**مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی**
دوره ۲۶، شماره ۳، پاییز ۹۵، صفحات ۱۸۰ تا ۱۸۷

**Original Article**

# جداسازی و شناسایی دوگونه *آسپرژیلوس فلاووس* و *پارازیتیکوس* مولد آفلاتوکسین از خوراک دام شهرقدس – شهریار به روش PCR

**شکوفه مرادی[۱]، آذر سبکبار[۲]، رامین حاجی خانی[۳]، امیر بختیاری[۴]، سمیه طالبی[۵]**

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۲] دانشیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۳] دانشیار زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۴] کارشناس ارشد ژنتیک، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۵] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

## چکیده

**سابقه و هدف**: *برخی گونه‌های جنس آسپرژیلوس مولدین بالقوه آفلاتوکسین هستند که مایکوتوکسینی با اثرات کارسینوژنیک و تراتوژنیک است. آلودگی خوراک دام با گونه های آسپرژیلوس سبب تولید آفلاتوکسین، انتقال آن به شیر و فرآورده های لبنی و اختلال در سلامت دام، شیر و افراد مصرف کننده آن می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی گونه‌های بالقوه مولد آفلاتوکسین از خوراک دام در گاوداری‌های منطقه شهر قدس- شهریار بود.*

**روش بررسی**: *در این مطالعه، ۳۹۴ خوراک دام از ۴۱ گاوداری در منطقه شهر قدس- شهریار در پاییز ۱۳۹۳ به طور تصادفی انتخاب و از نظر آلودگی با آسپرژیلوس‌هایی که به طور بالقوه مولد آفلاتوکسین هستند به روشPCR مورد سنجش قرار گرفت. آسپرژیلوس‌های جدا شده از خوراک دام پس از جداسازی و کشت در محیط اختصاصی، با روش میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و جهت شناسایی مولکولی از روش PCR در حضور پرایمرهای AFLR، Omt1، FLA1، Nor1، Par1 استفاده شد.*

**یافته‌ها**: *نتایج حاصل از بررسی خوراک دام با PCR نشان داد که ۴۲ خوراک دام ۸ گاوداری، دارای آلودگی با گونه آسپرژیلوس فلاووس هستند که به طور بالقوه می‌توانند مولد آفلاتوکسین باشند.*

**نتیجه‌گیری**: *نتایج نشان دادند که گاوداری‌های منطقه شهرقدس-شهریار به آسپرژیلوس فلاووس آلوده هستند.*

**واژگان کلیدی**: *آفلاتوکسین، خوراک دام، PCR.*

## مقدمه

قارچ‌ها از عوامل بیولوژیک مهم آلوده کننده خوراک دام هستند و با ترشح متابولیت‌های مختلف می‌توانند نه تنها باعث فساد و از بین بردن غلات شوند، بلکه با تولید سموم مختلف از جمله آفلاتوکسین، از عوامل تهدید کننده جدی سلامت انسان باشند (۴-۱).

آفلاتوکسین از جمله سموم قارچی است که به وسیله گونه‌هایی نظیر *آسپرژیلوس فلاووس* تولید شده و در صورت آلودگی غذایی انسان یا حیوان با آن می‌تواند باعث تخریب حاد کبد، سیروز کبد، محرک و القاکننده سرطانی شدن سلول‌های کبدی و عوارض تراتوژنیک در انسان و حیوان شود (۵،۶). سایر گونه‌های تولید کننده آفلاتوکسین، *A.pseudotamarii*، *A.nomius*، *A.ochraceoroseus*، *A.bombycis* و *A.versicolor* هستند (۹).

همچنین این سم می‌تواند از راه مصرف غذا و خوراک دام‌ها از راه شیر و فرآورده‌های آن به انسان منتقل شود. در بین

**آدرس نویسنده مسئول**: تهران، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ،کرج، ایران، آذر سبکبار (**email**: sabokbar@kiau.ac.ir)

**تاریخ دریافت مقاله**: ۹۴/۶/۱۴
**تاریخ پذیرش مقاله**: ۹۵/۱/۲۵

Archive of SID
www.SID.ir

گونه‌های مولد آفلاتوکسین، قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* از مهم‌ترین و شایع‌ترین قارچ های مولد آفلاتوکسین در خوراک دام است. اسپورهای این قارچ از راه هوا منتشر و سبب آلودگی غلات، حبوبات، علوفه و خوراک دام به آفلاتوکسین می‌شود (۷،۸). استفاده از خوراک دام ناسالم و آلوده سبب اختلال در چرخه سلامت دام می‌شود. در علوفه، و غلاتی مانند ذرت، جو، گندم، و سویا، کپک‌ها به آسانی در حین داشت، برداشت، فرآوری، حمل و انبارداری رشد کرده و در آن‌ها آفلاتوکسین تولید می‌کنند.

