بررسی کمی و کیفی آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در دو گونه قارچ آسپرژیلوس با روش HPLC

فاطمه اصغرنژاد[۱]، صفرعلی مهدیان[۲*]، بهنام امیری بشلی[۲] و سید سامان سید جعفر نظری[۳]

۱- دانش آموخته سابق کارشناسی ارشد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۲- به ترتیب استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۳- استادیار موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی تجن.

* مسئول مکاتبه: safaralim@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۶

چکیده

آفلاتوکسین‌ها توسط گونه‌های خاصی از قارچ‌های جنس *Aspergillus* تولید می‌شوند و در محصولات غذایی خطر همیشگی برای انسان و حیوان در نظر گرفته می‌شوند. در این پژوهش میزان تولید آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در گونه‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus foetidus* با روش HPLC بررسی شده است. قارچ‌های یاد شده پس از جداسازی و خالص‌سازی، مورد شناسایی قرار گرفته و در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB کشت، سپس در شرایط بهینه‌ی رشد، نگهداری و آفلاتوکسین‌های حاصل از آن‌ها استخراج گردیدند. مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از محیط حاوی آفلاتوکسین از فیلتر عبور داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه گردید. فاز پایینی مخلوط حاصل در محیط خلاء حلال پرانی شد. باقیمانده در سه میلی‌لیتر متانول حل و فیلتر شد. در مرحله‌ی بعد مقدار ۲۰ میکرولیتر از محیط حاوی آفلاتوکسین به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام آن به دست آمد. بر اساس تحلیل داده‌ها، در گونه‌ی *A. foetidus* آفلاتوکسین‌های B_1، B_2 و G_1 به ترتیب به میزان ۸/۷۱، ۲/۳ و ۱/۳ میلی‌گرم در روز ۲٤، و آفلاتوکسین G_2 به میزان ۰/۰۲ میلی‌گرم روز ۲۰ پس از کشت در ۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB به بیشترین مقدار خود رسیدند. در گونه *A. flavus* آفلاتوکسین‌های B_1, B_2 و G_2 به ترتیب به میزان ٤۸۷/۹۲، ۱۸/٤٦ و ۸/۵۷ میلی‌گرم در روز ۲۰، و آفلاتوکسین G_1 به میزان ۱۲٦/٤۹ میلی‌گرم در روز ۲٤ پس از کشت در ۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB به بیشترین مقدار خود رسیدند. بیشترین توکسین تولید شده (٤۸۷/۹۲ میلی‌گرم) از نوع B_1 در قارچ *A. flavus* و کمترین آن (۰/۰۲ میلی‌گرم) از نوع G_2 در قارچ *A. foetidus* بوده است.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، ایمنی غذایی، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا.

مقدمه

آسپرژیلوس نام گروه بزرگی از کپک‌ها است که می‌توانند با تولید نوعی قارچ زهر (مایکوتوکسین) خطرناک انواع محصولات غذایی به ویژه غلات و دانه‌های روغنی را آلوده نمایند. مایکوتوکسین‌ها نیز گروهی از ترکیبات سمی طبیعی قارچ‌ها هستند که در مسیر متابولیسم سلول‌های قارچی تولید می‌شوند. این ترکیبات دارای ساختمان شیمیایی متفاوت بوده و اغلب دارای وزن مولکولی پایین هستند و به علت مقاومت زیاد به گرما همواره به عنوان

تهدیدی برای سلامتی انسان و حیوانات اهلی مطرح بوده‌اند. از جمله مهمترین مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها هستند که عمدتاً توسط دو گونه *Aspergillus flavus* Link و *Aspergillus parasiticus* Speare تولید می‌شوند (رحیمی و همکاران ۱۳۸۷؛ رنجبر ۱۳۸۷). قارچ *Aspergillus foetidus* (Nakazawa) Thom & Raper نیز به عنوان تولید کننده‌ی آفلاتوکسین گزارش شده است (کلیک ۲۰۰۲). آسپرژیلوس بیش از ۱۸۰ گونه دارد و در ایران بیش از ۳٦ گونه از آن‌ها شناسایی شده است (رحیمی ۱۳۸۷). قارچ *A. flavus* تعداد زیادی از گیاهان و محصولات غذایی را آلوده می‌کند. قارچ *A. foetidus* در چند مورد از ایران گزارش شده و گسترش محدودی دارد (ارشاد ۱۳۸۹). قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در خاک و گیاهان در حال فساد در مناطقی که معمولاً دما و رطوبت بیشتری دارند، به ویژه در انبارهای خوراک دام، یافت می‌شوند (الماسیان و همکاران ۱۳۸۷). دمای بهینه برای تولید آفلاتوکسین بین ۲٤ تا ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد می‌باشد و با کاهش میزان رطوبت نسبی، میزان تولید آفلاتوکسین کاهش می‌یابد. آلودگی به آفلاتوکسین اساساً ناشی از نگهداری نامناسب محصولات کشاورزی بعد از برداشت است که به کپک‌های انباری نظیر آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم اجازه می‌دهد روی این محصولات رشد نموده و مایکوتوکسین تولید نمایند. هم‌چنین رطوبت بالا و هوای گرم، برای تولید بیشترین میزان آفلاتوکسین در مواد غذائی لازم است. اکنون مشخص شده است که تولید آفلاتوکسین تنها ناشی از نگهداری نامناسب نیست بلکه این ترکیبات در مرحله‌ی قبل از برداشت و در محصول در حال رشد در مزرعه نیز تولید می‌شوند. گونه‌های آفلاتوکسین‌زای آسپرژیلوس می‌توانند با گیاه سالم یک رابطه پارازیتی برقرار نمایند و زمانی که گیاه تحت استرس قرار گیرد مانند شرایط خشکسالی، مقادیر قابل توجهی آفلاتوکسین تولید نمایند (هوانگ ۲۰۰۷). از این جهت مراجع بهداشتی هر کشور لازم است به طور مرتب غلات و دانه‌های روغنی را مورد آزمایش قرار داده و در صورت تجاوز مقدار مایکوتوکسین‌ها از حد بیشینه مجاز از فروش آن ها جلوگیری کنند. با این وجود توصیه می‌گردد، همواره از مصرف غلات، خشکبار و دانه‌های روغنی که چروکیده شده، تغییر رنگ داده و یا کپک زده‌اند، خودداری شود. جهت بررسی میزان آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی و غذایی چندین روش آنالیزی به کار گرفته می‌شود. این روش‌ها عمدتاً شامل کروماتوگرافی لایه نازک[1]، الایزا[2]، HPLC[3] با آشکارسازهای فلئورسنت و UV می‌باشند. روش HPLC با آشکارساز فلئورسنت، امروزه به عنوان یک روش مناسب سنجش آفلاتوکسین‌ها پذیرفته شده است. در روش HPLC قابلیت شناسائی کیفی و اندازه‌گیری کمی انواع آفلاتوکسین وجود دارد. در این روش حد تشخیص، حساسیت و میزان انتخابی و اختصاصی بودن اندازه‌گیری‌ها افزایش می‌یابد. مزیت اصلی HPLC، سرعت بالا، اتوماسیون و دقت بالای آن است. این روش در مقایسه با سایر روش‌ها قابل اطمینان‌ترین و معمول‌ترین روش مورد استفاده برای آنالیز و شناسائی آفلاتوکسین‌ها بوده و به عنوان یک روش استاندارد و برتر به کار گرفته می‌شود (دسائی و قاش ۲۰۰۳).

