دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵ (ص ۶۰-۵۱) DOI: 10.22059/ijpps.2016.59289

بررسی میزان آلودگی خوراک پرندگان به قارچ *Aspergillus* در برخی استان‌های کشور

زهره هنرجو[۱]، ابراهیم صداقتی[۲*]، حسین علایی[۲] و پژمان خدایگان[۲]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیاران، گروه گیاهپزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۱)

چکیده

به‌منظور ایجاد یک برنامهٔ کلی کنترل و پیشگیری از آلودگی قارچی در مراحل مختلف برداشت، حمل‌ونقل و انبارداری، پوده‌رست یا تعیین مایکوفلور و فراوانی قارچ‌های گندرو (ساپروفیت) در محصولات کشاورزی مورداستفاده در جیرهٔ غذایی پرندگان اهمیت دارد. بیشتر گونه‌های قارچ آسپرژیلوس در دمای محیط به‌خوبی رشد می‌کنند و در بیشتر مواد غذایی، آلودگی بالقوه به این قارچ و زهرابه‌های آن وجود دارد. شناسایی گونه‌ها برای پیشگیری از آلودگی زهرابه‌ای (توکسینی) جیرهٔ غذایی ضروری است. بدین منظور ۴۹ نمونه از جیرهٔ غذایی پرمصرف پرندگان شامل شاهدانه، خرفه، ذرت، سورگوم، کتان، ذرت ایتالیایی، ارزن، گندم، دان مخلوط و سبوس برنج، پیش‌دان، رشد دانه و پایان‌دان از فروشگاه‌های توزیع خوراک پرندگان در استان‌های یزد، لرستان، مازندران، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، خراسان‌رضوی، فارس و کرمان تهیه و میزان آلودگی آن‌ها به قارچ آسپرژیلوس بررسی شد. جداسازی قارچ به روش‌های کشت مستقیم و سری رقت روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار و کاغذ صافی سترون (استریل) مرطوب انجام شد. در این پژوهش، ۱۷۵ جدایه از جنس آسپرژیلوس به دست آمد و گونه‌های *Aspergillus japonicus*، *A. tubingensis*، *A. flavus*، *A. fumigatus*، *A. tamarii*، *A. ochraceus*، *A. parasiticus* و *A. terreus* بر پایهٔ ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی شد. نتایج نشان داد که قارچ آسپرژیلوس با هر سه روش مورداستفاده و از همهٔ نمونه‌ها جداسازی شد، اما روش کاغذ صافی مرطوب نتایج بسیار بهتری نسبت به دو روش دیگر داشت. گونهٔ *A. flavus* به‌عنوان گونهٔ غالب شناخته شد و جیره‌های غذایی گردآوری‌شده از نمونه‌های شهرستان رفسنجان بیشترین درصد آلودگی به آسپرژیلوس را داشتند.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، ایران، جیرهٔ غذایی پرندگان، قارچ‌های زهرابه‌زا.

Evaluation of *Aspergillus* contamination of poultry diets in some provinces of Iran

Zohreh Honarjoo[1], Ebrahim Sedaghati[2*], Hossein Alaei[2] and Pejman Khodaygan[2]
1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
(Received: Nov. 29, 2015 - Accepted: Apr. 30, 2016)

ABSTRACT

Determining the prevalence of saprophyte fungi in agricultural products and processed foods used in the poultry diet is important. These studies lead to an overall control plan and prevention of fungal infection in different stages of harvesting, transportation and storage. Most of *Aspergillus* species grow at ambient temperature. Some species can produce toxins in the diet of birds; thus, species identification is necessary to evaluate the mycotoxins contamination. For this purpose, 49 samples of poultry diets, including cannabis, purslane, corn, sorghum, cotton, corn, Italian millet, wheat, mixed grains, rice bran, Starter, Growth and Finisher were collected from Yazd, Lorestan, Mazandaran, East Azarbaijan, West Azarbaijan, Ardabil, Khorasan Razavi, Fars and Kerman provinces. *Aspergillus* contamination was investigated using the direct culture on potato dextrose agar, moist sterile filter paper and serial dilutiom methods. Appoximately, 175 isolates of the *Aspergillus* were isolated. Based on morphological characteristics, *A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* and *A. terreus* were identified. The wet filter paper method had higher efficiency in recovery and isolation of *Aspergillus* species. *Aspergillus flavus* was determined as the dominant species and Rafsanjan as the most contaminated region.

Keywords: *Aspergillus*, Iran, mycotoxigenic fungi, poultry diets.

* Corresponding author E-mail: sedaghatiebrahim@yahoo.com Tel: +98 913 3913913

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بر پایهٔ اطلاعات سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (فائو)[1]، سالانه حدود ۲۵ درصد از محصولات زراعی در سراسر جهان در معرض آلودگی به زهرابه‌های قارچی قرار می‌گیرند (FAO, 2004). بخش عمده‌ای از خوراک انسان، دام و طیور از غلات و دانه‌های روغنی و فرآورده های آن‌ها تشکیل می‌شود. آلوده بودن آن‌ها به قارچزهر (مایکوتوکسین)ها می‌تواند اثرگذاری نامطلوبی را از نظر ایمنی برای تولیدکنندگان محصولات زراعی و پرورش‌دهندگان دام و طیور، بازرگانان، تولیدکنندگان مواد غذایی انسان و خوراک دام و طیور، مصرف‌کنندگان سراسر جهان و در نهایت اقتصاد کشورها در پی داشته باشد (Ranjbar *et al*., 2011). گونه‌های آسپرژیلوس اغلب ریزجاندارانی (میکروارگانیسم‌هایی) فرصت‌طلب هستند که با رشد پوده‌رستی (ساپروفیتی) روی مواد، باعث فساد آن‌ها می‌شوند. این قارچها در دمای محیط به‌خوبی رشد می‌کنند. وجود محدود برخی از گونه‌های آسپرژیلوس در جیره‌های غذایی، طبیعی بوده و در صورت رشد نکردن بی‌رویه، خطرهای بهداشتی به دنبال ندارند ولی برخی از گونه‌ها زهرابه (توکسین)زا هستند و این زهرابه‌ها در بسیاری از محصولات کشاورزی تولید شده و در برابر آسیاب کردن و مراحل آماده‌سازی و فرآوری هم مقاوم هستند (Talakesh, 2003). این نوع ترکیب‌ها باعث ایجاد قارچزهر زایی (مایکوتوکسیکوزیس) حاد یا مزمن در پرندگان و دام‌ها شده و در انسان نیز آلودگی به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم در اثر مصرف فرآورده‌های دامی ایجاد می‌شود (Rippon, 1988; Mahdizade *et al*., 2007). زهرابه‌زایی یکی از مهم‌ترین دلایل اهمیت این قارچ در کشاورزی و صنعت به شمار می‌آید. حضور زهرابه‌ها در مواد غذایی وابسته به گونهٔ آسپرژیلوس، نوع محصولات غذایی آلوده، عامل‌های محیطی و میزبان است (Bozorgmehri Fard, 2006).

