



جداسازی و شناسایی عوامل قارچی توکسین زا از گندم و ذرت انبار شده در سیلوهای شهر کرمان

امیدرضا صرافی^۱، محمد فائزی قاسمی^{۲*}، آرش چایچی نصرتی^۲

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروپ شناسی، استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروپ شناسی

چکیده

مایکوتوکسین ها متابولیت های ثانویه ای هستند که عمدتاً توسط گونه‌هایی از قارچ‌های *آسپریژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنی سیلیوم* تولید می‌شوند. از این میان سهم گونه‌های *آسپریژیلوس* قابل توجه می‌باشد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی عوامل قارچی توکسین زا از مواد دانه‌ای پر مصرف انبار شده در سیلوهای شهر کرمان انجام گردید. این پژوهش به صورت بنیادی و تجربی بر روی ۸۳ نمونه، گندم و ذرت موجود در واحدهای نگهداری رسمی انجام شد. به منظور غربالگری از محیط‌های ساپرو دکستروز آگار، ساپرو دکستروز آگار همراه با کلرامفنیکل و PDA استفاده شد. شناسایی سویه‌های جداسازی شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک انجام پذیرفت. تشخیص سموم قارچی نیز با روش کروماتوگرافی مایع در فشار بالا (HPLC) انجام گرفت. از میان ۸۳ نمونه، ۳۷ درصد آلودگی مربوط به جنس *آسپریژیلوس* بود. گونه *آسپریژیلوس فلاووس* با ۱۴ درصد دارای بیشترین فراوانی در میان گونه‌های *آسپریژیلوس* بود. همچنین افلاتوکسین های B1، B2، G1 از نمونه‌های جنس *آسپریژیلوس* با روش کروماتوگرافی مایع در فشار بالا جداسازی گردید. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان دهنده حضور قارچ های توکسین زا، در مواد دانه ای پر مصرف (گندم و ذرت) تحت مطالعه بود. بنابراین باید برنامه ریزی مدونی به منظور کنترل قارچ های یاد شده در مواد دانه ای تدوین گردد. **واژگان کلیدی:** غلات، افلاتوکسین، HPLC.

پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۴

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۴

مقدمه

گونه های *آسپریژیلوس* هنگام خشک کردن و نگهداری محصولات آنها را آلوده می نمایند (۳ و ۴). سمومی که توسط جنس *آسپریژیلوس* تولید می شود شامل افلاتوکسین های نوع B، G، M، اکراتوکسین A، استریگماتوسیستین و اسید سیکلوپیزونیک می باشند. در این میان افلاتوکسین ها به دلیل ایجاد بیماری افلاتوکسیکوسیس در انسان و حیوانات از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۵ و ۶). در سال های اخیر مطالعات گسترده ای در خصوص آلودگی قارچی در محصولات مختلف از جمله غلات صورت پذیرفته است. بریکل (Birckl) و همکاران در برزیل حضور

بر اساس گزارشات سازمان جهانی خواربار و کشاورزی، هر ساله حدود ۲۰ درصد از منابع غذایی تولید شده در دنیا توسط سموم قارچی آلوده می شوند (۱). فلور قارچی طبیعی موجود در منابع غذایی انسان عمدتاً شامل سه جنس *آسپریژیلوس* (*Aspergillus*)، *فوزاریوم* (*Fusarium*) و *پنی سیلیوم* (*Penicillium*) می باشد. این قارچ ها قادرند قبل و یا بلافاصله پس از برداشت بر روی غلات مایکوتوکسین تولید کنند. این سموم می توانند طی دوران رشد و بلوغ غله و یا در حین نگهداری یا انتقال غلات ایجاد گردند (۲).

* آدرس برای مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروپ شناسی. تلفن: ۰۹۱۰۶۰۰۵۵۲۹. پست الکترونیک: faezi_m@yahoo.com

شد. نمونه‌ها پس از بسته‌بندی و برچسب‌گذاری، همراه با نمونه‌های هوایی که بر اساس موقعیت و خصوصیات منطقه نمونه‌گیری، با پلیت‌های در باز و با استفاده از محیط سابرو دکستروز آگار (SDA) از هوای موجود در سیلو و انبارها به دست آمده بود به آزمایشگاه منتقل شدند.