در این پژوهش گونه‌ی قارچی *A. flavus* که توانایی تولید آفلاتوکسین بالایی دارد و گونه‌ی *A. foetidus* که توانایی پائینی دارد، برای تولید آفلاتوکسین روی محیط نیمه مصنوعی ساده و ارزان PDB کشت شدند و روند تغییرات کمی و کیفی مقدار آفلاتوکسین تولید شده

[1]Thin Layer Chromatography(TLC)
[2]Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)
[3]High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

توسط این دو گونه در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از HPLC مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی

به منظور جداسازی قارچ آسپرژیلوس نمونه‌هایی از دانه‌های گندم و ذرت از مراکز فروش منطقه ساری جمع-آوری شدند. از هر فروشگاه خوراک دام مقدار ۵۰۰ گرم دانه گندم و ۵۰۰ گرم دانه ذرت تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد.

این دانه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (۳-۱ ثانیه) ضدعفونی شدند و به روش بلاتر در تشتک پتری حاوی سه لایه کاغذ صافی سترون مرطوب کشت داده شدند. پس از هفت تا ده روز قارچ آسپرژیلوس جداسازی و به روش تک اسپور خالص‌سازی شد. قارچ خالص شده روی محیط کشت چاپک داکس آگار کشت داده شد و با استفاده از کلید شناسائی بارنت و هانتر (۱۹۹۸)، جنس آسپرژیلوس تشخیص داده شد. جهت شناسائی گونه‌های آسپرژیلوس، از محیط کشت‌های (چاپک عصاره مخمر آگار[1]، چاپک داکس آگار[2]، چاپک عصاره مخمر آگار سوکروز ۲۰ درصد[3] و عصاره مالت آگار[4]) استفاده شد. قطعه‌ای پنج میلی‌متری از نمونه قارچ در سه نقطه تشتک آزمایش روی محیط کشت مایه‌زنی شد و درون اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۸۰ – ۷۰ درصد به مدت یک هفته نگهداری گردید (آگاروال و سینکلر، ۱۹۹۷). مشخصات مختلف ماکرو و میکرومورفولوژیکی نمونه‌ها (اندازه‌کلونی، رنگ کنیدیوم، رنگ میسیلیوم، رنگ معکوس(زیر تشتک)، ایجاد تراوش، تولید رنگدانه، تولید سختینه، شکل و اندازه وزیکول، تعداد لایه‌ی سلول‌ها روی وزیکول، اندازه، رنگ و وضعیت دیواره‌ی کنیدیوم و نیز پایه و مشخصات فرم جنسی (در صورت تشکیل) بررسی و یادداشت شد و با استفاده از کلید شناسائی کلیک (۲۰۰۲) گونه‌های آسپرژیلوس از هم متمایز و تشخیص داده شدند. در بین گونه‌های شناسایی شده، گونه‌های *A. flavus* و *A. foetidus* انتخاب و در آزمایش بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. سایر گونه‌های به دست آمده (شامل: *A. terreus*، *A. ostianus*، *A. carneus* *A. candidus* *A. ustus* *A. fumigatus*، *A. niger* *A. niveus* *A. auricomus* *A. awamori* و *A. caespitosus* *A. parasiticus* *A. sclerotiorum*) در آزمایشات این پژوهش به کار گرفته نشدند.

