لذا در این پژوهش به

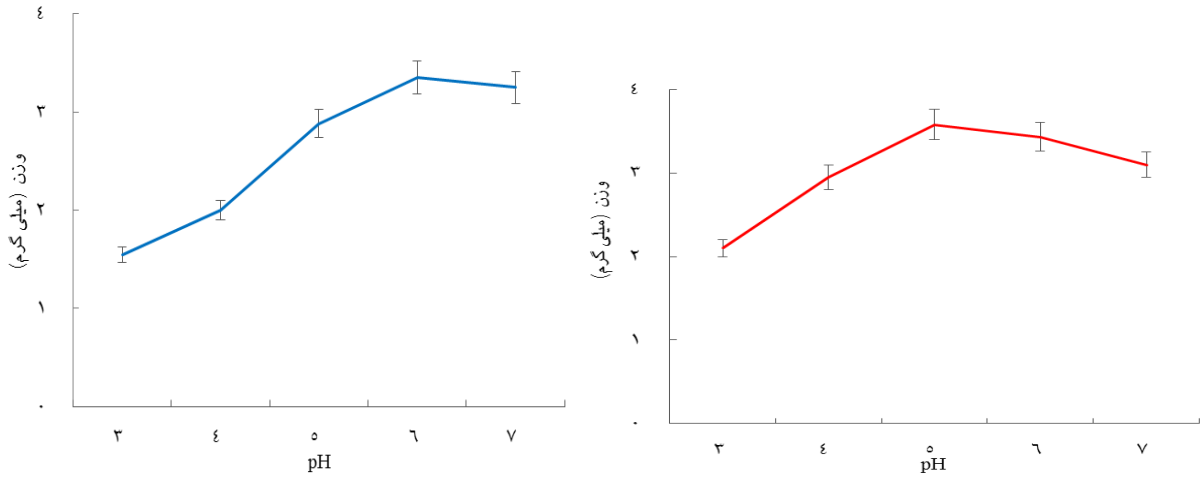
شکل ۱- رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* روی بذر ذرت در رطوبت‌های ۲۵ درصد (a) و ۱۵ درصد (b).



شکل ۲- تاثیر درصد رطوبت بذر روی رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* (سمت راست) و *Aspergillus flavus* (سمت چپ).

جدول ۱- میانگین وزنی دو گونه از قارچهای جنس *Aspergillus* (گرم) در رطوبت‌های مختلف بذر ذرت.

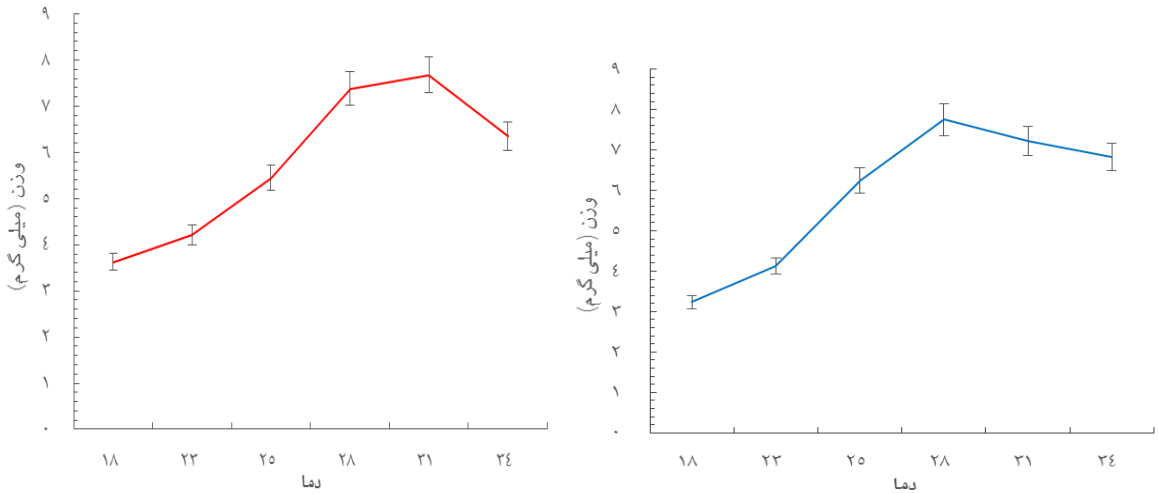
میزان رطوبت (٪)	*A. parasiticus*	*A. flavus*
۱۵	۰/۵۳[c]	۰/۵۸[d]
۱۸	۰/۸۳[c]	۰/۹۱[d]
۲۱	۱/۱۷[b]	۱/۱۵[cb]
۲۴	۱/۳۹[a]	۱/۴۰[a]
۲۷	۱/۴۱[a]	۱/۴۳[ab]
۳۰	۰/۸۹[b]	۱/۰۳[c]