چندین نوع زهرابهٔ قارچی توسط گونه‌های آسپرژیلوس تولید می‌شود که از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین آن‌ها آفلاتوکسین، اکراتوکسین و پاتولین هستند (Varga *et al*., 2003; Abbas *et al*., 2005).

واژهٔ قارچزهر نخستین بار در سال ۱۹۶۲ میلادی پس‌ازاینکه حدود صد هزار بوقلمون در انگلیس در اثر یک بیماری ناشناخته از بین رفتند، رواج یافت. این بیماری ناشی از سم تولیدشده توسط *A. flavus* Link روی خوراک پرندگان، ایجاد شد (Goldblatt, 1969). برخی از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس در شرایط مناسب می‌توانند آفلاتوکسین‌ها تولید کنند و در بین گونه‌های مختلف، *A. flavus* و *A. parasiticus* Speare از مهم‌ترین تولیدکنندگان این زهرابه هستند. این زهرابه، بالاترین میزان سمیت را دارد که منجر به تضعیف سامانهٔ ایمنی پرنده‌ها می‌شود و آن‌ها را نسبت به دیگر عفونت‌ها حساس‌تر می‌سازد (Azzam & Gabal, 1997). گونه‌های آسپرژیلوس به‌عنوان قارچ‌های ایجادکنندهٔ زهرابه در خوراک ماکیان و حیوانات اهلی شناخته شده‌اند (Mehan & Chohan, 1973). زهرابه‌های تولیدشده توسط آسپرژیلوس‌ها می توانند به‌صورت مستقیم باعث ایجاد بیماری در دام و پرنده شوند یا می‌توانند با کاهش فعالیت نظام ایمنی، دام و طیور را نسبت به عامل‌های بیماریزا حساس کنند و یا از راه وارد شدن به چرخهٔ غذایی انسان از راه شیر، گوشت و تخم‌مرغ، باعث ایجاد خطر برای سلامت انسان شوند. آسپرژیلوز از بیماری‌های مهم پرندگان است که می‌تواند دستگاه تنفس، اندام‌های احشایی و مغز را درگیر کند (Mayahi *et al*., 2007). گونه‌های *A. flavus*، *A. niger* Tiegh، *A. terreus* Thom، *A. glaucus* Link و *A. fumigatus* Fresen از عامل‌های اصلی ایجاد این بیماری هستند (Bozorgmehri Fard, 2006). در بررسی عامل‌های قارچی زهرابه‌زا و غیر زهرابه‌زا از جیرهٔ غذایی دام شامل ذرت، جو، سبوس، کنجالهٔ سویا، پنبه‌دانه، گلوتن، پودر چربی، کنجالهٔ کلزا، تفالهٔ خشک و تر چغندر و یونجه، قارچ‌های *A. flavus*، *A. fumigatus* و جداسازی شده است (Khosravi *et al*., 2003). از ۵۰ نمونه خوراک کنسانترهٔ طیور در ونزوئلا، گونه‌های *A. flavus*، *A. terreus*، *A. niger*، *A. ochraceus* Wilh و *A. clavats* Desm را جداسازی و شناسایی شد (Figueroa *et al*., 2009). از خوراک کنسانترهٔ طیور در نیجریه گونه‌های *A. flavus*، *A. fumigatus*،

1. Food and Agriculture Organization

Archive of SID

www.SID.ir

A. nidulans (Eidam) G. Winter، *A. melleus* Yukawa، *A. niger*، *A. parasiticus*، *A.ochraceus*، *A. flaviceps* Thom & Church، *Alternaria spp* و *Penicillium* جداسازی شد (Ariyo & Anthony, 2013). از ۵۰ نمونه خوراک پرندهٔ خریداری‌شده از فروشگاه‌ها در جنوب غربی نیجریه، گونه‌های *A. flavus*، *A. parasiticus*، *A. niger*، *A. terreus* و *A. oryzae* جداسازی و شناسایی شد (Oluwafemi & Kehinde, 2009). از نمونه‌های ذرت، پودرماهی، کنجالهٔ سویا و سبوس گندم گونه‌های *A. flavus*، *A. fumigatus*، *A. ochraceus* و *A. terreus* شناسایی شده است (Mahmoud, 1993). قارچ‌های *Fusarium* (Link)، *Scopulariopsis* (Bainier)، *Penicillium* (Link)، *A. fumigatus* و *A. terreus* از خوراک و بستر طیور جداسازی شده‌اند (Lovett, 1972). نتایج بررسی آلودگی خوراک طیور به قارچ‌های تولیدکنندهٔ اکراتوکسین نشان داد که عامل اصلی آلودگی خوراک طیور به کراتوکسین *A. niger* و *A. ochraceus* است (Saleemi *et al*., 2012). بررسی جیرهٔ غذایی مشترک انسان، دام و طیور مانند ذرت، گندم، سبوس گندم به لحاظ آلودگی به قارچ‌های زهرابه‌زا، نشان داد گونه‌های *A. oryzae*، *A. flavus*، *A. parasiticus*، *A. tamarii* Cohn، *Fusarium moniliforme* Sheld و *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. Vuill. عامل‌های اصلی آلودگی هستند (Mngadi *et al*., 2008). در طول سالیان از روش‌های مختلف ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و ویژگی‌های پرگنهٔ قارچ در محیط‌های مختلف کشت (Raper & Fennel, 1965; Klich, 2002)، الگوی متابولیت‌های ثانویهٔ تولیدشده توسط گونه‌های مختلف (Frisvad *et al*., 2008)، نشانگر (مارکر)های مولکولی (Healy *et al*., 2004) و آرایه‌بندی (تاکسونومی) تبارزایی (فیلوژنتیکی) بر پایهٔ نواحی مختلف ژنگان (ژنوم) از جمله ITS، b-tubulin و calmodulin (Geiser *et al*., 2008) و روش‌های چندگانه (Peterson *et al*., 2008) در شناسایی و تمایز گونه‌های جنس آسپرژیلوس استفاده شده است. این پژوهش به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی جیرهٔ غذایی پرندگان به قارچ آسپرژیلوس در برخی مناطق کشور انجام شد.

