مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره چهارم (پیاپی ۲۵) زمستان ۱۳۹۴
صفحات ۳۳۶-۳۳۰

Short Communication

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 میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

چکیده

مایکوتوکسین ها متابولیت های ثانویه‌ای هستند که عمدتاً توسط گونه‌هایی از قارچ‌های *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنی سیلیوم* تولید می‌شوند. از این میان سهم گونه‌های *آسپرژیلوس* قابل توجه می‌باشد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی عوامل قارچی توکسین زا از مواد دانه‌ای پرمصرف انبارشده 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 سابرودکستروز آگار، سابرودکستروز 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 *آسپرژیلوس* بود. گونه *آسپرژیلوس فلاووس* با ۱٤ درصد دارای بیشترین فراوانی در میان گونه‌های *آسپرژیلوس* بود. همچنین افلاتوکسین های B1، B2 و G1 از نمونه‌های جنس *آسپرژیلوس* 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 .

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹٤

مقدمه

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 *آسپرژیلوس* (*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).

گونه های *آسپرژیلوس* هنگام خشک کردن و نگهداری محصولات آنها را آلوده می نمایند (۳ و ٤). سمومی که توسط جنس *آسپرژیلوس* تولید می شود شامل آفلاتوکسین های نوع B، G و M، اکراتوکسین A، استریگماتوسیستین و اسید سیکلوپیازونیک می باشند. در این میان افلاتوکسین ها به دلیل ایجاد بیماری آفلاتوکسیکوسیس در انسان و حیوانات از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۵ و ٦).

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

*) آدرس برای مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۹۱۰٦۰۰۵۵۲۹ پست الکترونیک: faezi_m@yahoo.com

افلاتوکسین های B_1 و B_2 را در نمونه های گندم تایید نمودند. همچنین جنس های *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم* و *فوزاریوم* دارای بیش ترین میزان فراوانی در نمونه ها بودند (۷).

در بررسی برگوفر (Berghofer) و همکاران در استرالیا بر روی گندم و آرد گندم از نظر فلور میکروبی، شایع ترین کپک های جداسازی شده شامل *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم* و *کلادوسپوریوم* (*Cladosporium*) بودند (۸).

در مطالعه خسروی (Khosravi) همکاران *آسپرژیلوس* (۶۳/۲ درصد)، *پنی سیلیوم* (۳۶/۸ درصد)، *موکور* (*Mucor*) ۳۱/۶ درصد) و *کلادوسپوریوم* (۲۶/۳ درصد)، به ترتیب فراوان ترین قارچ های 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 نمونه های گندم به انواع *آسپرژیلوس* آلوده بودند. از طرفی افلاتوکسین های G_1 و B_1 نیز در نمونه ها شناسایی شدند (۱۰).

هدف از این مطالعه جداسازی عوامل قارچی توکسین زا از مواد دانه‌ای پرمصرف (گندم و ذرت) انبارشده در سیلو های شهر کرمان بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری: در این مطالعه روش نمونه گیری بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به شماره ۱۲۰۰٤ انجام شد (۱۱). این پژوهش به صورت بنیادی و تجربی بر روی ۸۳ نمونه گندم و ذرت جمع آوری 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 محموله ها در بازرسی های قرنطینه ای 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 انباشته ای با وزن تقریبی ۱ کیلوگرم تهیه شد. نمونه ها پس از بسته‌بندی و برچسب گذاری، همراه با نمونه‌های هوایی که بر اساس موقعیت و خصوصیات منطقه نمونه‌گیری، با پلیت های در باز و با استفاده از محیط سابرودکستروز 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 پلیت های حاوی محیط SDA (محیط سابرودکستروز آگار) کشت داده شد (۹). علاوه بر این پس از تخلیه مایع روماند، از رسوب حاصل نیز بر روی پلیت های 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، قارچ های ساپروفیت حذف گردیدند. به منظور خالص سازی جدایه های به دست آمده، نمونه ها 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 میلی متر به درون لوله های آزمایش حاوی آب مقطر استریل منتقل و به خوبی تکان داده شد. به منظور خالص سازی جدایه ها از سوسپانسیون اسپور به دست آمده، ۲۰۰ میکرولیتر از آن بر روی سطح محیط PDA ریخته شد. محیط های 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 پرگنه های ظاهر شده به عنوان کشت خالص به محیط جدید PDA منتقل گردیدند (۹، ۱۰ و ۱۲). شناسایی قارچ های جداسازی شده با توجه به مشخصات مورفولوژی شامل رنگ پرگنه، ویژگی ریسه، نوع اندام بار دهی، شکل و رنگ اسپورها و با توجه به کلیدهای شناسایی بارنت و هانتر (۱۳)، کلیک (۱٤) و دوگان (۱۵) انجام گرفت.