شکل ۳- تاثیر اسیدیته روی رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* **(سمت راست) و** *Aspergillus flavus* **(سمت چپ).**

جدول ۲- میانگین وزنی دو گونه از قارچ‌های جنس *Aspergillus* (گرم) در pH های مختلف.

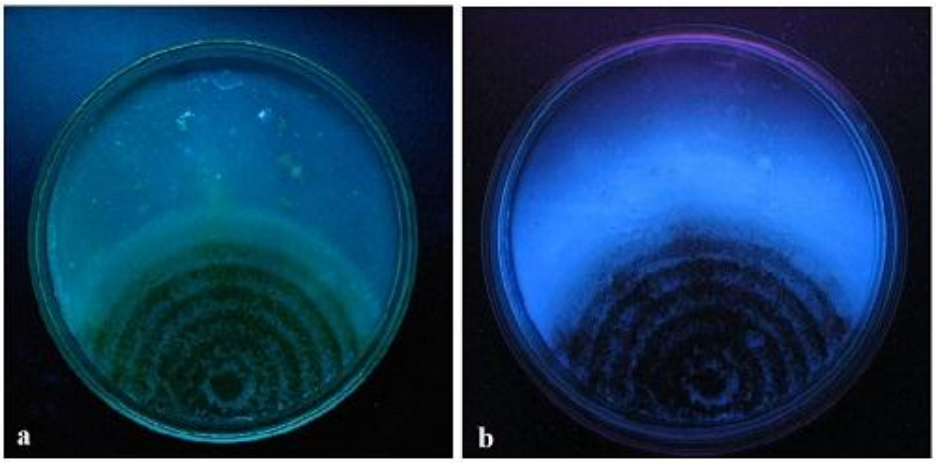
میزان pH	*A. parasiticus*	*A.flavus*
۳	۱/۵۰[c]	۱/۵۵[c]
۴	۲/۹۵[b]	۲/۰۰[b]
۵	۳/۵۷[a]	۲/۸۸[ab]
۶	۳/۴۳[a]	۳/۳۵[a]
۷	۳/۱۰[ab]	۳/۲۵[a]



شکل ۴- تاثیر دماهای مختلف روی رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* **(سمت راست) و** *Aspergillus flavus* **(سمت چپ).**

جدول ۳- میانگین وزنی دو گونه از قارچ‌های جنس ***Aspergillus*** (گرم) در دماهای‌های مختلف بذر ذرت.

دما (°C)	*A. parasiticus*	*A.flavus*
۱۸	۳/۶۲^{d}	۳/۲۴^{c}
۲۳	۴/۲۱^{d}	۴/۱۳^{c}
۲۵	۵/۴۵^{c}	۶/۲۵^{b}
۲۸	۷/۳۸^{ab}	۷/۷۵^{a}
۳۱	۷/۶۸^{a}	۷/۲۳^{ab}
۳۴	۶/۳۵^{bc}	۶/۸۳^{ab}



شکل ۵- فلورسانس آفلاتوکسین روی محیط کشت نارگیل - آگار در زیر نور **UV**: **a**) قارچ *Aspergillus parasiticus* در زیر نور معمولی **b**) قارچ *Aspergillus parasiticus* در زیر نور **UV**.