مواد و روش‌ها

شمار ۴۹ نمونه از جیرهٔ غذایی پرمصرف و رایج پرندگان شامل شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)، خرفه (*Portulaca oleracea* L.)، ذرت (*Zea mays* L.)، سورگوم (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)، کتان (*Linum usitatissimum* L.)، ذرت ایتالیایی (*Setaria italica* (L.) P.Beauv.)، ارزن (*Panucum miliaceum* L.)، گندم (*Triticua aestivum* L.)، قره‌ماش (*Vigna radiataradiate* (L.) R.Wilczek)، گاودانه (*Vicia ervilia* Link)، عدس (*Lens culinaris* Medik.) و سبوس برنج (Rice bran)، استارتر (Starter)، رشد دانه (Grain growth) و پایان‌دان (Finisher) در پاییز ۹۰ تا بهار ۹۱ از فروشگاه‌های تهیه‌وتوزیع خوراک پرندگان واقع در استان‌های یزد، لرستان، مازندران، آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، اردبیل، خراسان رضوی، فارس و کرمان تهیه شد. نمونه‌های گردآوری‌شده به‌منظور بررسی میزان آلودگی آن‌ها به قارچ آسپرژیلوس به آزمایشگاه منتقل شد (جدول ۱).

به‌منظور جداسازی جدایه‌های آسپرژیلوس از نمونه‌های خوراک پرندگان از سه روش زیر استفاده شد، ۱- محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)[1]: در این روش نمونه‌ها روی محیط کشت PDA گذاشته و به مدت ۳ تا ۴ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای خالص‌سازی از روش تک راس (single head) استفاده شد. در این روش سر کنیدیومی منفرد در پرگنه‌ها با خراش یک سوزن سترون (استریل) برداشته و روی محیط کشت PDA کشت شد. ۲- کاغذصافی مرطوب: در این روش از کاغذ صافی سترون که با آب-گلیسیرین ۱۰ درصد سترون، مرطوب و در کف تشتک پتری پهن شده بود، استفاده شد. نمونه‌ها بدون ضدعفونی روی کاغذصافی قرار گرفتند و تشتک‌های پتری در اتاقک رشد (انکوباتور) با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. به مدت دو هفته تشتک‌های پتری روزانه زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند. به‌طورمعمول پس از دو هفته پرگنه‌های قارچی ظاهر می‌شدند. از روش سر کنیدیومی برای جداسازی

1. Potato Dextrose Agar

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌های قارچی استفاده شد. به‌منظور اطمینان از جداسازی همهٔ مورفوتیپ‌های مختلف، مشخصات فنوتیپی و ریخت‌شناختی پرگنه‌های ظاهرشده در هر تشتک پتری به‌دقت بررسی شد و پرگنه‌هایی که ساختار ظاهری متفاوتی داشتند، جداسازی و به تشتک‌های پتری جداگانه انتقال داده شدند (Sedaghati *et al.*, 2011). ۳- روش سری رقت: میزان ۳ تا ۵ گرم غذای فرآوری‌شده به ارلن حاوی ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و سوسپانسیون حاصله به مدت پانزده دقیقه روی دستگاه لرزان (شیکر) قرار داده شدند و از این دروایه (سوسپانسیون) ۱ میلی‌لیتر به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد (رقت 10^{-1}). از سوسپانسیون به‌دست‌آمده، ۳۰۰ میکرولیتر به‌طور یکنواخت روی محیط کشت PDA به همراه ۰/۰۵ درصد آمپی‌سیلین ریخته و تشتک‌های پتری در دمای اتاق (۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس) نگهداری شدند. میزان رشد روزانهٔ پرگنهٔ قارچ، بررسی و جدایه‌ها به روش تک راس خالص‌سازی شدند.

جدول ۱. انواع خوراک پرندگان موردبررسی در شهرستان‌های مختلف

Table 1. Poultry diets samples studied in the different cities

Sample Code	Sampling Location	Provinces	Diets	Sample Code	Sampling Location	Provinces	Diets
1	Rafsanjan	Kerman	*Vigna radiataradiate*	26	Rafsanjan	Kerman	Barley
2	Rafsanjan	Kerman	*Panucum miliaceum*	27	Rafsanjan	Kerman	*Portulaca oleracea*
3	Rafsanjan	Kerman	*Sorghum bicolor*	28	Meshkin-shahr	Ardabil	grains mixed
4	Rafsanjan	Kerman	*Zea mays*	29	Meshkin-shahr	Ardabil	*Cannabis sativa*
5	Rafsanjan	Kerman	*Linum usitatissimum*	30	Meshkin-shahr	Ardabil	*Triticua aestivum*
6	Rafsanjan	Kerman	*Triticua aestivum*	31	Meshkin-shahr	Ardabil	*Zea mays*
7	Rafsanjan	Kerman	*Cannabis sativa*	32	Meshkin-shahr	Ardabil	*Panucum miliaceum*
8	Rafsanjan	Kerman	*Lens culinaris*	33	Meshkin-shahr	Ardabil	First feed
9	Rafsanjan	Kerman	Pumpkin seeds	34	Meshkin-shahr	Ardabil	*Vicia ervilia*
10	Rafsanjan	Kerman	Pumpkin seeds	35	Eghlid	Fars	Barley
11	Rafsanjan	Kerman	Watermelon Seeds	36	Eghlid	Fars	*Triticua aestivum*
12	Rafsanjan	Kerman	*Panucum miliaceum*	37	Yazd	Yazd	*Triticua aestivum*
13	Rafsanjan	Kerman	grains mixed	38	Shahindezh	West Azarbaijan	*Triticua aestivum*
14	Rafsanjan	Kerman	Sunflower seeds	39	Shahindezh	West Azarbaijan	*Linum usitatissimum*
15	Babolsar	Mazandaran	*Triticua aestivum*	40	Shahindezh	West Azarbaijan	*Panucum miliaceum*
16	Babolsar	Mazandaran	*Panucum miliaceum*	41	Shahindezh	West Azarbaijan	*Cannabis sativa*
17	Babolsar	Mazandaran	*Cannabis sativa*	42	Shahindezh	West Azarbaijan	grains mixed
18	Babolsar	Mazandaran	*Zea mays*	43	Shahindezh	West Azarbaijan	*Zea mays*
19	Babolsar	Mazandaran	*Vigna radiataradiate*	44	Shahindezh	West Azarbaijan	*Sorghum bicolor*
20	Babolsar	Mazandaran	Seven Seeds Canary	45	Dargaz	KhorasanRazavi	*Panucum miliaceum*
21	Babolsar	Mazandaran	*Linum usitatissimum*	46	Dargaz	KhorasanRazavi	*Cannabis sativa*
22	Sarab	East Azarbaijan	First feed	47	Dargaz	KhorasanRazavi	*Zea mays*
23	Sarab	East Azarbaijan	grain growth	48	Dargaz	KhorasanRazavi	*Triticua aestivum*
24	Sarab	East Azarbaijan	Final feed	49	Khorramabad	Lorestan	*Triticua aestivum*
25	Sarab	East Azarbaijan	*Sorghum bicolor*	-	-	-	-