تعیین زمان تولید بیشینه آفلاتوکسین

برای این منظور یک قطعه از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار[5] حاوی یکی از گونه‌های *A. flavus* و *A. foetidus* به طور جداگانه به وسیله لوپ سترون به ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB مایع‌زنی شد و در شرایط محیطی(دمای ۲۶ درجه‌ی سانتیگراد، رطوبت ۸۰٪ و تاریکی) در اتاقک رشد نگهداری شد. به منظور بررسی محدوده‌ی زمانی بیشینه تولید آفلاتوکسین، در فواصل زمانی هر ٤ روز به مدت ۳۲ روز آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط هر یک از گونه‌ها از محیط کشت استخراج و میزان تولید توکسین به وسیله HPLC اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

استخراج آفلاتوکسین

به منظور استخراج آفلاتوکسین‌ها از محیط‌کشت مایع PDB، ابتدا محتوای هر یک از فلاسک‌ها به طور یکنواخت

[1] Czapek Yeast Agar(CYA)
[2] Czapek Dox Agar(CZ)
[3] Czapek Yeast Agar with 20% Sucrose(CY20S)
[4] Malt Extract agar(MEA)
[5] Potato Dextrose Agar(PDA)

مخلوط شد. مقدار ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی هر یک از گونه‌های یاد شده از فیلتر کاغذی (واتمن ٤٢ با تخلخل دو تا سه میکرون) عبور داده شد. به محلول فیلتر شده، ۱۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم اضافه شد (فرداس و مگدا ۲۰۰۹؛ ردی و همکاران ۲۰۰۹) و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه درون قیف دکانتور به هم زده شد. پس از گذشت مدت زمان کوتاهی، فاز پایینی شامل حلال کلروفرم و آفلاتوکسین‌های تولید شده جدا شد. این محلول (حاوی آفلاتوکسین) به وسیله دستگاه تبخیر کننده چرخان[1] در دمای ٤٥ درجه‌ی سانتیگراد و تحت خلاء حلال پرانی شد (عباس و همکاران، ۲۰۰٦). باقیمانده در سه میلی‌لیتر حلال متانول[2] دارای خلوص HPLC حل و از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر[3] عبور داده شد. نمونه‌های تغلیظ شده در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری گردیدند. نمونه به دست آمده حاوی آفلاتوکسین‌های تغلیظ شده به منظور شناسائی کیفی و اندازه‌گیری کمی به دستگاه HPLC تزریق شد. برای نمونه شاهد نیز عملیات مشابه در محیط مایع PDB و بدون مایه‌زنی قارچ انجام شد.

آزمایش با اشعه فرابنفش UV

نمونه‌های استخراج شده از محیط کشت مایع، جهت ارزیابی اولیه زیر نور UV[4] با طول موج ٣٦٥ نانومتر قرار داده شدند. نمونه‌های محلول از نظر تابش فلوئورسنت زرد مایل به سبز، آزمایش شدند. وجود آفلاتوکسین در هر یک از نمونه‌ها با انعکاس نور زرد مایل به سبز مشخص گردید (فنته و همکاران، ۲۰۰۱؛ رودریگز و همکاران، ۲۰۰۹). نمونه‌ی شاهد قادر به انعکاس نور زرد مایل به سبز نبود.

شرایط دستگاه HPLC و آنالیز نمونه‌ها

در این پژوهش از دستگاه HPLC شرکت واترز[5] با ستون تجزیه‌ای ODS2 C_{18} (250×4.6 mm, 10µm) استفاده گردید. آشکارسازی آفلاتوکسین‌های جداسازی شده توسط آشکارساز فلوئورسنت در طول موج برانگیختگی ٣٦٥ و طول موج نشر ٤٢٥ نانومتر (فنته و همکاران، ۲۰۰۱) انجام شد. فاز متحرک مورد استفاده مخلوط متانول، آب، استونیتریل (خانافری و همکاران، ۲۰۰۷) و اسیداستیک به ترتیب به مقدار ۲۰، ٥٩، ۲۰ و یک درصد حجمی بود که قبل از اجرای عملیات اقدام به گاز زدائی آن شد. کلیه‌ی حلال‌های مصرفی دارای خلوص HPLC بودند. تزریق نمونه‌ها پس از ثابت گردیدن خط پایه و به حداقل رسیدن نوسانات خط زمینه (نویزهای دستگاهی) با استفاده از میکروسرنگ همیلتون[6] انجام شد. در کلیه‌ی اندازه‌گیری‌ها حجم نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی‌لیتر در دقیقه بود (عباس و همکاران، ۲۰۰٦). شناسایی کیفی آفلاتوکسین‌ها در نمونه مجهول از طریق مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌ها در نمونه‌ی استاندارد (محلول آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1و G_2 با غلظت ٥٠٠ میلی-گرم بر لیتر تهیه شده از موسسه‌ی استاندارد استان مازندران) و نمونه‌ی مجهول انجام شد. برای اندازه‌گیری کمی آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های مجهول از مساحت سطح زیر پیک آن‌ها و مقایسه‌ی آن با سطح زیر پیک نمونه‌ی استاندارد استفاده شد. بدین منظور از سطح زیر پیک‌های آفلاتوکسین‌ها در تزریق‌های تکراری نمونه و نیز سطح زیر پیک‌های آفلاتوکسین در کروماتوگرام

[1]Rotary evaporator, Eyela N-1000, Japan

[2]Merk KGaA, Germany
[3]Einmal filter, Germany
[4]Kruss, Germany

[5]Waters HPLC Empower system
[6]Micro Syringe 50µl, Hamilton and Socorex

استاندارد میانگین‌گیری به عمل آمد. میانگین سطح زیر پیک آفلاتوکسین در نمونه در غلظت استاندارد آفلاتوکسین تزریق شده (۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) ضرب شد و عدد حاصله بر میانگین سطح زیر پیک آفلاتوکسین استاندارد تقسیم شد (فرمول ۱). این عدد غلظت آفلاتوکسین بر اساس واحد در سه میلی‌لیتر عصاره غلیظ محسوب شد (عباس و همکاران، ۲۰۰۶).

$$Cx\left(۳ml\right) = \frac{Ax \times Cs}{As}$$

[۱]

که در آن :

As= میانگین سطح زیر پیک‌های آفلاتوکسین درمحلول استاندارد آفلاتوکسین ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر.