پژوهش‌های مختلف بر روی خوراک دام نشان داده‌اندکه آلودگی خوراک دام به کپک‌ها، به ویژه گونه‌های آسپرژیلوس، سبب تولید آفلاتوکسین و انتقال آن به شیر و فرآورده‌های آن می‌شود (۱۰، ۱۱). تاکنون گزارش‌های بسیاری درخصوص آلودگی کپکی خوراک دام، وجود آفلاتوکسین درآن صورت پذیرفته است (۱۲). در ایران نیز، به ویژه در دهه اخیر، مطالعاتی در این مورد انجام شده است. شناسایی سنتی گونه‌های *آسپرژیلوس* معمولا براساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن‌ها است که گاهی اوقات شناسایی و تمایز بین گونه‌ها براساس این ویژگی‌ها نیز با مشکل مواجه می‌شود (۱۳). همچنین، شناسایی سنتی گونه‌ها به چندین روز زمان جهت کشت نیاز دارد. لذا، امروزه روش‌های سریع بر اساس اسید نوکلئیک جهت شناسایی گونه‌های *آسپرژیلوس* توسعه یافته و جایگزین روش‌های شناسایی سنتی شده است. موفق‌ترین روش مورد استفاده در این مسیر روش PCR است که به عنوان روش سریع، حساس و اختصاصی جهت شناسایی گونه‌های *آسپرژیلوس* شناخته شده است (۱۴، ۱۵). هدف از این مطالعه بررسی آلودگی خوراک دام به قارچ *آسپرژیلوس* بود.

## مواد و روشها

مطالعه حاضر به صورت مقطعی– توصیفی و در دو بخش انجام شد. بخش نمونه گیری که در محل‌های نمونه گیری انجام شد و بخش آماده سازی نمونه‌ها که در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد کرج به انجام رسید.

با مراجعه به ۴۱ گاوداری در منطقه شهرقدس – شهریار در نوبت‌های مختلف در فصل پاییز ۱۳۹۳، نمونه‌های خوراک دام به صورت تصادفی جمع آوری شد. نمونه‌های خوراک دام شامل مواد مختلف از جمله یونجه، ذرت، کاه، سیلوذرت، جو، سویا،کنجاله کلزا، کنجاله پنبه دانه، سبوس گندم، و گندم بود که به میزان ۱۰۰ گرم از انبار گاوداری‌ها تهیه و در کیسه‌های کاغذی برچسب‌دار و استریل قرار داده شد و پس از آسیاب کردن در بسته‌هایی به صورت مجزا در دمای طبیعی آزمایشگاه نگهداری شد (جدول ۱).

**جدول ۱.** انواع خوراک دام مورد مطالعه

| معادل فارسی | معادل انگلیسی | علامت اختصاری |
|---|---|---|
| یونجه | Medicago sativa (alfalfa) | Me |
| ذرت | Zea myse (corn) | Ze |
| کاه | Wheat straw | Wh |
| سیلو ذرت | Corn Silage | CS |
| جو | Barley | Ho |
| سویا | Soya | So |
| کنجاله کلزا | Canola meal | Cc |
| کنجاله پنبه دانه | Cotton seed meal | Csc |
| سبوس گندم | Wheat bran | Wb |
| گندم | Wheat | We |

جهت جداسازی *آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس از*خوراک دام، ابتدا 1g خوراک دام آسیاب شده را با 5ml سرم فیزیولوژی استریل مخلوط شد و از این سوسپانسیون ۱۰۰ µl برداشته شد و در محیط سابرودکستروز آگار کشت داده شد. سپس پلیت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. کلنی‌های رشد یافته در هر پلیت ابتدا مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. با استفاده از رنگ آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو در زیر میکروسکوپ، ساختار میسلیوم، کونیدی و کونیدیوفور مورد بررسی قرار گرفت. سپس کلونی‌هایی که از جنس *آسپرژیلوس* تشخیص داده شدند، برای خالص سازی بر روی محیط سابرودکستروزآگار کشت داده شدند و در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرما گذاری شدند. سپس کلنی‌های حاصل بررسی و جهت اطمینان برای خالص بودن، از روش کشت برروی لام (Slide culture technique) استفاده شد. قارچ‌هایی که بررسی اولیه از نظر مورفولوژی کلنی و میکروسکوپی به آسپرژیلوس فلاووس یا پارازیتیکوس شبیه بودند، جهت تشخیص برای استخراج DNA انتخاب و با پرایمرهای مربوطه PCR شدند.

برای استخراج DNA ژنومیک از گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس* جدا شده از خوراک دام، ابتدا با

Archive of SID

www.SID.ir

روش فریزدراینگ به وسیله نیتروژن مایع، نمونه‌های قارچی خرد شدند؛ سپس جهت استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) استفاده شد. در پایان، تیوپ حاوی DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت شناسایی مولکولی *این دو گونه آسپرژیلوس* جدا شده از خوراک دام، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای FlA1 و PAR1 انجام شد (جدول ۲). بدین منظور DNA ژنومیک دو گونه *آسپرژیلوس* جدا شده به عنوان الگو درنظر گرفته شد و PCR طی سیکل‌های حرارتی مطابق جدول ۳ انجام شد. در پایان، محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با استفاده از UV مورد بررسی قرار گرفت.