ب) جداسازی قارچ: برای این منظور نیمی از گندم و ذرت هر نمونه برداشت و در آسیاب خرد شد. یک گرم از هر نمونه در استوانه مدرج حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط و به مدت یک ساعت به صورت ساکن در آزمایشگاه نگهداری گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته و توسط سوآب استریل در پلیت‌های حاوی محیط SDA (محیط سابرو دکستروز آگار) کشت داده شد (۹). علاوه بر این پس از تخلیه مایع روماند، از رسوب حاصل نیز بر روی پلیت‌های حاوی محیط SDA کشت داده شد (۹ و ۱۰). به منظور مشخص نمودن فلور قارچی سطحی، ۱۰ عدد از دانه‌ها در محیط کشت SDA کشت داده شد. با استفاده از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل در محیط کشت SDA، قارچ‌های ساپروفیت حذف گردیدند. به منظور خالص‌سازی جدایه‌های به دست آمده، نمونه‌ها بر روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت و در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. از حاشیه پرگنه هر جدایه یک بلوک میسیلیومی به قطر چهار میلی‌متر به درون لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر استریل منتقل و به خوبی تکان داده شد. به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها از سوسپانسیون اسپور به دست آمده، ۲۰۰ میکرولیتر از آن بر روی سطح محیط PDA ریخته شد. محیط‌های کشت به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود و با در نیمه باز نگهداری و سپس به گرمخانه با دمای ۲۵ درجه سلیسیوس منتقل گردیدند. تک پرگنه‌های ظاهر شده به عنوان کشت خالص به محیط جدید PDA منتقل گردیدند (۹، ۱۰ و ۱۲). شناسایی قارچ‌های جداسازی شده با توجه به مشخصات مورفولوژی شامل رنگ پرگنه، ویژگی ریشه، نوع اندام بار دهی، شکل و رنگ اسپورها و با توجه به کلیدهای شناسایی بارنت و هانتز (۱۳)، کلیک (۱۴) و دوگان (۱۵) انجام گرفت.

افلاتوکسین‌های B₁ و B₂ را در نمونه‌های گندم تایید نمودند. همچنین جنس‌های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و فوزاریوم دارای بیش‌ترین میزان فراوانی در نمونه‌ها بودند (۷).

در بررسی برگوفر (Berghofer) و همکاران در استرالیا بر روی گندم و آرد گندم از نظر فلور میکروبی، شایع‌ترین کپک‌های جداسازی شده شامل آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و کلاوسپوریوم (*Cladosporium*) بودند (۸).

در مطالعه خسروی همکاران (Khosravi) آسپرژیلوس (۶۳/۲ درصد)، پنی سیلیوم (۳۶/۸ درصد)، موکور (*Mucor*) ۳۱/۶ درصد و کلاوسپوریوم (۲۶/۳ درصد)، به ترتیب فراوان‌ترین قارچ‌های جداسازی شده از جیره غذایی دام بودند (۹). در مطالعه دیگری نیز که توسط هدایتی (Hedayati) و محمد پور (Mohammadpour) در ایران انجام گرفت، ۶۳ درصد از نمونه‌های گندم به انواع آسپرژیلوس آلوده بودند. از طرفی افلاتوکسین‌های G₁ و B₁ نیز در نمونه‌ها شناسایی شدند (۱۰).

هدف از این مطالعه جداسازی عوامل قارچی توکسین‌زا از مواد دانه‌ای پرمصرف (گندم و ذرت) انبارشده در سیلوهای شهر کرمان بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌گیری: در این مطالعه روش نمونه‌گیری بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به شماره ۱۲۰۰۴ انجام شد (۱۱). این پژوهش به صورت بنیادی و تجربی بر روی ۸۳ نمونه گندم و ذرت جمع‌آوری شده از مراکز نگهداری غله شامل دو سیلو، دو کارخانه آرد، یک مرکز تهیه خوراک دام و طیور و چهار انبار انجام شد. نمونه برداری از محموله‌ها در بازرسی‌های قرنطینه‌ای و نیز روش پلیت در باز صورت گرفت.