Cs= غلظت استاندارد آفلاتوکسین (۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر).

Ax= میانگین سطح زیر پیک‌های آفلاتوکسین در نمونه.

Cx= غلظت آفلاتوکسین در عصاره تغلیظ شده (۳/۰ میلی‌لیتر).

برای به دست آوردن غلظت آفلاتوکسین در ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع PDB از رابطه‌ی ۲ و برای تعیین میلی‌گرم آفلاتوکسین ترشح شده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع، از رابطه‌ی ۳ استفاده شد (عباس و همکاران، ۲۰۰۶).

$$Cx(۲۵ml) = Cx(۳ml) \times \frac{۳}{۲۵}$$

[۲]

که در آن:

Cx= غلظت آفلاتوکسین در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت

$$mg\,Af(۲۵ml) = \frac{۲۵ \times Cx(۲۵ml)}{۱۰۰۰}$$

[۳]

که در آن:

mg Af= میلی‌گرم آفلاتوکسین در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت

بررسی کروماتوگرام‌ها

پس از تهیه و تزریق نمونه‌ها، کروماتوگرام حاصل از هر نمونه با کروماتوگرام نمونه استاندارد مقایسه شد. وجود و یا عدم وجود افلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 و مقادیر آن‌ها در نمونه‌ها ارزیابی گردید و گونه‌های مورد آزمایش از نظر تولید آفلاتوکسین به طور کمی و

کیفی مقایسه شدند. با توجه به پیک‌های ظاهر شده در زمان بازداری، وجود و عدم وجود آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 و میزان آن‌ها در گونه‌های مورد آزمایش در نظر گرفته شد. منحنی تغییرات برای هر نوع آفلاتوکسین در طی دوره‌ی ۳۲ روزه وارد نرم افزار اکسل شد و با توجه به این منحنی، میزان تولید آفلاتوکسین در دو گونه‌ی شناسایی شده مورد مقایسه‌ی قرار گرفت. بر اساس داده‌های بدست آمده، تغییرات موجود در پیک‌ها و مقایسه گونه‌ها از نظر تولید کمی و کیفی آفلاتوکسین ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

میانگین و خطای معیار از میانگین نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و به وسیله‌ی آزمون دانکن و تجزیه واریانس یک طرفه محاسبه و با هم مقایسه شدند. نتایج بر مبنای ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع محاسبه، ارزیابی و گزارش شدند. (محاسبات بر اساس ۲۵ میلی‌لیتر عصاره انجام شد و جواب به دست آمده از رابطه‌ی ۳ در عدد ۲ ضرب شد تا در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بدست آمد).

نتایج و بحث

نتایج این پژوهش از نظر تغییرات میزان تولید آفلاتوکسین در دو گونه قارچ *A. flavus* و *A. foetidus* طی مدت ۳۲ روز در جدول ۱ نشان داده شده است. مطابق داده‌های این جدول در بین چهار نوع آفلاتوکسین تولید شده در هر دو گونه مورد آزمایش، بیشترین میزان تولید مربوط به آفلاتوکسین B_1 بود و پس از آن به ترتیب آفلاتوکسین‌های G_1، B_2 و G_2 قرار داشته‌اند.

جدول ۱- آفلاتوکسین تولید شده توسط دو گونه قارچ آسپرژیلوس در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع **PDB** طی مدت ۳۲ روز بر حسب میلی‌گرم.

آفلا.	B_1		B_2		G_1		G_2		مجموع آفلاتوکسین‌ها	
زمان (روز)	*A. flavus*	*A. foetidus*	*A. flavus*	*A. foetidus*	*A. flavus*	*A. foetidus*	*A. flavus*	*A. foetidus*	*A. flavus*	*A. foetidus*
٤	١٨٠/٢٣	٠/٣٩	٣/٧٧	٠	٨٨/٦٧	٠/١	٠	٠	٢٧٢/٧٦	٠/٤
٨	٢٥٨/٥٧	٠/٠٦	٦/٦٦	٠	٧٦/٠٧	٠	٠	٠	٣٤١/٣	٠/٠٦
١٢	١٧٣/٠٧	١/٤٦	٢/٩١	٠/٠٢	٩٠/٢٢	٠/٩٢	٠	٠	٢٦٦/٢	٢/٤
١٦	٢٦٤/٦٣	٠/٥٣	٦/٣٨	٠/٠١	٦٩/٦٢	٠/١٨٥	٠	٠	٣٤٠/٦٣	٠/٧٢٥
٢٠	٤٨٧/٩٢	٠/٦٤	١٨/٤٦	٠	١٢٠/٧	٠/٠٨	٨/٥٧	٠/٠٢	٦٣٥/٦٥	٠/٧٤
٢٤	٣٣٢/٩٦	٨/٧١	٩/٩١	٢/٣	١٢٦/٤٩	١/٣	١/٠٧	٠	٤٧٠/٤٣	١٢/٣١
٢٨	٣٨٥/٤٤	٤/٧٩	٨/٨	٠/٠٨	٥/٧٨	٠/٣٧	٠/٥٨٦	٠/٠١	٤٠٠/٦٠	٥/٢٥
٣٢	١١٦٢/٨	٢٦	٢٧/٦٦	٠/٩٢	٩/٤٥	٠/٥٣	٨/٤١	٠/١٨	١٢٠٨/٣٢	٢٧/٦٣
کل	٣٢٤٥/٦٢	٤٢/٥٨	٨٤/٥٥	٣/٣٣	٥٨٧	٣/٤٨٥	١٨/٦٣٦	٠/٢١		
SD	٣٢٣/٤١	٨/٨٧	٨/٤١	٠/٨٢	٤٥/١٢	٠/٤٦	٣/٨٢	٠/٠٦		
Mfl	٤٠٥/٧٠[a]		١٠/٥٦[b]		٧٣/٣٧[b]		٢/٣٢[b]			
Mfo		٥/٣٥[b]		٠/٤١[d]		٠/٤٣[d]		٠/٠٢[d]		