**جدول ۲.** نمونه‌ها و کد اختصاری

| ردیف | نمونه | کد اختصاری |
|---|---|---|
| ۱ | سویا ۱۶ | ۱ |
| ۲ | پنبه دانه ۱۲/۱ | ۲ |
| ۳ | سیلو ذرت ۱۲/۲ | ۳ |
| ۴ | سویا ۳۱/۱ | ۴ |
| ۵ | پنبه دانه ۳۱/۱ | ۵ |
| ۶ | سویا ۳۱/۲ | ۶ |
| ۷ | ذرت ۳۵/۳ | ۷ |
| ۸ | سبوس گندم۴۱/۱ | ۸ |
| ۹ | سویا ۴۱/۲ | ۹ |
| ۱۰ | سیلو ذرت ۳۱/۱ | ۱۰ |
| ۱۱ | جو ۳۱/۲ | ۱۱ |

برای شناسایی *دو گونه آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس* بالقوه مولد آفلاتوکسین، از پرایمرهای OMT1، NOR1، AFR1 استفاده شد و واکنش PCR جهت تعیین *دو گونه آسپرژیلوس* مولد آفلاتوکسین با استفاده از توالی مشخص ژنومیک دو گونه *آسپرژیلوس* به عنوان الگو (جدول ۲) و طی سیکل حرارتی مطابق جدول ۴ انجام گرفت و محصول PCR نیز با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد حاوی DNA Safe Stain الکتروفورز شده و با استفاده از UV مورد بررسی قرار گرفت.

**جدول ۴.** برنامه دمایی نمونه ها در حضور FLA1

| دما(سانتی‌گراد) | ۹۵ | ۹۵ | ۵۸ | ۷۲ | ۷۲ |
|---|---|---|---|---|---|
| زمان* | ۵min | ۳۰s | ۳۰s | ۴۰s | ۷min |

Min= دقیقه؛ s= ثانیه

**جدول ۵.** برنامه دمایی نمونه ها در حضور پرایمرهای( Nor1 و Omt1 و AF1R)

| دما(سانتی‌گراد) | ۹۶ | ۹۵ | ۶۶ | ۷۲ | ۷۲ |
|---|---|---|---|---|---|
| زمان* | ۶min | ۴۰s | ۴۵s | ۹۰s | ۱۰min |

Min= دقیقه؛ s= ثانیه

## یافته‌ها

تمامی نمونه های خوراک دام جمع آوری شده از ۴۱ گاوداری مختلف از لحاظ آلودگی با دو گونه *آسپرژیلوس* مورد بررسی قرار گرفت.

خوراک دام جمع آوری شده شامل یونجه، ذرت، کاه، سیلوذرت، جو، سویا، کنجاله کلزا، کنجاله پنبه دانه، سبوس گندم و گندم بود. خوراک مصرفی دام در گاوداری‌ها یکسان نبود. در خوراک مصرفی دام، یونجه و کاه به صورت یکسان در تمامی گاوداری‌ها به تغذیه دام می‌رسید، در صورتی که ذرت در ۱۱ گاوداری، سیلوی ذرت در ۱۵ گاوداری، جو در ۳۱ گاوداری، سویا در ۱۷ گاوداری، کنجاله کلزا در ۲ گاوداری، کنجاله پنبه دانه در ۴ گاوداری، سبوس گندم در ۱۱ گاوداری، و گندم در ۳۵ گاوداری جهت تغذیه دام مورد استفاده قرار می‌گرفت (نمودار ۱). نمونه‌های ذرت و سیلوی ذرت، جو، سویا، کنجاله پنبه دانه، و سبوس گندم آلوده به *آسپرژیلوس*

**جدول۳.** مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

| نام اختصاری | نام پرایمر | سکانس(′۵ به ′۳) | طول محصول PCR |
|---|---|---|---|
| A | Nor1 | Nor-1F 5′ -ACC GCT ACG CCG GCA CTC TCG GCAC—3′<br>Nor-1R 5′-GTT GGC CGC CAG CTT CGA CAC TCC G-3′ | 400bp |
| B | Omt1 | Omt-1F 5′-GGC CCG GTT CCT TGG CTC CTA AGC-3′<br>Omt-1R 5′ -CGC CCC AGT GAG ACC CTT CCT CG-3′ | 1235bp |
| C | AFlR | *aflR*F 5′ -TAT CTC CCC CCG GGC ATC TCC CGG-3′<br>*aflR*R 5′-CCG TCA GAC AGC CAC TGG ACA CGG-3′ | 1032bp |
| D | FLA1 | Fla1-F5′ -GTAGGGTTCCTAGCGAGCC-3′<br>Fla2-R5′-GGAAAAAGATTGATTTGCGTTC-3′ | 500 bp |
| E | PAR1 | Par1-F5′GTCATGGCCGCCGGGGGCGTC-3′<br>Par2-R5′CCTGAAAAAATGGTTGTTTTGCG-3′ | 500 bp |