نمونه‌گیری از قسمت‌های مختلف با وزن تقریبی ۱۰۰ گرم، به طور تصادفی برداشته شد. نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی مخلوط و در نهایت، نمونه انباشته‌ای با وزن تقریبی ۱ کیلوگرم تهیه

یک، ۱۰ جدایه (۳۶٪) به عنوان آسپرژیلوس شناسایی شدند. این در حالی است که از بین ۲۵ نمونه اخذ شده از سیلوی شماره دو، ۱۴ جدایه (۵۳٪) به عنوان آسپرژیلوس شناسایی شدند ($p=0/157$). همچنین از مقایسه میزان فراوانی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) شناسایی شده از دو سیلو، ۴۰٪ از کل آسپرژیلوس‌های شناسایی شده از سیلو شماره یک و ۳۶٪ از کل آسپرژیلوس‌های جدا شده از سیلو شماره دو، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. در مقایسه جدایه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*) دو سیلو که شامل ۳۰٪ از کل آسپرژیلوس‌های جدا شده از سیلوی اول و ۵۰٪ از آسپرژیلوس‌های جدا شده از سیلوی دوم بودند، اختلاف معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر از میان نمونه‌های گندمی که آلودگی قارچ آسپرژیلوس در آنها تشخیص داده شد، ۱۴٪ آلوده به آسپرژیلوس فلاووس، ۱۳٪ آلوده به آسپرژیلوس فومیگاتوس و ۱۱٪ آلوده به آسپرژیلوس نیجر (*Aspergillus niger*) بودند. همچنین فراوانی آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نیجر در نمونه‌های ذرت به ترتیب ۲۵ و ۸ درصد بود ($p=0/985$). با مقایسه انجام گرفته بین جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس در نمونه‌های گندم و ذرت، رابطه معنی داری بین حضور قارچ و نوع نمونه مشاهده نشد.

در این پژوهش، ۳۸ جدایه آسپرژیلوس به منظور انجام مراحل تشخیص سم آماده و با روش HPLC بررسی شدند. در این مطالعه افلاتوکسین‌های G_1 ، B_1 و B_2 در نمونه‌ها شناسایی گردیدند (شکل‌های ۱ تا ۳). از این میان، سیلوی شماره یک ۷۵ درصد از کل سموم تشخیصی و سیلوی شماره دو ۲۵ درصد آن را تشکیل داد ($p=0/754$).

بحث

در این پژوهش ۸۳ نمونه از مواد دانه‌ای پر مصرف شامل گندم و ذرت، جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها دارای آلودگی قارچی بودند. در نمونه‌های ذرت، جنس آسپرژیلوس بیشترین فراوانی را در میان قارچ‌های جداسازی شده به خود اختصاص داد. در

جنس شناسایی توکسین‌های قارچی: تشخیص سموم بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۲۰۰۴ از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام پذیرفت (۱۱). به این منظور نمونه‌های قارچی که به عنوان آسپرژیلوس شناسایی شده بود، در محیط مایع سابرو دکستروز کشت و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با ۱۳۷ دور در دقیقه، به مدت ۳ روز نگهداری شدند. پس از آن میسلیوم‌های رشد کرده با کاغذ صافی جدا و به محلول روئی متانول خالص و کلرور سدیم اضافه گردید. سپس مجدداً سوسپانسیون از کاغذ صافی عبور داده شد و به ستون‌های HPLC تزریق شد (۱۱).
 (د) آنالیز آماری: به منظور محاسبه اطلاعات آماری و درصد بین دو گروه، از آزمون مربع کای استفاده شد. همچنین تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزارهای *Excel* و *Epi Info 6* انجام گرفت. در این مطالعه $p < 0/05$ به عنوان مرز معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