به‌منظور شناسایی ریخت‌شناختی، ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی در محیط کشت (MEA)[1] و (CZ)[2] در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجهٔ سلسیوس در کشت سه نقطه‌ای بر پایهٔ روش کلیچ[3] بررسی شد (Klich, 2002). ویژگی‌های ماکروسکوپی از جمله رنگ پرگنه از رو و پشت، بافت، شیارهای سطحی و چین‌وچروک‌های پشت پرگنه، تشکیل یا تشکیل نشدن اسکلروت، الگو و میزان رشد در محیط کشت‌ها و دماهای مختلف مورداستفاده و غیره بررسی شدند. ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق، بر پایهٔ تهیهٔ اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محلول اسیدلاکتیک یا لاکتوگلیسرول و بررسی آن‌ها با میکروسکوپ نوری ثبت شد. ویژگی‌های میکروسکوپی موردبررسی، شامل شکل و قطر سرهای کنیدیومی، طول، قطر و دیوارهٔ کنیدیوفور، شکل و ابعاد ریزکیسه (وزیکول)، اندازه، شکل و تزئینات کنیدیوم و اندازه و شمار ردیف استریگما بود (Klich, 2002). شناسایی و تمایز گونه‌ها بر پایهٔ مجموع صفات ریخت‌شناختی و تعیین الگوی باندی گونه‌ها با روش Box-PCR انجام شد (نتایج

1. Malt Extract Agar
2. Czapek Dox Agar
3. Klich

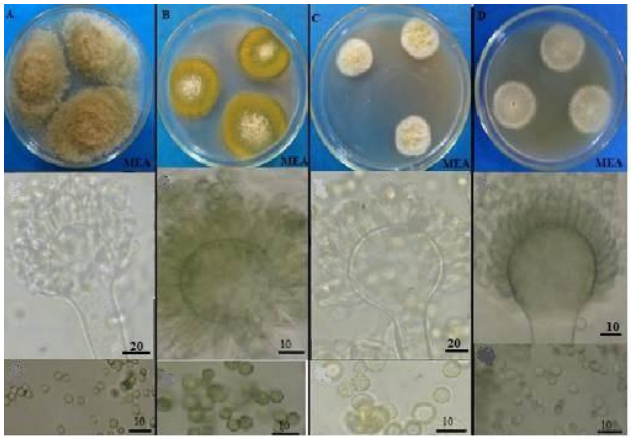
Archive of SID

www.SID.ir

بررسی‌های مولکولی در اینجا ارائه نشده است). به‌منظور تمایز گونه‌ها، مقایسهٔ مولکولی آن‌ها با گونه‌های مرجع شناسایی‌شده در مجموعهٔ قارچ‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان که بر پایهٔ تعیین توالی بخشی از ژن کالمودولین شناسایی شده بودند، انجام شد.

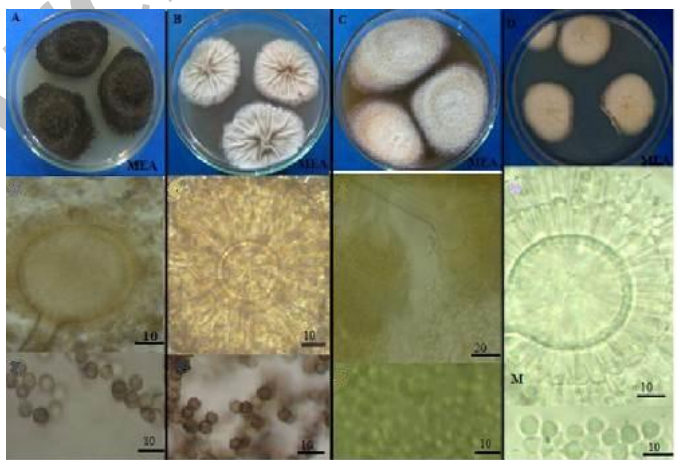
نتایج

در این پژوهش ۱۷۵ جدایه از جنس آسپرژیلوس جداسازی شد که به هشت گونه و پنج بخش و سه زیر جنس از آسپرژیلوس تعلق دارند (شکل‌های ۱ و ۲). گونه‌های *A. japonicus*، *A. tubingensis* متعلق به بخش Nigri، *A. flavus*، *A. tamari* و *A. parasiticus* متعلق به بخش Flavi، *A. ochraceus* متعلق به بخش Circumdati از زیرجنس Circumdati، *A. fumigatus* متعلق به بخش Fumigati از زیر جنس Fumigati و *A. terreus* متعلق به بخش Terrei از زیر جنس Terrei هستند (جدول‌های ۲ و ۳).