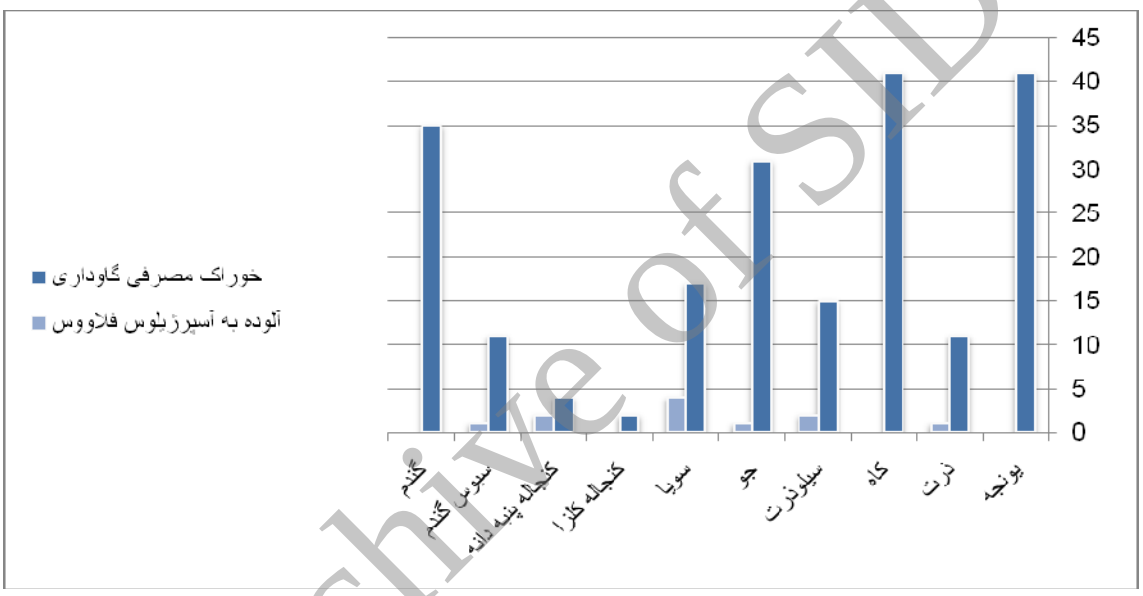
Archive of SID

www.SID.ir

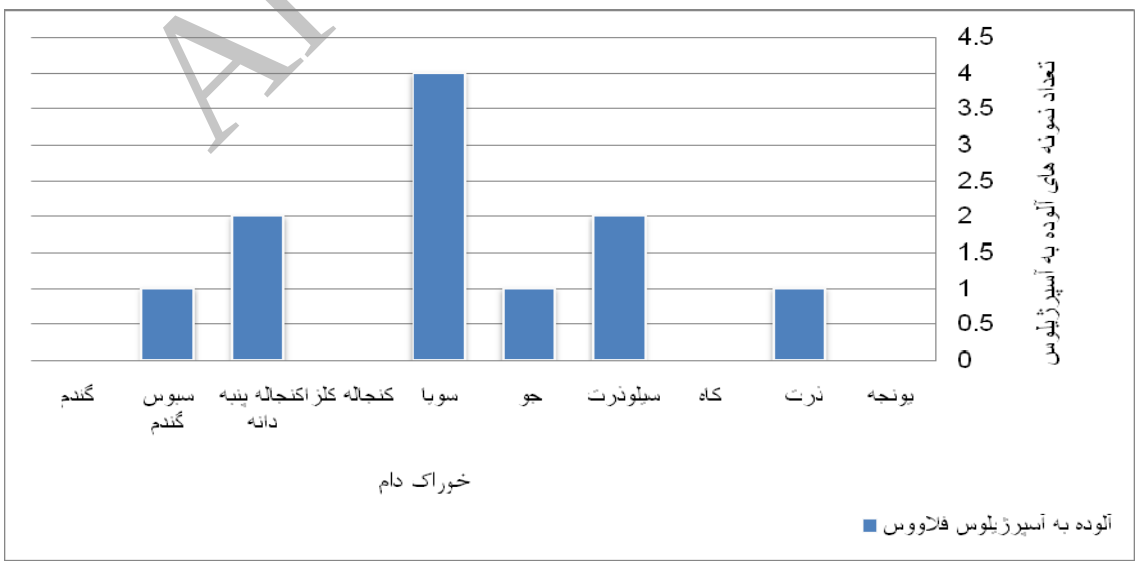
*فلاووس* بودند، اما سایر مواد موجود در خوراک دام فاقد آلودگی با *آسپرژیلوس فلاووس* بودند (نمودار۲).