Mfl= میانگین در گونه ***A. flavus*** ؛ **Mfo**= میانگین در گونه ***A. foetidus***؛ **SD** = انحراف معیار؛ حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح (۰/۰۵ ≥P) می‌باشد.

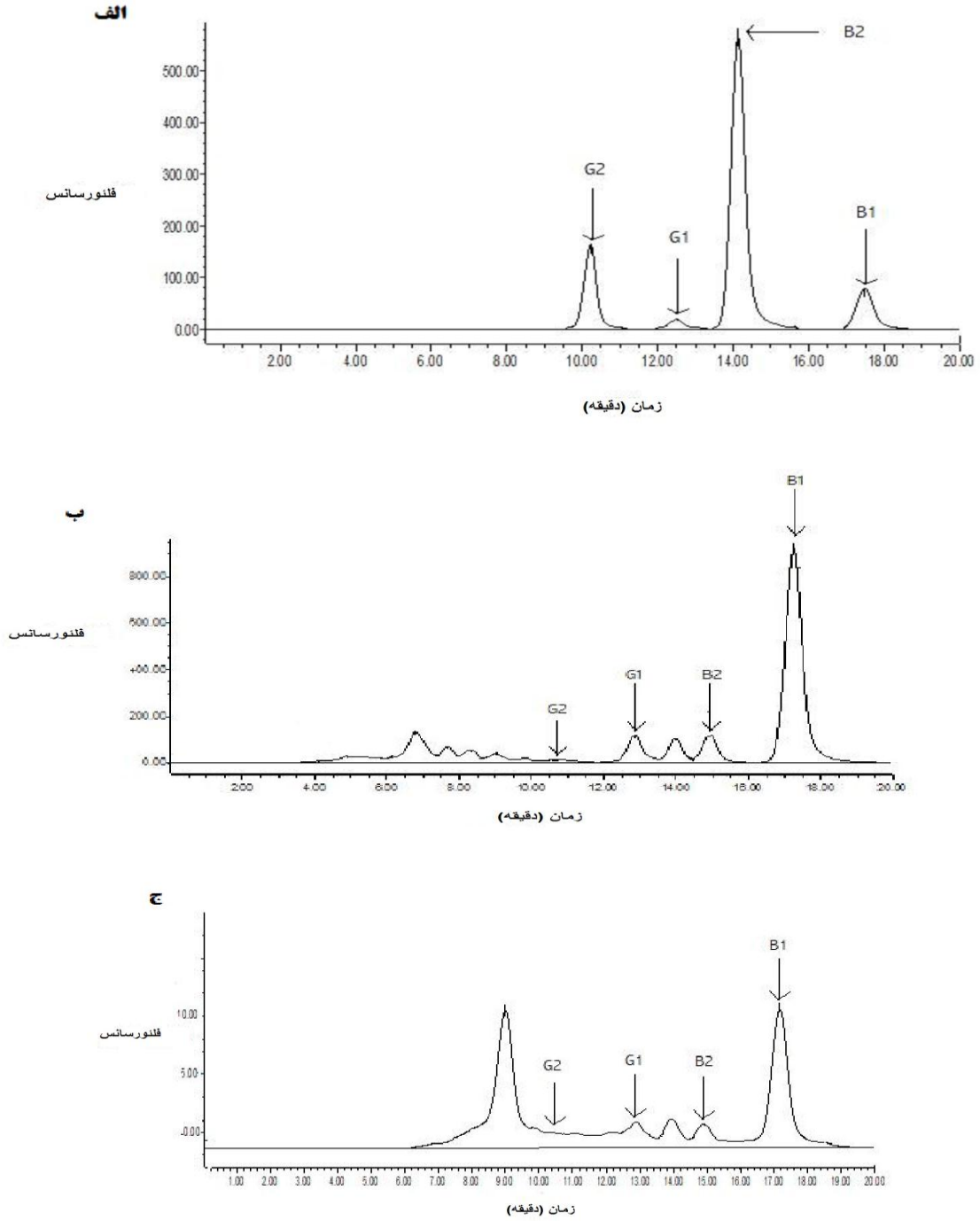
در مقایسه‌ی کل آفلاتوکسین‌های تولید شده بین دو گونه‌ی یاد شده، گونه *A. flavus* نزدیک به ۷٤ برابر گونه‌ی *A. foetidus* توکسین تولید نموده است. این اختلاف نشان می‌دهد که گونه‌ی *A. flavus* به شدت توکسین‌زاست و گونه‌ی *A. foetidus* مقدار کمی توکسین تولید می‌کند. مطابق نتایج بدست آمده (جدول