بررسی این سه عامل محیطی روی رشد دو قارچ مهم از گروه آسپرژیلوس‌ها، *A. flavus* و *A. parasiticus* پرداخته شده است. طبق نتایج به دست آمده می‌توان اظهار داشت که سطح بین دو نمودار (درصد بازدارندگی از رشد و وزن خشک قارچ) بیانگر رشد بهینه قارچ می‌باشد و مشخص گردید این دو قارچ دماهای نزدیک به ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد را بیشتر می پسندند. همچنین محدوده‌ی رشد دمایی قارچ *A. parasiticus* کمی بالاتر از قارچ *A. flavus* می‌باشد. بهینه رشد این قارچ را می‌توان محدوده‌ی دمایی ۲۸ تا ۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد دانست و در این مورد بهینه رشد دمایی در مورد قارچ *A. flavus* در محدوده ۲۷ تا ۳۱ درجه‌ی سانتی‌گراد می باشد. هر دو قارچ مورد نظر در دماهای پایین رشد بسیار پایینی از خود نشان دادند. رشد قارچ روی محیط کشت PDA به صورت ریسه ای بود و در دمای بالاتر از بهینه رشد، کلنی قارچ ضعیف و کم رشدتر شدند. زینی و همکاران (۲۰۰۴) گزارش دادند که بهترین شرایط برای رشد و تولید مایکوتوکسین در این قارچ‌ها، دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۸۵٪ درصد است. در پژوهش‌های دیگر، بهترین دمای بکار برده شده برای رشد دو قارچ *A. parasiticus* و *A. flavus* دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (هولمکویست و همکاران ۱۹۸۳). همچنین بررسی‌شده که قارچ *A. parasiticus* در محدوده‌ی دمایی ۲۵ تا ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین رشد و در همین محدوده هم بهترین توکسین زایی را دارد و در ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین رشد را نشان داده است (شی و مارت ۱۹۷۴). همچنین طبق

بررسی تاثیر pH روی این دو قارچ مشخص گردید که قارچ *A. parasiticus* در محدوده‌ی pH ۴/۸ تا ۶ رشد مناسبی دارد و حداکثر رشد در pH =۵ می‌باشد ولی قارچ *A. flavus* در محدوده‌ی pH ۵/۷ تا ۷ بهینه رشد و حداکثر رشد را در pH=۶ دارد این بررسی نشان می‌دهد که هر دو قارچ در محدوده‌ی pH خنثی و متمایل به اسیدی رشد بهتری دارند ولی قارچ *A. parasiticus* شرایط اسیدی را کمی بهتر تحمل می‌کند. که با نتایج سیبون اوونگ و همکاران (۲۰۰۹) و ابوبکر و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. شی و مارت (۱۹۷۴) و هلمکوست و همکاران (۱۹۸۳) بیان داشتند قارچ *A. parasiticus* در pH=۵ بیشترین و در pH=۱۰ کمترین اسپورزایی را دارد و همچنین قارچ مذکور در pH=۴ بیشترین وزن خشک را دارد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. کاترین و همکاران (۱۹۹۱) بیان داشتند گونه‌های قارچ *A. parasiticus* و *A. flavus* بسیار بهم نزدیک هستند و نرخ رشد مشابه در طول محدوده‌ی pH ۲ تا ۱۱ نشان می‌دهند و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قارچ *A. parasiticus* نسبت به pH پایین‌تر از *A. flavus* مقاوم‌تر بود که با نتایجی که در این آزمایش به دست آمده مطابقت دارد. همچنین سیبون اوونگ و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده‌اند که برای کنیدی‌زایی قارچ آسپرژیلوس، pH ۵ تا ۸ و برای ریسه زایی آن pH ۵ تا ۷ لازم است. مطالعات دیگری روی pH مشخص کرده است که رشد قارچ‌ها در محدوده‌ی pH ۳ تا ۸ می‌باشد و حداکثر وزن خشک و اسپوردهی در pH ۵/۵ تا ۶/۵ در محیط مایه می‌باشد (ساها و همکاران ۲۰۰۸). طبق گزارش‌های دشموخ و همکاران (۲۰۱۲) مشخص گردید این دو قارچ در محدوده‌ی pH ۶/۵ تا ۱۱ فعالیت دارند. همچنین بوکنان و آیرس (۱۹۷۵) نشان دادند که رشد بهینه قارچ *A. parasiticus* در pH ۵ رخ می دهد. طبق نتایجی که در مورد رطوبت بذر در مورد این قارچ در این آزمایش به دست آمد، مشخص گردید در شرایطی که رطوبت بذر ۲۵ تا ۲۷ درصد باشد، فعالیت رشدی این قارچ بیشتر و قوی‌تر می‌شود و افزایش رطوبت در بذر منجر به تقویت رشد و نمو قارچی می شود. همچنین در آزمایشی دیگر نشان داده شد که در pH ۵ و ۰/۹۹ آب فعال و ۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، قارچ *A. flavus* و *A. parasiticus* بیشترین رشد را از خود نشان می‌دهند (همسا و آیریس ۱۹۷۷). دانش و همکاران (۱۹۷۹) ارتباط بین داده‌های هواشناسی، آلودگی پسته به آفلاتوکسین و درصد محموله‌های بازگردانده شده پسته صادراتی ایران در طی سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۷۴ را بررسی کردند. در این بررسی ارتباط مثبتی بین تعداد روزهای ابری از مرداد تا آبان ماه با تعداد محموله‌های آلوده مرتبط با آن مشاهده گردید. در این آزمایش هر دو قارچ موجود توکسین زا بودند که توکسین‌زایی آن‌ها در محیط کشت نارگیل آگار از طریق اندازه گیری میزان فلورسانس مشخص گردید. فلورسانس به دلیل ماهیت طبیعی آفلاتوکسین‌ها می‌باشد، فلورسانس طبیعی آفلاتوکسین ها ناشی از ساختار حلقوی پنتاهیدروسیکلیک اکسیژنه آن‌ها می‌باشد. حضور ترکیباتی در محیط کشت، سبب تحریک خاصیت فلورسانس گشته و در گسترش و روش‌های شناسایی این ترکیبات کمک می‌نماید (ایاماناکا و همکاران ۲۰۰۷). نتایج به دست آمده از نمونه‌های مورد مطالعه با نتایج محققانی چون دیویس و همکاران (۱۹۸۷) و میلانز و همکاران (۲۰۰۲) که از محیط کشت نارگیل آگار جهت شناسایی سریع آفلاتوکسین تولیدشده توسط نژادهای مختلف آسپرژیلوس استفاده کردند، مطابقت داشتند. در این تحقیقات، ایزوله هایی که تولید نور فلورسانس آبی یا آبی سبز اطراف کلونی ها کردند، تحت عنوان آفلاتوکسین مثبت در نظر گرفته شدند. قارچ‌های *A. parasiticus* و *A. flavus* در شرایط گرمسیری و نیمه گرمسیری پتانسیل رشدی بهتری از خود نشان می‌دهند و توصیه می‌شود موادغذایی انبار شده، در شرایط رطوبتی و گرما قرار نگیرد تا از توسعه و گسترش این قارچ جلوگیری به عمل آید و توصیه می‌شود تاثیر این عوامل روی توکسین‌زایی قارچ بررسی شود.