پس از شناسایی اولیه گونه های *آسپرژیلوس* جداشده، روش PCR جهت شناسایی مولکولی استفاده شد. نتایج واکنش PCR با پرایمر FLA1 در حضور کنترل مثبت و منفی، ایجاد باند ۵۰۰ bp نشان داد که همه نمونه‌ها متعلق به *آسپرژیلوس فلاووس* هستند (شکل ۱) و با پرایمر PAR1 که مشخص کننده *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* است، در حضور کنترل مثبت و منفی هیچ باند (۵۰۰ bp) جفت بازی مشاهده نشد.

نتایج واکنش PCR با پرایمر NOR1،OMT1، AFR1 و در حضور کنترل مثبت و منفی نشان داد که *آسپرژیلوس فلاووس* های جدا شده همگی به طور بالقوه می‌توانند توکسین‌زا باشند. در حضور پرایمرAFLR، باند bp ۱۰۳۲ (شکل ۲) و در حضور پرایمر Omt1، باند bp ۱۲۳۵ (شکل ۳) و در حضور پرایمر NOR1، باند bp ۴۰۰ (شکل ۴) مشاهده شد. بررسی PCR نشان داد که برای همه *آسپرژیلوس فلاووس*های شناسایی شده، هر سه ژن *nor1،omt1* و *afr1* در مسیر تولید آفلاتوکسین مثبت بودند.

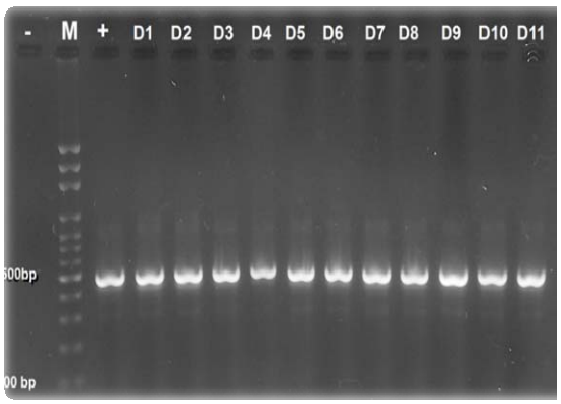



**نمودار ۱.** نسبت خوراک مصرفی به نمونه های آلوده به قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*

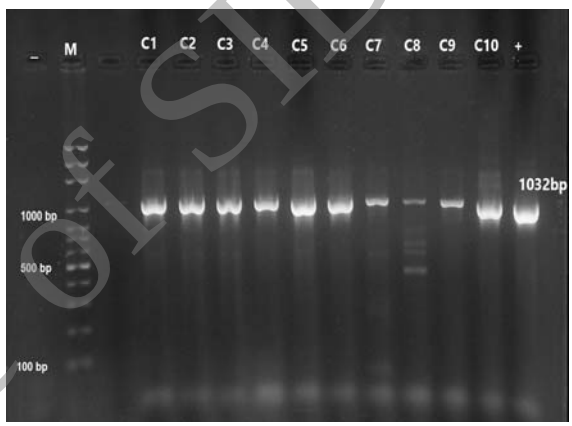



**نمودار۲.** حداکثر آلودگی در خوراک دام

Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۱.** ستون ۱- کنترل منفی، ستون ۲ مارکر، ستون ۳ کنترل مثبت، ستون ۴ تا ۱۴ نمونه های آلوده درحضور پرایمر FLA1




**شکل۲.** ستون ۱- کنترل منفی ، ستون ۲ مارکر، ستون ۳ کنترل مثبت (سوش استاندارد PTCC 5006(IR6) از سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران)، ستون ۴ تا ۱۴ نمونه‌های آلوده که در حضور پرایمر AFLR