۱) میزان تولید آفلاتوکسین در دو گونه‌ی یاد شده روند سینوسی داشته است. به طوری که بعد از یک مرحله کاهش تولید در مرحله‌ی بعد با افزایش تولید مواجه شده است. بیشینه‌ی تولید آفلاتوکسین G_1 (۱۲٦/٤۹) در گونه‌ی *A. flavus* در روز ۲٤ پس از مایه‌زنی و آفلاتوکسین‌های B_1 (٤۸۷/۹۲)، B_2 (۱۸/٤٦) و G_2 (۸/۵۷) میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB در روز ۲۰ پس از مایه‌زنی اتفاق افتاد. در پایان دوره‌ی ۳۲ روزه، کشت این قارچ مقدار تولید آفلاتوکسین B_1 افزایش فزاینده‌ای (۱۱٦۲/۸ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB) نسبت به قبل نشان داد. در گونه‌ی *A. foetidus* بیشینه تولید آفلاتوکسین G_2 (۰/۰۲) در روز ۲۰ پس از مایه‌زنی و آفلاتوکسین‌های B_1 (۸/۷۱)، B_2 (۲/۳) و G_1 (۱/۳) میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB در روز ۲٤ پس از مایه‌زنی اتفاق افتاد. در این گونه نیز در پایان دوره‌ی ۳۲ روزه، مقدار تولید آفلاتوکسین B_1 با روند صعودی (۲٦ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB) نسبت به قبل همراه بود. احتمال داده می‌شود این افزایش مربوط به تبدیل آفلاتوکسین‌های موجود در محیط به آفلاتوکسین B_1 باشد یا به خاطر تغییر شرایط محیطی به وجود آمده باشد (میاحی و همکاران ۱۳۸٦). در مورد آفلاتوکسین‌های دیگر نیز روند افزایشی با سرعت کمتری وجود داشته است که احتمال داده می‌شود مربوط به این نوع تبدیلات باشد. بنابراین هفت نقطه زمانی اصلی (چهار الی ۲۸ روز) مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج این پژوهش از نظر تغییرات میزان تولید آفلاتوکسین در دو گونه قارچ *A. flavus* و *A. foetidus* طی مدت ۳۲ روز از طریق سطح زیر پیک هر یک از آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌ی استاندارد با نمونه مورد آزمایش مقایسه شد. زمان بازداری آفلاتوکسین مربوطه در نمونه‌ی استاندارد مبنا واقع شد و بر اساس آن در نمونه‌های مورد آزمایش نوع آفلاتوکسین تعیین گردید. در شکل ۱ کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در نمونه‌ی استاندارد، گونه *A. flavus* و گونه *A. foetidus* نشان داده شده است.

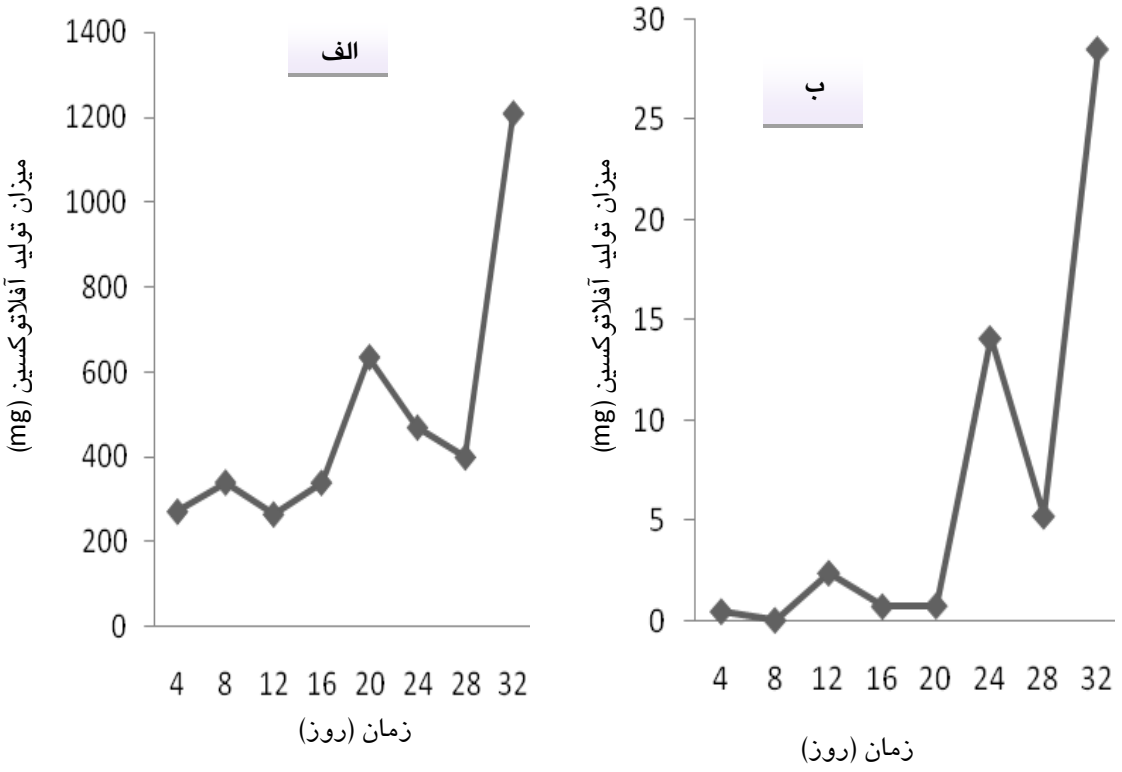
بیشینه‌ی میزان تولید مجموع آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در گونه‌ی *A. flavus* در روز ۲۰ پس از مایه‌زنی ٦۳۵/٦۵±۸۷/۳۱ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB بود. در گونه‌ی *A. foetidus* بیشینه‌ی میزان تولید مجموع آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در روز ۲٤ پس از مایه‌زنی اتفاق افتاد و مقدار آن ۱٤/۱۲±۲/۱۸ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایعPDB بود(شکل ۲).