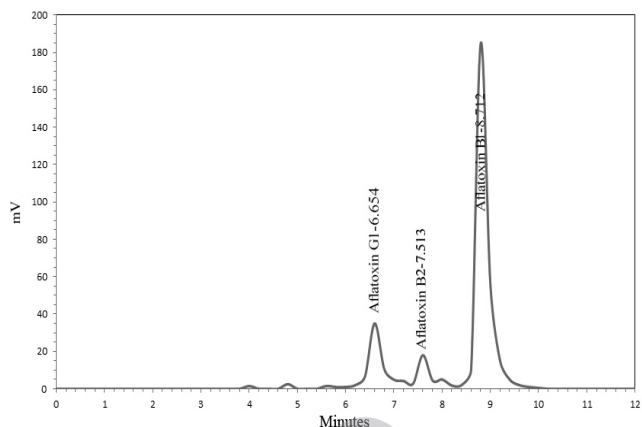
از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده قارچ‌های آسپرژیلوس و موکور بیشترین و اورئوبازیدیوم کمترین فراوانی را در میان قارچ‌های جداسازی شده داشتند (جدول ۱). در پژوهش حاضر از بین ۲۶ نمونه اخذ شده از سیلوی شماره جدول ۱: درصد فراوانی قارچ‌های جداسازی شده از نمونه‌های گندم و ذرت در کرمان.

نام جنس	تعداد	درصد فراوانی
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۱۲	۴۵٪
موکور	۱۹	۷۰٪
آسپرژیلوس فلاووس	۱۵	۵۴٪
پنی سیلیوم	۱۱	۴۱٪
آلترناریا	۶	۲۲٪
آسپرژیلوس نیجر	۱۱	۴۱٪
ریزوبوس	۹	۳۳٪
فوزاریوم	۷	۲۷٪
اورئوبازیدیوم	۱	۴٪
مخمر	۴	۱۵٪
استاکی بوتریس	۴	۱۵٪
استمفیلیوم	۲	۷٪

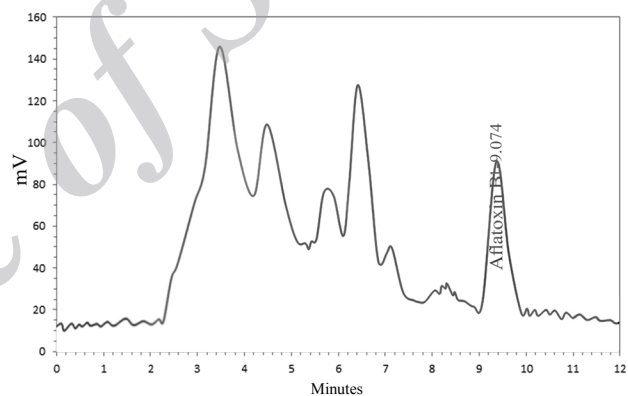
ادامه جنس های فوزاریوم (۲۵٪)، موکور و پنی سیلیوم (هر کدام با ۹٪)، مخمر (Yeast)، استمفیلیوم (*Stemphylium*) و استاکی بوتریس (*Stachybotrys*) (هر کدام با ۸٪) قرار داشتند. در مورد شناسایی و تشخیص سموم قارچی نیز سم افلاتوکسین B₁ در این نمونه ها شناسایی شد.