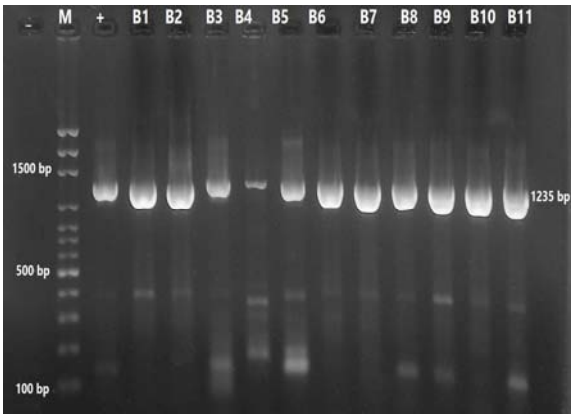
## بحث

بررسی بر روی خوراک دام‌های از دام‌داری‌های مختلف از شهر قدس– شهریار نشان داد که ترکیب خوراک دام مورد استفاده در دامداری های مورد مطالعه، متشکل از یونجه، ذرت، کاه، سیلوذرت، جو، سویا، کنجاله کلزا، کنجاله پنبه دانه، سبوس گندم، و گندم است. مطالعات میکروسکوپی ترکیبات خوراک دام نشان داد که دو گونه از *آسپرژیلوس* بر روی این مواد رشد می‌کنند و آن‌ها را آلوده می‌سازند، زیرا این مواد به علت دارا بودن فاکتورهای لازم جهت رشد قارچ ها مانند pH، کربوهیدرات ها، چربی، املاح و نمک، برای رشد این کپک‌ها مناسبند. آب و هوای گرم و مرطوب، انبارداری نامناسب، و عدم اطلاع کافی دامداران در نگه دارای صحیح خوراک دام شرایط مناسبی را برای رشد کپک ها فراهم می‌کنند (۱۵،۱۶). دو گونه از *آسپرژیلوس* به طور مشترک در همه دامداری‌های مورد مطالعه در این تحقیق بر روی خوراک های دام مشاهده شد. Sala در سال ۲۰۰۵ با مطالعه برروی ۷۸ نمونه خوراک دام از کشورهای تایلند و ویتنام، آلودگی ۹۴٪ نمونه‌ها را به گونه‌های *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* گزارش کرد (۲۰). همچنین Bergofer و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در استرالیا گندم و آرد گندم مورد استفاده در خوراک دام دامداری ها را مورد مطالعه قرار دادند و کپک‌های *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم* و *کلادوسپوریوم* را جداسازی و شناسایی کردند (۲۱). Halt نیز دانه‌های گندم، جو و ذرت مورد استفاده در دامداری های کشور کرواسی را مورد بررسی قرار داد و گونه *آسپرژیلوس فلاووس* را به عنوان عامل اصلی آلوده کننده معرفی کرد که نتایج تحقیق کنونی با نتایج فوق تا حدودی مطابقت دارد (۲۲). Sassahara و همکارانش در مطالعه‌ای به بررسی بروز آفلاتوکسین در جیره غذایی دام‌ها پرداختند. آنها عنوان کردند که قارچ‌ها در طیف وسیعی از غذاها شامل غذای فشرده و سبوس‌دار مخصوص حیوانات یافت می‌شوند و می‌توانند تحت شرایط خاصی تولید مایکوتوکسین کنند (۲۳). همچنین Bergofer و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در استرالیا، گندم و آرد گندم مورد استفاده در خوراک دام دامداری‌ها را مورد مطالعه قرار دادند و کپک‌های *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم* و *کلادوسپوریوم* را جداسازی و شناسایی کردند (۲۱) که نتایج تحقیق کنونی با نتایج فوق مطابقت دارد.

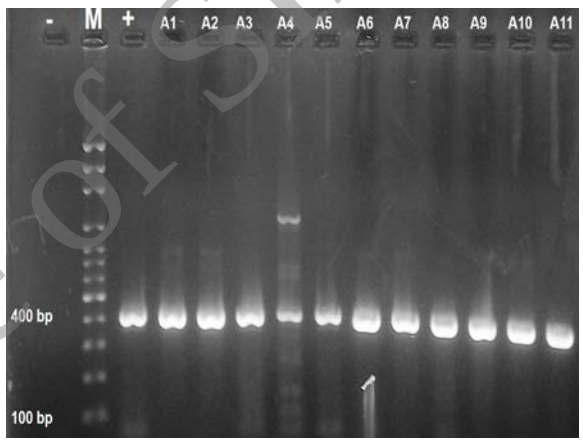
*آسپرژیلوس* تولید کننده آفلاتوکسین است و بیشتر به عنوان قارچ های انباری محسوب می‌شود و در شرایط دارای رطوبت و درجه حرارت بالا تکثیر پیدا می‌کند. بنابراین آلودگی به آفلاتوکسین تقریبا به طور عمده در خوراک‌های مناطق مرطوب و گرمسیری، از قبیل فرآورده‌های جانبی (کنجاله‌های) دانه‌های روغنی مثل بادام زمینی، پنبه دانه و پالم مشاهده می‌شود. آلودگی ذرت به آفلاتوکسین نیز همچنین یک مشکل مهم در مناطق مرطوب محسوب می‌شود. در این مناطق، *آسپرژیلوس فلاووس* ممکن است قبل از برداشت، محصول ذرت را آلوده کند و این قارچ در موقع انبار کردن محصول در آن باقی بماند (۲۴، ۲۵).

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۳.** ستون ۱- کنترل منفی ، ستون ۲ مارکر، ستون ۳ کنترل مثبت (سوش استاندارد PTCC 5006(IR6) از سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران)، ستون ۴ تا ۱۴ نمونه های آلوده در حضور پرایمر Omt1




**شکل ۴.** ستون ۱- کنترل منفی ، ستون ۲ مارکر، ستون ۳ کنترل مثبت (سوش استاندارد PTCC 5006(IR6) از سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران)، ستون ۴ تا ۱۴ نمونه های آلوده درحضور پرایمر Nor1

در این تحقیق، از واکنش PCR و پرایمر FLA1 جهت شناسایی مولکولی *آسپرژیلوس فلاووس* و پرایمر PAR1 برای شناسایی مولکولی *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* از خوراک دام استفاده شد. نتایج واکنش PCR تنها گونه *آسپرژیلوس فلاووس* جدا شده، از خوراک دام را باند ۵۰۰ bp نشان داد که با شناسایی اولیه دو گونه *آسپرژیلوس* (*فلاووس* و *پارازیتیکوس*) با استفاده از تست های میکروسکوپی و ماکروسکوپی مطابقت نداشت. مشاهده باند در حضورFLA1 تایید کننده این مطلب است که نمونه‌ها *آسپرژیلوس فلاووس* هستند و باندهای مشاهده شده درحضور پرایمر AFLR، Omt1 و Nor1 گویای آن است که نمونه‌ها می‌توانند به طور بالقوه تولید کننده آفلاتوکسین باشند.