مطالعات مختلف در دنیا نشان می‌دهد که مصرف فراورده‌های غذائی حاوی آفلاتوکسین از عوامل ایجاد کننده سرطان کبد در انسان هستند (میاحی و همکاران ۱۳۸٦). آفلاتوکسین‌ها عمدتاً توسط جدایه‌هایی از دو گونه‌ی *A. flavus* و *A. parasiticus* تولید می‌گردند و قارچ *A. foetidus* به عنوان تولید کننده‌ی مهم آفلاتوکسین مطرح نیست بلکه گونه‌ای است که مقدار بسیار کمی آفلاتوکسین تولید می‌کند. در این پژوهش برای آزمایش مقایسه‌ای به کار گرفته شده است.



شکل ۱- کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های مختلف: الف) در نمونه استاندارد؛ ب) در گونه *A. flavus* ؛ ج) در گونه *A. foetidus*. شرایط دستگاه HPLC : فاز متحرک: متانول، آب، استونیتریل و اسیداستیک به نسبت ۲۰: ۵۹:۲۰:۱ ، آشکار ساز فلئورسنت: طول موج تهییج ۳٦۵ و طول موج نشر ٤۲۵ نانومتر ، ستون: ODS2 C_{18} (250×4.6 mm, 10µm)، دمای محیط ۲۷ درجه سانتیگراد، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر.

نتـــایج آزمایشـــات نشـــان داد (شـــکل ۲) میـــزان تولیـــد آفلاتوکســین در گونــه‌ی *A. flavus* بسـیار فراتـر از *A. foetidus* بوده است. این بررسی اولین پـژوهش در جهـت اندازه‌گیری میزان تغییرات تولید آفلاتوکسین در دو گونه‌ی فوق الذکر در محیطی نیمه مصنوعی است.



شکل ۲- میزان تولید آفلاتوکسین طی ۳۲ روز در *A. flavus* (الف) و *A. foetidus* (ب) بر حسب میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB.

محیط کشت‌های متنوعی برای رشد قارچ آسپرژیلوس از جمله: محیط‌های مصنوعی مانند گلوکز سـوکروز[1]، نیمـه مصنوعی مانند PDA و طبیعی مانند برنج، گنـدم و ذرت وجود دارد. در این محـیط‌هـا کپـک آسـپرژیلوس مقـادیر متفاوتی توکسین تولید می‌نمایـد(هوانـگ ۲۰۰۷، مظـاهری ۲۰۰۹). محـیط PDB شـامل: ۲۰۰ گـرم عصـاره‌ی سـیب زمینـی، ۲۰ گـرم دکسـتروز(دی گلـوکز) در یـک لیتـر آب مقطر در pH=۵/۱ است که محیطی مناسـب بـرای کشـت انواع قارچ‌ها به ویژه کپک‌هـا و مخمرهاسـت. ایـن محـیط مشابه محیط PDA است که در آن آگار حذف شده است (مظاهری ۲۰۰۹). در پژوهش هوانـگ (۲۰۰۷) بیـان شـده است که هر چه محیط رشد قارچ به محیط طبیعی نزدیک-تر باشد تولید توکسـین بیشـتر خواهـد شـد. آنهـا نشـان دادند که افزایش مقادیر متفـاوتی از قنـدهای سـوکروز و گلوکز بـه محـیط کشـت نیـز منجـر بـه تغییـر در میـزان توکسین تولید شـده در محـیط کشـت مـی‌شـود. شـرم و همکاران (۲۰۰۵) به این نتیجه رسیدند که تغییرات میـزان

[1]Glucose Sucrose(GS)

نمک در محیط کشت منجر به افزایش مقادیر تولیدی آفلاتوکسین شده است. فنته و همکاران (۲۰۰۱) توانائی تولید آفلاتوکسین در قارچ *Aspergillus* sp. را روی محیط کشت‌های مختلفی از آگار، چاپکس آگار، عصاره‌ی مخمر آگار با روشHPLC بررسی نمودند. آن‌ها اعلام کردند که محیط حاوی عصاره مخمر آگار بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین را تولید می‌کند در حالیکه دسایی و قوش (۲۰۰۳) با بررسی توانائی تولید آفلاتوکسین در ایزوله های *A. flavus* روی محیط کشت‌های آگار دریافتند که بیشترین میزان توکسین تولیدی در محیط کشت چاپکس آگار بوده است. در این پژوهش که از محیط کشت بدون آگار استفاده شده است، استرین‌های *Aspergillus flavus* مقادیر بسیار بالائی آفلاتوکسین تولید کرد.

حد مجاز آفلاتوکسین در کشورهای مختلف برای آفلاتوکسین B_1، ۰ تا ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و برای مجموع آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 از صفر تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است (سوک‌چون و همکاران ۲۰۰۷). این مقدار در محصولات مختلف متفاوت است. به عنوان مثال استاندارد حد مجاز آفلاتوکسین در ایران برای پسته آماده مصرف و پسته نیازمند فرآوری به ترتیب معادل ۱۰ و ۱۵ واحد در بیلیون (ppb) تعیین شده است (رهایی و همکاران ۱۳۸۸). برای جلوگیری از افزایش میزان آفلاتوکسین لازم است کلیه شرایطی که قارچ آسپرژیلوس می‌تواند در آن آلودگی ایجاد کند و آفلاتوکسین تولید نماید، شناسایی شده و به حداقل رسانده شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که در تصویب، تامین اعتبار و اجرای این پروژه همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

ارشاد ج، ۱۳۸۹. قارچ‌های ایران. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران.