منابع

Abubakar A, Suberu HA, Bello IM, Abdulkadir R, Daudu OA and Lateef AA, 2013. Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. Journal of Plant Sciences 1(4): 64-67.

Bodey GP and Vartivarians S, 1989. Aspergillosis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 8: 413-437.

Buchanan RL and Ayres JC, 1975. Effect of pH on aflatoran production. Journal of Applied Microbiology 30: 1050-1051.

Danesh D, Mojtahedi H, Barnett R and Cambell A, 1979. Correlation between climatic data and aflatoxin contamination of Iranian pistachio nuts. Journal of Phytopathology 69: 715-716.

Dantigny P, Guilmart A and Bensoussan M, 2005. Basis of predictive mycology. International Journal of Food Microbiology 100: 187-196.

Davis ND, Iyer SK and Diener UL, 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. Applied and Environmental Microbiology 53(7): 1593-1595.

Deshmukh AJ, Mehta BP, Sabalpara AN and Patil VA, 2012. In vitro effect of various nitrogen, carbon sources and pH regimes on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc causing anthracnose of Indian bean. Journal of Biopesticides 5: 46-49.

Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS and Klich MA, 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology 25: 249.

Hamsa TAP and Ayres JC, 1977. A differential medium for the isolation of *Aspergillus flavus* from cotton seed. Journal Food Microbiology 42: 449-453.

Hesseltine CW, 1965. A millennium of fungi. Food and fermentation. Mycologia; 57: 149-197.

Holmquist GU, Walker HW and Stahr HM, 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. International Journal of Food Microbiology 48: 778–782.

Iamanaka BT, Menezes HC, Vicente E, Leite RSF and Taniwaki, MH, 2007. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. Journal Food Contorol 18: 454-457.

Kamei K and Watanabe A, 2005. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. Medical Mycology 43: 95-99.

Kathryn A, Wheeler-Beverly F and Pitt JI, 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Journal Food Microbiology 12:141-150.

Milanez VT, Schoenlein-Crusius IH and Okino LK, 2002. Evaluation of Brazilian terrestrial *Aspergillus* strains for mycotoxin production. Rev Inst Adolfo Lutz journal 61(1):7-11.

Mohsenin NN, 1970. Physical properties of plant and animal materials. New York. Springer 8: 563.