Erami و همکارانش با بررسی PCR برای شناسایی قارچهای آفلاتوکسیژنیک نشان دادند که ۱۲ نمونه با ۴ پرایمر *aflR*، *omt-1*، *ver-1*، *nor-1* با استفاده از تکنیک PCR مثبت بودند و کنترل مثبت نیز مثبت بود. نتایج مثبت به دست آمده تنها با *A. flavus* بود و نتایج نشان دادند که PCR روش حساس و سریعی است (۲۵). در مطالعه حاضر نیز نتایج واکنش PCR با پرایمر AFR1، OMT1 و NOR1 به ترتیب باندهای ۱۰۳۲bp، ۱۲۳۵ bp و ۴۰۰ bp مشاهده شد. ابراهیم زاده و همکارانش در مطالعه‌ای توصیفی، با کشت ۱۱۳ نمونه آرد جمع آوری شده از نانوایی‌های سطح شهر زاهدان و در محیط‌های کشت اختصاصی و سپس مطالعه مورفولوژیک کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت، با بررسی شیوع آلودگی نمونه‌های آرد به گونه‌های مختلف قارچ‌های مولد مایکوتوکسین‌ها، به این نتیجه رسیدند که از ۱۱۳ نمونه مورد آزمایش، ۷۹ نمونه فاقد آلودگی قارچی و ۳۴ نمونه دارای آلودگی قارچی بیش از حد مجاز بودند و از میان ۳۴ نمونه بالاترین میزان شیوع در میان قارچ‌های مولد مایکوتوکسین به ترتیب مربوط به *آکرومونیوم* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بودند (۲۶). آزاد بخت و همکارانش با بررسی میزان آلودگی ضایعات نان به آفلاتوکسین در استان لرستان و با نمونه گیری از ۱۸۰ نمونه ضایعات نان خشک و تشخیص آلودگی نمونه‌ها به آفلاتوکسین نشان دادند شیر گاوهایی که از نان خشک تغذیه می‌کنند، دارای مقادیر فراوانی از متابولیت‌های آفلاتوکسین است (۲۶). ریاضی پور و همکارانش با اندازه گیری مایکوتوکسین T-2 در غلات مصرفی در یک مرکز نظامی، نشان دادند که همه نمونه‌های آزمایش شده کم و بیش به سم T-2 آلودگی داشتند و دامنه آلودگی آنها از ۷/۹ تا ۶۵/۴ میکروگرم در کیلوگرم متغیر بود (۲۷). با توجه به اینکه *آسپرژیلوس‌های* جدا شده از خوراک دام، به خصوص *آسپرژیلوس فلاووس*، یکی از مولدین اصلی آفلاتوکسین های کارسینوژنیک هستند، توصیه می‌شود تا شرایط استاندارد جهت انبار خوراک دام در دامداری‌ها رعایت شود و به دامداران نیز آموزش های صحیح جهت نگهداری و انبار مناسب خوراک دام داده شود تا از آلودگی قارچی خوراک دام جلوگیری وسلامت دام و افراد مصرف کننده از محصولات دامی تامین شود (۲۸، ۲۹).

Archive of SID

www.SID.ir

**تشکروقدردانی**

نویسندگان از حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تشکر می کنند.

## *REFERENCES*

1. Sun KY, Guo L, Wang Y, Liu P, Zhu W. Indole diterpenoids and isocoumarin from the fungus, Aspergillus flavus, isolated from the prawn, penaeus vannamei. Mar Drugs 2014; 12:3970-81.

2. Esper RH, Gonçalez E, Marques MO, Felicio RC, Felicio JD. Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by Aspergillus flavus. Front Microbiol 2014;5:269-78.

3. Tian J, Zeng X, Zeng H, Feng Z, Miao X, Peng X. Investigations on the antifungal effect of nerol against Aspergillus flavus causing food spoilage. Sci World J 2013;23:12-22.

4. Forouharmehr A, Harkinezhad T, Qasemi-Panahi B. Evaluation of STAT5A gene expression in aflatoxin B1 treated bovine mammary epithelial cells. Adv Pharm Bull 2013; 3:461-64.

5. Prado G, Altoé AF, Gomes TC, Leal AS, Morais VA, Oliveira MS, et al. Occurrence of aflatoxin B1 in natural products. Braz J Microbiol 2012;43:1428-36.