شکل ۱. ستون A، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus flavus*، ستون B، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus parasiticus*، ستون C، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus tamari* و ستون D، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus fumigatus*

Figure 1. Column A: the macroscopic and microscopic characteristics of *Aspergillus flavus*. Column B: the macroscopic and microscopic characteristics of *Aspergillus parasiticus*. Column C: the macroscopic and microscopic characteristics *Aspergillus tamari*. Column D: the macroscopic and microscopic characteristics *Aspergillus fumigatus*



شکل ۲. ستون A، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus japonicus*، ستون B،ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus tubingensis*، ستون C، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus terreus* و ستون D، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Aspergillus ochraceus*

Figure 2. Column A: the macroscopic and microscopic characteristics of *Aspergillus japonicas*. Column B: the macroscopic and microscopic characteristics of *Aspergillus tubingensis*. Column C: the macroscopic and microscopic characteristics *Aspergillus terreus*. Column D: the macroscopic and microscopic characteristics *Aspergillus ochraceus*

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌های آسپرژیلوس شناسایی‌شده

Table 2. The microscopic characteristics of identified *Aspergillus* species

Species	Head diameter	Conidiophore Length	Conidiophore width	Vesicle diameter	Metula dimensions	Phialide dimensions	Conidial diameter	Conidial ornamentation
A. flavus	32-87	30-1000	5-13	15-40	4-7×6-17	3-4×8-15	3-5.5	Slightly rough
A. parasiticus	40-95	550-700	5-11	23-28	4-6×8-11	3-4×7-9	4-6	Rather rough
A. tamarii	35-100	600-800	9-12	25-35	4-7×8-15	3-5×7-15	4-6	Very rough, appearance two layers
A. fumigatus	90-150	200-400	9-11	15-20	-	2.5-3.2×5-6-6.5	4-5	Rather rough
A. tubingensis	100-150	100-300	10-23	28-77	5-7×25-37	2-4×8-12	3-4	Rough
A. japonicus	90-120	300-500	9.5-11	30-40	-	3.5-5×7-8	3-5	Echinulate
A. terreus	70-130	150-250	5-7	15-20	1.5-2.5×4-6.5	1.5-2.5×5-6	1-2	Flat
A. ochraceus	100-140	500-700	6-11	25-40	3-6×10-13	2-4×7-10	2-3	Rough

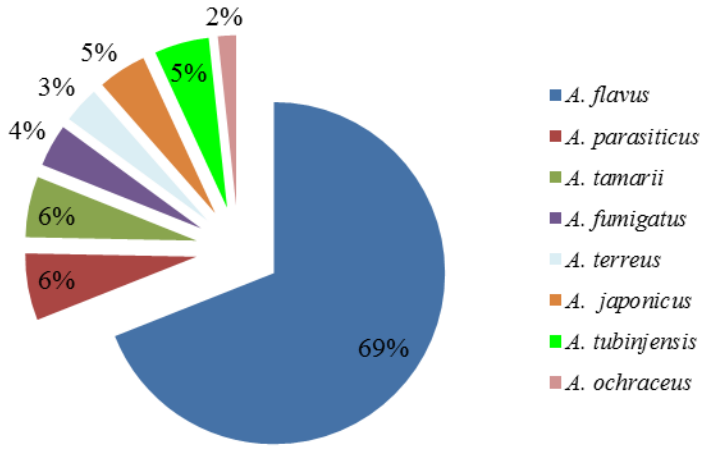
جدول ۳. ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌های آسپرژیلوس شناسایی‌شده

Table 3. The macroscopic characteristics of identified *Aspergillus* species

Species	Colony diameter on CZ	Colony diameter on MEA	Colony color on CZ	Colony color on MEA
A. flavus	80-85	58-70	Pistachio-green	Pistachio-green to lemon yellow
A. parasiticus	40-44	65-67	Olivaceous to dark green	Yellow green to dark green
A. tamarii	52-68	5-70	Brownish green	Light green to yellowish green
A. fumigatus	39-45	40-50	Grayish green	Gray green
A. tubingensis	63-70	48-53	Black	Brownish black
A. japonicus	60-62	58-65	Brownish black	With white mycelium
A. terreus	30-35	45-43	Ocheraceous to yellow brown	Dark with to yellow
A. ochraceus	29-30	30-38	Pale yellowish buff	White yellow

بر پایهٔ بررسی‌های انجام‌شده در این تحقیق، *A. flavus* با ۶۹ درصد و *A. ochraceus* با ۲ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند (شکل۳).

از بین جدایه‌ها، *A. tamarii* و *A. ochraceus* تنها از نمونه‌های رفسنجان جدا شدند. رفسنجان با ۴۹ درصد دارای بیشترین فراوانی و درگز و خرم‌آباد با ۱/۶۵ درصد کمترین فراوانی *A. flavus* را نشان دادند. جدایهٔ *A. parasiticus* به علت ترجیح غلات، از شهرستان‌های شمال‌غربی و شمالی و از بذرهای گندم، ذرت و غذاهای فرآوری‌شده از گندم و ذرت، جداسازی شد. مشکین‌شهر و شهرهای سراب و شاهین‌دژ به ترتیب با ۳۶ و ۹ درصد بیشترین و کمترین فراوانی *A. parasiticus* را داشتند. درصد آلودگی *A. fumigatus* در شهرستان‌های رفسنجان، بابلسر و سراب ۲۸/۵۷ درصد و در شهرستان درگز ۱۴/۲۸ درصد بود. درصد آلودگی بذرها به *A. tubingensis* در رفسنجان، ۷۷/۷۸ درصد و شاهین‌دژ و مشکین‌شهر ۱۱/۱۱درصد بود. آلودگی جیرهٔ غذایی به *A. japonicas* از شهرستان‌های رفسنجان، مشکین‌شهر و سراب و به *A. terreus* از شهرستان‌های رفسنجان و بابلسر گزارش شد (جدول۴).



شکل ۳. درصد فراوانی گونه‌های *Aspergillus* در خوراک پرندگان

Figure 3. The frequency of *Aspergillus* species in poultry diet

Archive of SID

www.SID.ir

از ۴۹ نمونه جیرهٔ غذایی، نمونه‌های گندم، ذرت، ارزن، شاهدانه و کتان در شهرستان‌های رفسنجان، بابلسر، مشکین‌شهر، شاهین‌دژ و لرستان مشترک بود و گونهٔ *A. flavus* از همهٔ نمونه‌ها جداسازی شد. در بین پنج نمونه جیرهٔ غذایی، بیشترین آلودگی مربوط به ارزن بود که ۳۱ جدایه از آن جداسازی شد، پانزده جدایه از شاهدانه و گندم، نه جدایه از ذرت و کتان با چهار جدایه کمترین آلودگی در بین این پنج نمونه را داشت (جدول۵).

بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ درصد آلودگی در بین نه شهرستان و ۴۹ نمونه، بیشترین درصد آلودگی به گونه‌های آسپرژیلوس مربوط به شهرستان رفسنجان بود که درمجموع نود جدایه از این شهرستان جداسازی شد (جدول ۵). از سوی دیگر، بیست جدایه از غذای فرآوری‌شده شامل استارتر، میان‌دان و پس‌دان در شهرستان سراب جداسازی شد که میزان آلودگی این شهرستان بیش از شهرستان مشکین‌شهر بود. از بیست جدایهٔ شهرستان سراب، چهارده جدایه متعلق به *A. flavus* با ۷۰ درصد فراوانی، سه جدایه متعلق به گونهٔ *A. japonicas* و سه جدایه متعلق به *A. parasiticus* با ۱۵ درصد فراوانی بودند. از بین این نمونه‌ها، میان‌دان با ده جدایه بیشترین درصد آلودگی را داشت.

جدول ۴. درصد فراوانی جدایه‌های هر گونهٔ آسپرژیلوس در شهرستان‌های مختلف

Table 4. The frequency of *Aspergillus* species isolates in different cities

Species / City	*A. flavus*	*A. parasiticus*	*A. tamarii*	*A. fumigatus*	*A. terreus*	*A. tubingensis*	*A. japonicus*	*A. ochraceus*
Khoramabad	1.65	0	0	0	0	0	0	0
Dargaz	1.65	0	0	14.29	0	0	0	0
Shahindezh	9.09	27.27	0	0	0	11.11	0	0
Meshkin-shahr	1.65	36.36	0	0	0	11.11	25	0
Rafsanjan	49.59	0	100	28.57	83.33	77.78	37.5	100
Sarab	11.57	27.27	0	28.57	0	0	37.5	0
Babolsar	21.49	9.09	0	28.57	16.67	0	0	0
Yazd	0.83	0	0	0	0	0	0	0
Eghlid	2.48	0	0	0	0	0	0	0

جدول ۵. آلودگی جیرهٔ غذایی پرندگان به گونه‌های Aspergillus در شهرستان مختلف

Table 5. The poultry diet contamination to *Aspergillus* species in different cities

Diets	Species	City	Isolates	Percent of pollution	Number of recovered isolates
Triticua aestivum	*A. flavus*	Rafsanjan	2	13.33	15
		Khoramabad	2	13.33	
		Babolsar	1	6.66	
		Dargaz	1	6.66	
		Yazd	1	6.66	
		Shahindezh	3	20	
	A. parasiticus	Meshkin-shahr Shahindezh	2	13.33	
			1	6.66	
	A. tamarii	Rafsanjan	2	13.33	
Zea mays	*A. flavus*	Rafsanjan	2	22.22	9
	A. parasiticus	Babolsar	1	11.11	
		Meshkin-shahr Shahindezh	2	22.22	
			1	11.11	
	A. tubingensis	Rafsanjan	2	22.22	
		Shahindezh	1	11.11	
Panucum miliaceum	*A. flavus*	Rafsanjan	11	35.48	31
		Babolsar	13	41.94	
	A. parasiticus	Shahindezh	1	3.22	
	A. terreus	Rafsanjan	3	9.68	
		Babolsar	1	3.22	
	A. ochraceus	Rafsanjan	1	3.22	
	A. japonicus	Rafsanjan	1	3.22	
Cannabis sativa	*A. flavus*	Babolsar	7	46.66	15
		Dargaz	2	13.33	
	A. fumigatus	Rafsanjan	2	13.33	
		Babolsar	1	6.67	
		Dargaz	1	6.67	
	A. ochraceus	Rafsanjan	2	13.33	
Linum usitatissimum	*A. flavus*	Rafsanjan	3	75	4
	A. fumigatus	Babolsar	1	25	

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بررسی خوراک پرندگان نمونه‌برداری‌شده از شهرستان‌های مختلف نشان داد خوراک پرندگان مورداستفاده در فروشگاه‌ها متشکل از گندم، ذرت، جو، ارزن، سورگوم، کتان، عدس، شاهدانه، سبوس گندم و غذاهای فرآوری‌شده است (جدول ۱). این مواد به علت داشتن عامل‌های لازم برای رشد قارچ‌ها مانند pH، کربوهیدرات‌ها، چربی، املاح و نمک برای رشد این کپک‌ها مناسب هستند. آب‌وهوای گرم و مرطوب، انبارداری نامناسب، اطلاع نداشتن کافی در نگهداری درست خوراک پرندگان شرایط مناسبی را برای رشد قارچ آسپرژیلوس فراهم می‌کند. بررسی‌های میکروسکوپی انجام‌شده روی همهٔ نمونه‌های جیرهٔ غذایی در همهٔ استان‌ها نشان داد که هشت گونهٔ آسپرژیلوس روی این مواد رشد کرده و آن‌ها را آلوده می‌سازند. برای جداسازی قارچ آسپرژیلوس از جیرهٔ غذایی، روش کاغذصافی مرطوب بهترین روش بود. در این روش، شرایط زمان و فضای کافی برای ظهور همهٔ پرگنه‌های قارچی فراهم است. در این تحقیق گونه‌های *A. flavus*، *A. tubingensis*، *A. japonicus*، *A. ochraceus*، *A. parasiticus*، *A. tamarii*، *A. fumigatus* و *A. terreus* شناسایی شدند. بیشترین فراوانی مربوط به گونهٔ *A. flavus* بود که از همهٔ استان‌ها جداسازی شد و بیشترین درصد آلودگی این گونه به ترتیب مربوط به شهرستان‌های رفسنجان، بابلسر و سراب بود. بنابراین می‌توان گفت به علت تنوع زیاد *A. flavus*، این گونه توان رشد در هر اقلیم و هر بستره (سوبسترا) را دارد ولی بیشترین آلودگی در مناطق با آب‌وهوای معتدل، نیمه گرم و مرطوب است. شهرستان رفسنجان به‌رغم شرایط خشک که برای رشد قارچ‌های ساپروفیت مناسب نیست، بیشترین فراوانی قارچی را دارد. به‌احتمال حجم بالای نخاله‌های پستهٔ رهاشده در اطراف شهر و حومه و ورود میزان زیادی از کودهای دامی از شهرستان‌های مختلف دلیل اصلی این فراوانی باشد. Halt (1994) دانه‌های گندم، جو و ذرت مورداستفاده در خوراک دام و طیور در کشور کرواسی بررسی شد و گونهٔ *A. flavus* را به‌عنوان عامل اصلی آلوده‌کننده معرفی کرد. گونهٔ *A. flavus* به‌عنوان گونهٔ غالب مزارع ذرت در شمال ایتالیا معرفی شد (Giorni *et al.*, 2007). آفلاتوکسین‌ها به‌طور عمده به‌وسیلهٔ گونه‌های *A. flavus* و*A. parasiticus* تولید می‌شوند و تاحدودی روی همهٔ محصولات یا مواد غذایی وجود دارند (Varga *et al.*, 2011). در بررسی پراکنش گونه‌های بخش *Flavi* در خاک‌های مزرعهٔ ذرت در ایران، گونه‌های *A. flavus*، *A. parasiticus* و *A.nomius* جداسازی و شناسایی شد (Razzaghi Abyaneh *et al.*, 2006). در این میان، *A. flavus* با ۸۷/۹ درصد فراوان‌ترین گونه بود. نتایج این بررسی‌های با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده، پس از گونهٔ *A. flavus* بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به *A. parasiticus*، *A. tamarii*، *A. tubingensis*، *A. japonicus*، *A. fumigatus*، *A. terreus* و *A. ochraceus* است. از ۷۸ نمونه خوراک دام و طیور در کشورهای تایلند و ویتنام، آلودگی ۹۴ درصد نمونه‌ها به گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* گزارش شده است (Sales & Yoshizawa, 2005).