Moreno-Martinez E, Vazquez-Badillo M and Facio-Parra F, 2000. Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stored grains of maize. Journal of Agro Crop Science 34: 477-84.

Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO and Frisvad JC, 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Analytical and Bioanalytical Chemistry 395(5): 1225-42.

Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD, Dixit SN, 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of Hyptis suaveolens/Fungitoxische und phytotoxische Eigenschaften des ätherischen Öis von *Hyptis suaveolens*. Zeitschrift fur Pflanzenkraneaten and Pflanzenschutz. International Journal of Food Microbiology 89: 344-349.

Pitt JI and Hocking AD, 1997. Fungi and Food Spoilage. 2th ed: New York. Springer.

Plaza P, Usall J, Teixidó N and Vi-nas I, 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. Journal of Applied Microbiology 94: 549-554.

Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yashinari T, Rezaee MB, Jaimand K, Nagasawa H and Sakudac S, 2008. Essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* inhibitory effects of *Satureja hortensis*. Journal of Food Microbiology 123: 228-233.

Saha A, Mandal P, Dasgupta S and Saha D, 2008. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae*. Journal of Environmental Biology 29(3): 407-410.

Selma MV, Martínez-Culebras PV and Aznar A, 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. International Journal of Food Microbiology 122: 126–134.

Shih CN and Marth EH, 1974. Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus.* International Journal of Food Microbiology 36: 53-70.

Sibounnavoung P, Kalaw SP, Divina CC and Soytong K, 2009. Mycelial growth and sporulation of *Emericella nidulans*, a new fungal antagonist on two culture media. Journal of Agricultural Science and Technology 5(2): 317-324.

Smith JE, 1993. *Aspergillus*. University of Strathclyde Glasgow. Springer Series in Biophysics 34: 25-40.

Strange RN and Scott PRA, 2005. Threat to global food security. Annual Review Phytopathology 43: 83-116.

Suthar SH and Das SK, 1996. Some physical properties of karingda [*Citrus lanatus* (thumb) mansf] seeds. Journal of Agricultural Research 65(1): 15–22.

Sweeney MJ and Dobson ADW, 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International Journal of Food Microbiology 43: 141–158.

Thanaboripat D, 2011. Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. Science and Technology Journal 11: 1 – 35.

Zeini F, Mahbod ASA and Emami M, 2004. Comprehensive medical mycology. Medical Mycology 2: 147-177.

Tavakolipour H, Javanmard Dakheli M and Zirjany L. 2011. Inhibitory effect of coated pistachio kernel based in whey protein concentrate (WPC) and thyme essential oil on aflatoxin production. Journal of Innovation in Food Science and Technology 2(3): 53-63.

Comparison of Growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Different Conditions of Temperature, Moisture and pH

M Moosavian[1], M Darvishnia[2*] and HA Khosravinia[3]

[1]Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran.
[3]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran.
[*]Corresponding author: mdarvishnia44@yahoo.com

Received: 5 Jun 2014 Accepted: 26 Oct 2016

Abstract

Aspergillus parasiticus and *Aspergillus flavus* are the most important agents for contamination of food and are capable of production of carcinogenic toxins. Increasing awareness of optimal growth conditions helps to control and prevent the contamination and toxicity of these fungi. This experiment was conducted in order to study the effect of temperature, pH and seed moisture content on the growth of these fungi. The effect of corn seed moisture, at levels 15, 18, 21, 24, 27 and 30 percent on corn, and temperature, at level 18, 22, 25, 28, 31 and 34 °C, in PDA medium and the effect of pH at level 3, 4, 5, 6 and 7 in PDB medium were investigated on the growth of these two fungi. The growth rate of fungi and dry weight of mycelium fungi in different treatments was evaluated in a completely randomized design in four repetitions. Statistical analysis was performed by using SAS 9.1 software. Also, to determine the presence of toxins in fungi was used of coconut–agar medium. The results showed that the optimum growth conditions are for *A. parasiticus* at 31°C, pH= 5 and seed moisture content of 27% and for *A. flavus* at 28°C, pH=6 and seed moisture content of 27%. It was also found, both fungal have the ability to produce aflatoxin. According to the results of this research can be concluded that *A. parasiticus* and *A. flavus* have the better grow in tropical and subtropical regions and decrease moisture content, low temperatures and cool in stock can play an effective role in preventing the growth of these fungi and in reducing their toxin production consequently.

Keywords: Acidity, Aflatoxin, *Aspergillus*, Moisture, Temperature.