ج) *شناسایی توکسین های قارچی:* تشخیص سموم بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۲۰۰٤ از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام پذیرفت (۱۱). به این منظور نمونه های قارچی که به عنوان *آسپرژیلوس* شناسایی شده بود، در محیط مایع سابرو دکستروز کشت و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و با ۱۳۷ دور در دقیقه، به مدت ۳ روز نگهداری شدند. پس از آن میسیلیوم های 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 ستون های 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 افزار های *Epi Info 6* و *Excel* انجام گرفت. در این مطالعه p<۰/۰۵ به عنوان مرز معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

از مجموع نمونه های جمع آوری شده قارچ های *آسپرژیلوس* و *موکور* بیشترین و *اورئوبازیدیوم* کمترین فراوانی را در میان قارچ های جداسازی شده داشتند (جدول ۱). در پژوهش حاضر از بین ۲٦ نمونه اخذ شده از سیلوی شماره یک، ۱۰ جدایه (۳٦٪) به عنوان *آسپرژیلوس* شناسایی شدند. این در حالی است که از بین ۲۵ نمونه اخذ شده از سیلوی شماره دو، ۱٤ جدایه (۵۳٪) به عنوان *آسپرژیلوس* شناسایی شدند (p=۰/۱۵۷). همچنین از مقایسه میزان فراوانی جدایه های *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) شناسایی شده از دو سیلو، ٤۰٪ از کل *آسپرژیلوس* های شناسایی شده از سیلو شماره یک و ۳٦٪ از کل *آسپرژیلوس* های جدا شده از سیلو شماره دو، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. در مقایسه جدایه های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (*Aspergillus fumigatus*) دو سیلو که شامل ۳۰٪ از کل *آسپرژیلوس* های جدا شده از سیلوی اول و ۵۰٪ از *آسپرژیلوس* های جدا شده از سیلوی دوم بودند، اختلاف معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر از میان نمونه های گندمی که آلودگی قارچ *آسپرژیلوس* در آنها تشخیص داده شد، ۱٤٪ 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 نمونه های ذرت به ترتیب ۲۵ و ۸ درصد بود (p=۰/۹۸۵).

با مقایسه انجام گرفته بین جدایه های *آسپرژیلوس فلاووس* در نمونه های گندم و ذرت، رابطه معنی داری بین حضور قارچ و نوع نمونه مشاهده نشد.

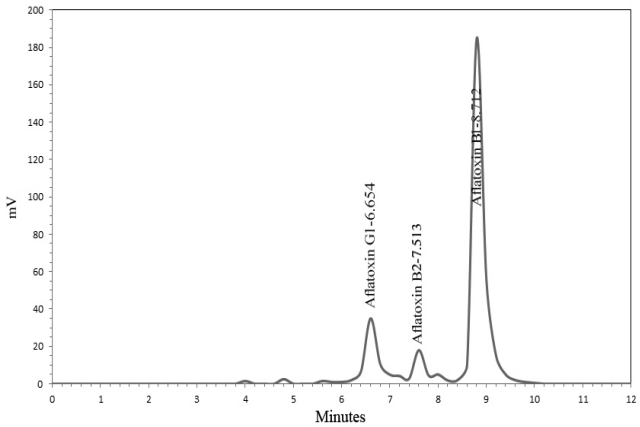
در این پژوهش، ۳۸ جدایه *آسپرژیلوس* به منظور انجام مراحل تشخیص سم آماده و با روش HPLC بررسی شدند. در این مطالعه افلاتوکسین های G_1، B_1 و B_2 در نمونه ها شناسایی گردیدند (شکل های ۱ تا ۳). از این میان، سیلوی شماره یک ۷۵ درصد از کل سموم تشخیصی و سیلوی شماره دو ۲۵ درصد آن را تشکیل داد (p=۰/۷۵٤).

جدول ۱: درصد فراوانی قارچ های جداسازی شده از نمونه های گـنـدم و ذرت در کرمان.