بیشترین آلودگی گونه‌های آسپرژیلوس در مناطق با آب‌وهوای معتدل، گرم و مرطوب و دانه‌های خوراکی و روغنی است (Ariyo & Anthony, 2013). با توجه به اینکه ارزن غلهٔ مناطق گرمسیری است بالا بودن میزان آلودگی آن ممکن است به علت بازدهٔ بیشتر استفاده از آب ارزن نسبت به غلات دیگر باشد. بنابراین ارزن می‌تواند به‌عنوان بسترهٔ مناسب برای رشد این گروه قارچی باشد. آلودگی کمتر کتان هم به‌این‌علت است که محصولی سرمادوست است و بوته‌های استقراریافته، سرمای به نسبت شدید ۰ تا ۱۰- درجهٔ سلسیوس) را به‌خوبی تحمل می‌کند و بنابراین بسترهٔ مناسبی برای آلودگی قارچی نیست. Sousel (2004) با بررسی شمار زیادی نمونه‌های اخذشده از کشورهای مختلف آمریکای جنوبی گزارش کرد آب‌وهوای گرم و مرطوب این کشورها شرایط مساعدی برای رشد قارچ آسپرژیلوس و تولید آفلازهرابه فراهم می‌کند. در مورد غذاهای فرآوری‌شده، بیشترین آلودگی مربوط به گونهٔ *A. flavus* و نمونهٔ میان‌دان در شهرستان سراب است.

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط بسته‌بندی غذاهای فرآوری‌شده بسیار مهم است زیرا نبود تهویه و وجود رطوبت و فرآوری نشدن مطلوب می‌توانند از دلایلی باشند که غذاهای فرآوری‌شده را به انواع گونه‌های آسپرژیلوس به‌ویژه *A. flavus* آلوده کند. در یک تحقیق، بررسی شش نوع جیرهٔ پرندگان نشان داد که همراه با افزایش رطوبت دان، نبود تهویه و فرآوری مطلوب و طول‌مدت نگهداری آن میزان آلودگی قارچی افزایش می‌یابد (Alam *et al*., 1994). از سوی دیگر وجود آلودگی بالا به *A. flavus* که عامل بالقوهٔ تولید سم است را باید در نظر داشت. حتی مصرف مقادیر کم قارچ و سموم قارچی تأثیر مخرب و زیان‌آوری بر سامانهٔ ایمنی پرنده وارد می‌سازد (Schweitzer, 2001). در این بررسی، نمونه‌برداری‌ها از هر یک از اقلام دان به‌صورت جداگانه انجام گرفت. درحالی‌که در عمل، تا مرحلهٔ تبدیل این اقلام به دان مخلوط و آماده شده، به علت اطلاع نداشتن کافی بسیاری از دامداران در نگهداری صحیح دان آماده شده و یا نبود انبار و جایگاه مناسب برای نگهداری، شرایط مساعدی برای رشد بیشتر قارچ و تولید سم فراهم خواهد شد. این مشکل در مناطق و فصولی که درصد رطوبت هوا بالا باشد، حادتر است (Lanyasunya *et al*., 2005).

از مقایسهٔ نتایج این بررسی و بررسی‌های انجام‌شده در دیگر کشورها می‌توان نتیجه گرفت در اقلام عمدهٔ مواد غذایی، قابلیت آلودگی به قارچ آسپرژیلوس و سم ناشی از آن وجود دارد. بنابراین هنگام برداشت همهٔ اقلام تشکیل‌دهندهٔ خوراک پرندگان، باید استانداردهای جهانی اعمال شود و تا زمان مصرف نیز شرایط مناسبی برای حمل و نگهداری آن‌ها ایجاد شود زیرا نبود تهویه و وجود رطوبت و فرآوری نشدن مطلوب می‌تواند از علت‌هایی باشد که جیرهٔ غذایی را به انواع قارچ‌ها، به‌ویژه آسپرژیلوس‌ها آلوده کند. همچنین اگر جیره‌های غذایی در محیط‌های مرطوب نگهداری و یا در مسیر حمل‌ونقل آن‌ها دقت لازم نشود، شرایط رشد آسپرژیلوس روی آن‌ها فراهم شده و اسپورهای موجود رشد کرده و سم تولید می‌کنند (Mayahi *et al*., 2007). نکتهٔ شایان‌توجه دیگر این است هر چه زمان برداشت محصول در نقطهٔ پایانی خط تولید یا در زمان تهیهٔ خوراک تا زمان مصرف کمتر باشد، احتمال آلودگی کاهش می‌یابد. با توجه به تنوع آب و هوایی کشور ما و روش‌های مختلف نگهداری جیره‌های غذایی دامی و پرندگان و تنوع مرغداری‌ها و دامداری‌ها، لازم است تحقیق جامعی در رابطه با شناسایی عامل‌های قارچی از جمله آسپرژیلوس‌ها صورت گیرد تا پس از شناسایی آسپرژیلوس‌ها و زهرابه‌های آن‌ها، روش‌های علمی و منطقی برای پیش‌گیری از رشد بی‌رویهٔ عامل‌های آلودگی و تولید قارچ‌زهرها توسط آن‌ها به کار گرفته شود.