6. Mohammadpour H, Moghimipour E, Rasooli I, Fakoor MH, Alipoor Astaneh S, et al. Chemical composition and antifungal activity of cuminum cyminum L. essential oil from alborz mountain against Aspergillus species. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2012;7:50-55.

7. Ismaiel AA, Rabie GH, Kenawey SE, Abd El-Aal MA. Efficacy of aqueous garlic extract on growth, aflatoxin B1 production, and cyto-morphological aberrations of Aspergillus flavus, causing human ophthalmic infection: topical treatment of A. flavus keratitis. Braz J Microbiol 2012;43:1355-64.

8. Mardani M, Rezapour S, Rezapour P. Survey of aflatoxins in Kashkineh: A traditional Iranian food. Iran J Microbiol 2011;3:147-51.

9. Cary JW, Klich MA, Beltz SB. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of Aspergillus section Flavi. Mycologia 2005;97:425-32.

10. Keller LA, Pereyra CM, Cavaglieri LR, Dalcero AM, Rosa CA. Fungi and mycotoxins from pre- and poststorage brewer's grain intended for bovine intensive rearing. ISRN Vet Sci 2012;5:21-30.

11. Abdel-Hadi AM, Caley DP, Carter DR, Magan N. Control of aflatoxin production of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. Toxins (Basel) 2011;3:647-59.

12. Almeida IF, Martins HM, Santos SM, Freitas MS, da Costa JM, D. Almeida Bernardo FM. Mycobiota and aflatoxin B1 in feed for farmed sea bass (Dicentrarchus labrax). Toxins (Basel) 2011;3:163-71.

13. Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by Aspergillus flavus. J R Soc Interface 2012;9:757-67.

14. Leema G, Kaliamurthy J, Geraldine P, Thomas PA. Keratitis due to Aspergillus flavus: clinical profile, molecular identification of fungal strains and detection of aflatoxin production. Mol Vis 2010;16:843-54.

15. Ehrlich KC, Chang PK, Scharfenstein LL Jr, Cary JW, Crawford JM, Townsend CA. Absence of the aflatoxin biosynthesis gene, norA, allows accumulation of deoxyaflatoxin B1 in Aspergillus flavus cultures. FEMS Microbiol Lett 2010;305:65-70.

16. Ellis EM. Protection against aflatoxin B1 in rat--a new look at the link between toxicity, carcinogenicity, and metabolism. Toxicol Sci 2009;109:1-3.

17. Yehia RS. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from Pleurotus ostreatus. Braz J Microbiol 2014;45:127-33.

18. Al-Hammadi S, Marzouqi F, Al-Mansouri A, Shahin A, Al-Shamsi M, Mensah-Brown E, et al. The cytotoxicity of aflatoxin b1 in human lymphocytes. Sultan Qaboos Univ Med J 2014;14:e65-71.

19. Yazdanpanah H, Zarghi A, Shafaati AR, Foroutan SM, Aboul-Fathi F, Khoddam A, et al. Analysis of aflatoxin b1 in Iranian foods using HPLC and a monolithic column and estimation of its dietary intake. Iran J Pharm Res 2013;12: 83-89.

20. Sala A. Updated profile of aflatoxin and aspergillus section flavi contamination in ric and its byproducts from the Philippines J Toxicol 2005; 22: 429-39.

21. Berghofer LK, Hocking AD. Miskelly D. Microbiology of wheat and flourmilling in Australia. International Food Microbiol 2003; 85: 137-49.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Halt M. Aspergillus flavous and aflatoxin B1 in flour production. Europ J Epidem 1994; 10: 555-58.

23. Sassahara M .Aflatoxin occurrence in foods tuff supplied to dairy cattle and aflatoxin m1 in raw milk in the north of parara state. Food Chem Toxicol 2005; 43: 981-84.

24. Erami M, Hashemi SJ, Pourbakhsh SA, Shahsavandi S, Mohammadi S, Shooshtari AH, et al. Application of PCR on detection of aflatoxinogenic fungi. Archives of Razi Institute 2007; 62: 95-100.

25. Ebrahimzadeh A, Mohammadzadeh Rostami F, Salimi Khorashad A. Prevalence of fungal contamination of flour in bakeries in the city of Zahedan in 92 years. Med J Mashhad Uni Med Sci 2014; 57: 705-10.

26. Azadbakht N, Khosravinejad K, Tarahi MJ. Study Aflatoxin contamination of bread losses in Lorestan province. Med J LorestanUni Med Sci 2009; 10:1-10.

27. Riazipour M, Vatani H, Tavakoli HR, Mehrabi Tavana A, Afshari MA, Kachuyi R, et al. Measuring T2 mycotoxins in grain measure used in a military facility in winter 1385. Military Medicine 2009; 10: 35-43.

28. Tarık H. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. Veterrin Arhiv 2005; 75: 57-65.

29. Nemati M. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. Food Control 2010; 21: 1022-4.

Archive of SID

www.SID.ir