الماسیان ص، حسینی غ، سوهانی‌دربان، ع و ملک زادگان ف، ۱۳۸۷. بررسی میزان آفلاتوکسین در بلغور ذرت. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذائی، مشهد ۲٤ تا ۲٦ مهر ۱۳۷۸، صفحه ۱٤۷.

رحیمی ا، کارگر ع و زمانی ف، ۱۳۸۷. ارزیابی سطح آفلاتوکسین B1 در خوراک دام مزارع گاو شیری استان چهار محال و بختیاری. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۷۹، صفحه‌های ٦٦ تا ۷۱.

رنجبر ر، ۱۳۸۷. روش‌های مختلف تشخیص توکسین‌ها. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، شماره ۱۰ صفحه‌های ۱ تا ۱۰.

رهایی س، امام جمعه ز، رضوی س و مظاهری م، ۱۳۸۸. توانایی سویه لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (LBGG) جهت کاهش آفلاتوکسین B_1 موجود در پسته. مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد اول، شماره ۳. صفحه‌های ۵۱ تا ٦٤.

میاحی م، راضی جلالی م و سلامات ن، ۱۳۸٦. جداسازی آسپرژیلوس و اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی، ذرت و کنجاله سویا. مجله علوم دانشگاه شهید چمران، شماره هفدم، قسمت ب: صفحه‌های ۹۵ تا ۱۰۵.

Abbas KH, Cartwright DR, Xie W and Shier, WT, 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. Crop Protection 25: 1- 9.

Agarwal VK and Sinclair B, 1997. Principles of Seed Pathology. Second ediition, CRC Press.

Barnett HL and Hunter BB, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed., APS Press.

Desai MR and Ghosh SK, 2003. Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains. Ann Agric Environ Med. 10: 159-162.

Fardos B and Magda M, 2009. Trials towards reduction of fungal growth and aflatoxin G_1 production in Arabic coffee using different additives. African Journal of Food Science 3 (3): 68- 76.

Fente CA, Ordaz JJ, Vazquez BI, Franco CM and Cepeda A, 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin- producing aspergillus strains. Applied and Environmental Microbiology 67: 4858-4862.

Huang Ch, 2007. Mechanism of intraspecific toxin inhibition in *Aspergillus flavus*. A Thesis for the degree of Master of Science in The Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Zhejiang University, China.

Khanafari A, Soudi H and Miraboulfathi M, 2007. Biocontrol of *Apergillus flavus* and aflatoxin B_1 production in corn. Journal of Environmental and Health Science 4 (3): 163- 168.

Klich MA, 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. CBS, Utrecht, The Netherland.

Mazaheri M, 2009. Determination of aflatoxins in imported rice to Iran. Food and Chemical Toxicology 47: 2064-2066.

Reddy KRN, Reddy CS and Muralidharan K, 2009. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. Food Microbiology 26: 27-31.

Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z and Lima N, 2009. A polyphasic approach to the identification of a flatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. International Journal of Food Microbiology 129: 187- 193.

Scherm B, Palomba M, Serra D, Marcello A, and Migheli Q, 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Food Microbiology 98: 201-210.

Sefidgar SAA, Gholampour Azizi I, Mirzaei M, Hadizade Moalem SHA, and Azarmi M, 2007. Comparative sStudy of the aflatoxin M1 in consuming pasteurized milk in Babol in winter and summer. Journal of Babol University of Medical Science 9: 27-31.

Sook Chun H, Jung Kim H, Ee Ok H, Hwang, JB, and Chung DH, 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. Food Chemistry 102: 385-361.

Study of Quantitative and Qualitative of B_1, B_2, G_1 and G_2 Aflatoxins in Two Species of Aspergillus With HPLC Method

F Asgharnezhad[1], S Mahdian[2*], B Amiri Besheli[3] and S Jafar Nazari[4]

[1]Former MSc Student of Plant Pathology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
[2]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
[3]Associate Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
[4]Assistant Professor, Non-Profit High Educational institute of Tajan.
[*]Corresponding author: safaralim@gmail.com

Received:14 Mar 2015 Accepted:25 Apr 2016

Abstract

Aflatoxins are the fungal toxins produced by *Aspergillus* spp. These fungal metabolites in food and oil seed have a big lifetime risk for acute and chronic disease in human and animals. In this survey for production levels of B_1, B_2, G_1 and G_2 aflatoxins in two species of *Aspergillus* was namely A. Alaus and A. Foctides has been investigated. These fungi were grown in Potato Dextrose Broth (PDB) medium and aflatoxins were determined using HPLC method. These species were cultured in 50 ml flask at 26^{oc}, with 80% humidity and dark place for 32 days. 25 ml of broth cultures were filtered and then extracted with 10 ml chloroform and evaporated the organic solvent and bring the organic solvent in 3ml methanol. After filtration, 20 µl of final solvent was injected to HPLC instrument. The result has shown that *A. foetidus* produced the maximum amount of B_1, B_2 and G_1 with 8.71, 2.3 & 3.1 mg after 24 days post-inoculation and the maximum amount of G_2 with 0.02 after 20 days post-inoculation per 50 ml of PDB. *A. flavus* produced the maximum amount of B_1, B_2 and G_2 with 487.92, 18.46 & 8.57 mg after 20 days post-inoculation and the maximum amount of G_1 with 126.49 mg after 24 days post-inoculation per 50 ml of PDB. Overall the B_1 is maximum afltoxin in *A. flavus* and G_2 is the minimum aflatoxin in *A. foetidus*.

Keywords: Aspergillus, Aflatoxin, Food safety, High Performance Liquid Chromatography.