REFERENCES

1. Abbas, H.K., Weaver, M.A., Zablotowicz, R.M., Horn, B. W. & Shier, W.T. (2005). Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta. *European Journal of Plant Pathology*, 112(3), 283-287.
2. Alam, A., Islam, M., Hossain, M., Mahalanabis, D. & Hye, H. (1994). Comparison of pivmecillinam and nalidixic acid in the treatment of acute shigellosis in children. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 29(4), 313-317.
3. Ariyo, A.L. & Anthony, M.H. (2013). Survey of mycotoxigenic fungi in concentrated poultry feed in Niger State, Nigeria. *Journal of Food Research*, 2(2), 128.
4. Azzam, A. & Gabal, M. (1997). Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases. I. Infectious bursal disease. *Avian Pathology*, 26(4), 317-325.
5. Bozorgmehri Fard, M.H. (2006). Guide Poultry Disease. *Kawthar Publications*, 221-222. (in Farsi)
6. FAO. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper No. 81, Rome, Italy.
7. Figueroa, S., Centeno, S., Calvo, M., Rengel, A. & Adelantado, C. (2009). Mycobiota and concentration of ochratoxin A in concentrated poultry feed from Venezuela. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(7), 589-594.
8. Frisvad, J.C., Andersen, B. & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112, 231-240.
9. Geiser, D.M., Samson, R.A., Varga, J., Rokas, A. & Witiak, S.M. (2008). Phylogenetics and taxonomy of *Aspergilli* (A review of molecular phylogenetic in *Aspergillus* and prospect for a robust genus-wide phylogeny). In: J. Varga R. A. Samson (Ed), *Aspergillus in genomics era*. Wagenungen Academic Publishers. The Netherlands. Pp: 349.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. & Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330-338.
11. Goldblatt, L.A., ed. (1969). Aflatoxin. Academic Press, New York, USA, 40 pp.
12. Halt, M. (1994). *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 in flour production. *European Journal of Epidemiology*, 10(5), 555-558.
13. Healy, M., Reece, K., Walton, D., Huong, J., Shah, K. & Kontoyiannis, D. (2004). Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42, 4016-4024.
14. Khosravi, A.R., Shokri, H., Yahyaraeyat, R. & Soltani, M. (2003). Isolation of toxigenic and nontoxigenic fungi from feedstuffs referred the center of mycology. *Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran*, 59(3), 221-226. (in Farsi)
15. Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. CBS, Utrecht, The Netherlands, 116 pp.
16. Lanyasunya, T.P., Wamae, L.W., Musa, H.H., Olowofeso, O. & Lokwaleput, I.K. (2005). The risk of mycotoxins cantamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(3), 162-169.
17. Lovett, J. (1972). Toxigenic fungi from poultry feed and litter. *Poultry Science*, 51(1), 309-313.
18. Mahmoud, A.L. (1993). Toxigenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuff ingredients. *Journal of Basic Microbiology*, 33(2), 101-104.
19. Mayahi M., Razi Jalali, M. & Salamat, N. (2007). Isolate *Aspergillus* and measure the amount of aflatoxin in fishmeal, corn and soybean meal. *Journal of Shahid Chamran Medical University*, 17(7), 95-105. (in Farsi)
20. Mehan, V.K. & Chohan, J.S. (1973). Aflatoxin B1 producing potential of isolates of *Aspergillus flavus* from cotton, maize and wheat. *Mycopathologia Journal*, 49(1), 263-274.
21. Mehdizade, M., Rabie, M. & Asghari, Sh. (2007). *Aspergillus* and Aflatoxicosis. *Journal of Yazd Medical University*, 16(4), 100-107. (in Farsi)
22. Mngadi, P.T., Govinden, R. & Odhav, B. (2008). Co-occurring mycotoxins in poultry and animal feeds. *American Journal of Botany*, 7(13), 2239-2243.
23. Oluwafemi, F., Kehinde, M.T., Alafia, O.M. & Dike, C.C. (2009). Determination of Aflatoxin leves in commercial poultry feeds sold in some parts of southwestern Nigeria. *Journal of Natural Sciences, Engineering and Technology*, 8(1), 34-41.
24. Peterson, S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100, 205-226.
25. Raper, K.B. & Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Baltimore.
26. Ranjbar, S., Nazari, R. & Noori, M. (2011). Isolation and molecular identification of *Aspergillus* species of cattle feed. *Journal of Vetenary Microbiology*, 7(1), 12-17. (in Farsi)
27. Razzaghi Abyaneh, M., Shams Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon Shiri, A., Ranjbar Bahadori, S., Mirzahoseini, H. & Rezaee, M.B. (2006). A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161, 183-192.
28. Rippon, J. (1988). Dermatophytosis and dermatomycosis. *Medical Mycology*, 3, 169-275.
29. Saleemi, M.K, Khan, M.Z., Khan, A., Mehmood, M.A., Farooq, M., Hameed, S., ul Hassan, Z., Javed, M.R. & Javed, I. (2012). Molecular identification of black Aspergilli isolated from poultry feeds by sequencing their ITS-regions. *Pakistan Veterinary Journal*, 32(2), 171-174.
30. Sales, A.C. & Yoshizawa, T. (2005). Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus* section *Flavi* contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *Food Additives and Contaminants*, 22(5), 429-436.
31. Schweitzer, S.H., Ouist, C., Grimes, G.L. & Forest, D. (2001). Aflatoxin levels in corn available as wild turkey feed in Georgia. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(3), 657-659.
32. Sedaghati, E., Nikkhah, M., Zare, R., Fotuhifar, K., Kocsube, S., Vagvolgyi, C.S. & Varga, J. (2011). Molecular identification of potentialy mycotoxigenic black *Aspergili* contaminating pistachio nuts in Iran. *Acta Alimentaria*, 40, 65-70
33. Talakesh, F. (2003). *Mycotoxins and their effects on the immune system*. Ph.D. dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University. (in Farsi)
34. Varga, J., Rigo, K., Teren, J. & Kozakiewicz, Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), 29-36.
35. Varga, J, Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2011). Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57-80.

Archive of SID

www.SID.ir