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر در مورد ذرت، با یافته های آتن کنگ (Atehnkeng) و همکاران مطابقت دارد. آنها نشان دادند که دانه های ذرت در انبار به قارچ های اسپرژیلوس و فوزاریوم آلوده می باشند (۱۶). در مطالعه آنها، جنس اسپرژیلوس با ۷۰٪ و فوزاریوم با ۲۴ درصد جنس های غالب را تشکیل دادند. همچنین از میان گونه های مختلف اسپرژیلوس نیز اسپرژیلوس فلاووس گونه غالب را تشکیل می داد. علاوه بر این آنها تولید افلاتوکسین های گروه B و G را نیز گزارش نمودند (۱۶). همچنین در مطالعه دلال (Dawlal) و همکاران جنس های آلوده کننده ذرت در آفریقای جنوبی اسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی سیلیوم و ریزوپوس گزارش گردید (۱۷). در این مطالعه در مورد نمونه های گندم نیز جدایه های جنس اسپرژیلوس بیشترین فراوانی را دارا بودند. از میان گونه های مختلف اسپرژیلوس به ترتیب اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس فومیگاتوس بیشترین فراوانی را داشتند. در مورد سموم تشخیصی نیز در نمونه های گندم وارداتی افلاتوکسین های B₁ و B₂ و G₁ و در مورد گندم های داخلی افلاتوکسین های B₁ و G₁ شناسایی شدند.

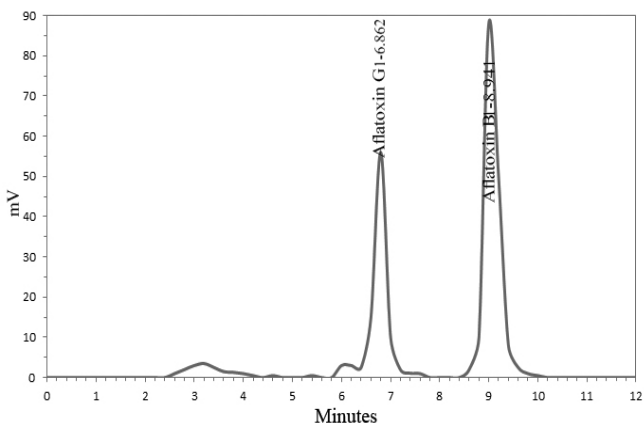
نتایج به دست آمده در این پژوهش در مورد گندم، با یافته های ریا (Riba) و همکاران در الجزایر و نیز هدایتی و محمدپور (Hedayati and Mohammadpour) در استان مرکزی هماهنگی نسبی دارد (۱۰ و ۱۸). این محققان نشان دادند که جنس غالب آلوده کننده نمونه های گندم، قارچ اسپرژیلوس می باشد. بریکل (Birckl) و همکاران در برزیل ۳۵ نمونه گندم را از نظر حضور قارچ هایی مانند اسپرژیلوس و پنی سیلیوم و مایکوتوکسین های مانند افلاتوکسین B₁، B₂، G₁ مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان دهنده حضور افلاتوکسین B₁ و B₂ در نمونه ها بود. همچنین به ترتیب جنس های اسپرژیلوس،



شکل ۱: پیک های مربوط به نمونه با کد B13 با سموم تشخیصی افلاتوکسین های G₁، B₁ و B₂.



شکل ۲: پیک های نمونه با کد Okp1 با سموم تشخیصی افلاتوکسین های G₁ و B₁.



شکل ۳: پیک های مربوط به نمونه با کد HJZ با سموم تشخیصی افلاتوکسین B₁.

پنی سیلیوم و فوزاریوم در نمونه ها دارای بیش ترین میزان فراوانی بودند (۷). قارچی و نیز پاکسازی نسبی مزارع از این قارچ ها می توان به طور موثری خطر آلودگی غلات به قارچ را کاهش داد.