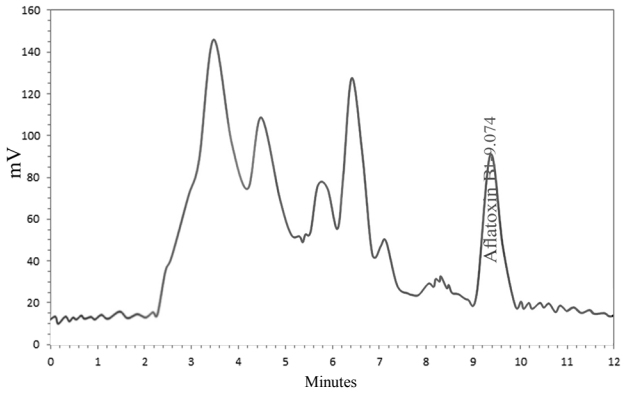
نام جنس	تعداد	درصد فراوانی
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۱۲	٪۱۲
موکور	۱۹	٪۱۸
آسپرژیلوس فلاووس	۱۵	٪۱٤
پنی سیلیوم	۱۱	٪۱۱
آلترناریا	٦	٪٦
آسپرژیلوس نیجر	۱۱	٪۱۱
ریزوپوس	۹	٪۹
فوزاریوم	۷	٪۷
اورئوبازیدیوم	۱	٪۱
مخمر	٤	٪٤
استاکی بوتریس	٤	٪٤
استمفیلیوم	۲	٪۲

بحث

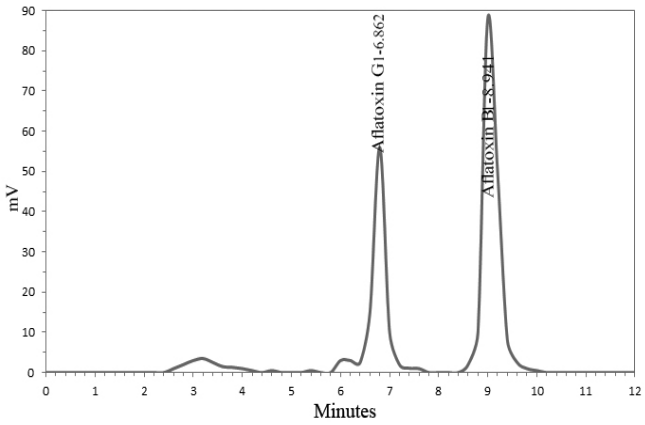
در این پژوهش ۸۳ نمونه از مواد دانه ای پر مصرف شامل گندم و ذرت، جمع آوری شد. تمامی نمونه ها دارای آلودگی قارچی بودند. در نمونه های ذرت، جنس *آسپرژیلوس* بیشترین فراوانی را در میان قارچ های جداسازی شده به خود اختصاص داد. در



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 سم تشخیصی افلاتوکسین B1.

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 B_1 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 *آسپرژیلوس* و *فوزاریوم* آلوده می باشند (۱٦). در مطالعه آنها، جنس *آسپرژیلوس* با ۷۰ و *فوزاریوم* با ۲٤ درصد جنس های غالب را تشکیل دادند. همچنین از میان گونه های مختلف *آسپرژیلوس* نیز *آسپرژیلوس فلاووس* گونه غالب را تشکیل می داد. علاوه بر این آنها تولید افلاتوکسین های گروه B و G را نیز گزارش نمودند (۱٦). همچنین در مطالعه دالال (Dawlal) و همکاران جنس های آلوده کننده ذرت در آفریقای جنوبی *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم*، *پنی سیلیوم* و *ریزوپوس* گزارش گردید (۱۷). در این مطالعه در مورد نمونه های گندم نیز جدایه های جنس *آسپرژیلوس* بیشترین فراوانی را دارا بودند. از میان گونه های مختلف *آسپرژیلوس* به ترتیب *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بیشترین فراوانی را داشتند. در مورد سموم تشخیصی نیز در نمونه های گندم وارداتی افلاتوکسین های B_1 و B_2 و G_1 و در مورد گندم های داخلی افلاتوکسین های B_1 و G_1 شناسایی شدند.

نتایج به دست آمده در این پژوهش در مورد گندم، با یافته های ریبا (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 *آسپرژیلوس* می باشد. بریکل (Birckl) و همکاران در برزیل ۳۵ نمونه گندم را از نظر حضور قارچ هایی مانند *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* و مایکوتوکسین های مانند افلاتوکسین B_1، B_2، G_1 مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان دهنده حضور افلاتوکسین B_1 و B_2 در نمونه ها بود. همچنین به ترتیب جنس های *آسپرژیلوس*،

پنی سیلیوم و *فوزاریوم* در نمونه ها دارای بیش ترین میزان فراوانی بودند (۷).

نتیجه گیری

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 قارچی و نیز پاکسازی نسبی مزارع از این قارچ ها می توان به طور موثری خطر آلودگی غلات به قارچ را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

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, Avalaible 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/Contaminans/ucm050974.htm, (Accessed: February 2, 2013).

7. Birck1 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. 3nd 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 fungiunder 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.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 4, January 2016

Short Communication

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

Omidreza Sarafi[1], Mohammad Faezi Ghasemi[2], Arash Chaiechi Nosrati[2]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Lahijan branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
[2]Assistant 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.