نتیجه گیری

تشکر و قدردانی

نتایج این پژوهش نشان دهنده فراوانی بالای قارچ های مهمی مانند آسپرژیلوس و موکور در غلات می باشد. با رعایت نکات لازم مانند استفاده از واریته های مقاوم در برابر آلودگی نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر علیرضا صرافی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Kalantar Nisstanaki M, Salary J. Mycotoxins in animal and poultry feed. The first edition, Tehran, Marz danesh. 2012; pp: 1-47.[In Persian]
2. B.I.O.M.I.N Team. Mycotoxin Occurrence, Available at: http://www.mycotoxins.info/myco_info/field_myocc.html, (Accessed: February 14, 2013).
3. Takatori K. Mycotoxigenic fungi and their control in foodstuffs. Foods Food Ingredients J Jpn. 2006; 12: 1-18.
4. Reddy K, Reddy H, Abbas K, Abel C, Muralidharan K. Mycotoxigenic fungi-mycotoxins and management of rice grains. Toxin Rev. 2008; 27: 287-317.
5. Food and Drug Administration. Food And Drug Administration Compliance Program Guidance Manual. Food And Drug Administration of America. 2008; 1: 1-5.
6. Lovell R, Ekelman K, Food Contamination, Available at: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/Contaminants/ucm050974.htm>, (Accessed: February 2, 2013).
7. Birckl N, Lorini I, Scussel V. Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest. International Working Conference on Stored Product Protection. 2005; 2: 12-62.
8. Berghofer LK, Hocking AD, Miskelly D, Jansson E. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. Int J Food Microbiol. 2003; 85: 137-149.
9. Khosravi A, Shokri H, Yahyaraeyat R, Soltani M. Isolation of toxigenic & nontoxigenic fungi from feedstuffs referred to the center of mycology. J Vet Med. 2004; 59(3): 221-226. [In Persian]
10. Hedayati M, Mohammadpour R, Contamination rate of stored wheat samples of Mazandaran province by *Aspergillus flavous* and Aflatoxin. J Kermanshah. 2003; 9: 52-61. [In Persian]
11. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Determination of aflatoxins. Available at: <http://www.isiri.org/Portal/Home>. (Accessed: January 4, 2013). [In Persian]
12. Zeinie F, Karghar A, Emami M. Comprehensive medical mycology. 3rd ed. Tehran. University of Tehran Press; 2004. [In Persian]
13. Barnett H, Hunter B, Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. Minneapolis. Burgess; 1998.

14. Klich MA. Identification of Common *Aspergillus* Species. United States. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 2002.
15. Dugan FM. The identification of fungi. United States. The American Phytopathological Society. 2006.
16. Atehnkeng J, Ojiambo P, Donner M, Ikotun B, Sikora R, Cotty P, Bandyopadhyay R. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. Int J Food Microbiol. 2008; 122(1-2): 74-84.
17. Dawlal P, Barros E, Marais J. Evaluation of maize cultivars for their susceptibility towards mycotoxigenic fungi under storage condition. J Stored Product Res. 2012; 48: 114-119.
18. Riba, A. Bouras N, *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. Food Chem Toxicol. 2010; 48(10): 2772-2777.

Archive of SID



Isolation and characterization of toxicogenic fungi strains from wheat and corn used in Kerman city

Omidreza Sarafi¹, Mohammad Faezi Ghasemi², Arash Chaiechi Nosrati²

¹MS.c., Department of Microbiology, Lahijan branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Microbiology, Lahijan branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Abstract

Mycotoxins are the secondary metabolites produced by *Penicillium*, *Fusarium*, and *Aspergillus* species. These metabolites are mainly produced by *Aspergillus* species. This study was aimed to isolation and characterization of the toxicogenic fungi strains from mostly consumed cereals (wheat, corn) used in Kerman city. This empirical basic study was carried out on 83 samples of wheat and corn collected from formal preservation units. Screening was conducted using sabouraud dextrose agar, sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and PDA mediums. The isolated strains were identified according to morphologic characters. The presence of mycotoxins of pathogenic fungi was determined by HPLC. Overall, 37% of samples were infected with *Aspergillus* and *A. flavus* (14%) was the most frequent fungi. Also aflatoxins B1, B2 and G1 were isolated from *Aspergillus* using HPLC. Our results indicated the presence of toxigenic fungi on the mostly consumed cereals (wheat and corn). Therefore, a program must be planned to control the fungi on the cereals.

Keywords: Cereals, Aflatoxins, HPLC.

Correspondence to: Mohammad Faezi Ghasemi

Tel: +98 9113314187

E-mail: faezi_m@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 8(4): 330-336.