

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

فاطمه اصغر نژاد^۱، صفر علی 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 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 ۲۴، 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 ۴۸۷/۹۲، ۱۸/۴۶ و ۸/۵۷ میلی‌گرم در روز ۲۰، و آفلاتوکسین G_1 به میزان ۱۲۶/۴۹ میلی‌گرم در روز ۲۴ پس از کشت در ۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB به بیشترین مقدار خود رسیدند. بیشترین توکسین تولید شده (۴۸۷/۹۲ 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

سمی طبیعی قارچ‌ها هستند که در مسیر متابولیسم سلول-های 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

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

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 میکوتوکسین‌ها از حد بیشینه مجاز از فروش آن‌ها 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^۱، الیزا^۲، HPLC^۳ 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 شناسایی 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 شناسایی 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

تهدیدی برای سلامتی انسان و حیوانات اهلی مطرح بوده-اند. از جمله مهمترین میکوتوکسین‌ها، 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). اسپرژیلوس بیش از ۱۸۰ گونه دارد و در ایران بیش از ۳۶ 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 ۲۴ 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 اسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم اجازه می‌دهد روی این محصولات رشد نموده و میکوتوکسین تولید نمایند. همچنین رطوبت بالا و هوای گرم، برای تولید بیشترین میزان آفلاتوکسین در مواد غذایی 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 اسپرژیلوس می‌توانند با گیاه سالم یک رابطه پارازیتی برقرار نمایند و زمانی که گیاه تحت استرس قرار گیرد مانند شرایط خشکسالی، مقادیر قابل توجهی آفلاتوکسین

¹Thin Layer Chromatography(TLC)

²Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

³High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

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. A. carneus A. candidus A. ustus terreus A. A. niger A. niveus A. auricomus ostianus A. A. caespitosus A. parasiticus fumigatus A. A. sclerotiorum* و *awamori*) در آزمایشات این پژوهش به کار گرفته نشدند.

تعیین زمان تولید بیشینه آفلاتوکسین

برای این منظور یک قطعه از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار^۱ 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 ۴ 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 محیط کشت مایع PDB، ابتدا محتوای هر یک از فلاسک‌ها به طور یکنواخت

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 جمع‌آوری شدند. از هر فروشگاه خوراک دام مقدار ۵۰۰ گرم دانه گندم و ۵۰۰ گرم ذرت تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد.

این دانه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (۱-۳ ثانیه) ضدعفونی شدند و به روش بالاتر 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 هانتز (۱۹۹۸)، جنس آسپرژیلوس تشخیص داده شد. جهت شناسائی گونه‌های آسپرژیلوس، از محیط کشت‌های (چاپک عصاره مخمر آگار^۲، چاپک داکس آگار^۳، چاپک عصاره مخمر آگار سوکروز^۴ ۲۰ درصد^۲ و عصاره مالت آگار^۴) 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 روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۸۰-۷۰ درصد به مدت یک هفته نگهداری گردید (آگاروال و سینکر، ۱۹۹۷). مشخصات مختلف ماکرو و میکرومورفولوژیکی نمونه‌ها (اندازه‌کلونی، رنگ کنیدیوم،

^۱Czapek Yeast Agar(CYA)

^۲Czapek Dox Agar(CZ)

^۳Czapek Yeast Agar with 20% Sucrose(CY20S)

^۴Malt Extract agar(MEA)

^۵Potato Dextrose Agar(PDA)

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^۵ با ستون تجزیه‌ای ODS2 C₁₈ (250×4.6 mm, 10μm) استفاده گردید. آشکارسازی آفلاتوکسین‌های جداسازی شده توسط آشکارساز فلوروسنت در طول موج برانگیختگی ۳۶۵ و طول موج نشر ۴۲۵ 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، ۵۹، 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 میکروسرنج همیلتون^۶ انجام شد. در کلیه‌ی اندازه‌گیری‌ها حجم نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی‌لیتر در دقیقه بود (عباس و همکاران، ۲۰۰۶). شناسایی کیفی آفلاتوکسین‌ها در نمونه مجهول از طریق مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌ها در نمونه‌ی استاندارد (محلول آفلاتوکسین‌های B₁، B₂، G₁ و G₂ با غلظت ۵۰۰ 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

مخلوط شد. مقدار ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی هر یک از گونه‌های یاد شده از فیلتر کاغذی (واتمن ۴۲ 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^۱ در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتیگراد و تحت خلاء حلال پرانی شد (عباس و همکاران، ۲۰۰۶). باقیمانده در سه میلی‌لیتر حلال متانول^۲ دارای خلوص HPLC حل و از فیلتر سرسرنجی ۰/۲۲ میکرومتر^۳ عبور داده شد. نمونه‌های تغلیظ شده در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری گردیدند. نمونه به دست آمده حاوی آفلاتوکسین‌های تغلیظ شده به منظور شناسایی 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^۴ با طول موج ۳۶۵ نانومتر قرار داده شدند. نمونه‌های محلول از نظر تابش فلوروسنت 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؛

^۱Rotary evaporator, Eyela N-1000, Japan

^۲Merk KGaA, Germany

^۳Einmal filter, Germany

^۴Kruss, Germany

^۵Waters HPLC Empower system

^۶Micro Syringe 50μl, Hamilton and Socorex

استاندارد میانگین‌گیری به عمل آمد. میانگین سطح زیر پیک آفاتوکسین در نمونه در غلظت استاندارد آفاتوکسین تزریق شده (۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) ضرب شد و عدد حاصله بر میانگین سطح زیر پیک آفاتوکسین

استاندارد تقسیم شد (فرمول ۱). این عدد غلظت آفاتوکسین بر اساس واحد در سه میلی‌لیتر عصاره غلیظ محسوب شد (عباس و همکاران، ۲۰۰۶).

$$Cx(rml) = \frac{Ax \times Cs}{As} \quad [1]$$

که در آن :

As = میانگین سطح زیر پیک‌های آفاتوکسین در محلول استاندارد آفاتوکسین ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر.

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

Ax = میانگین سطح زیر پیک‌های آفاتوکسین در نمونه.

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

برای به دست آوردن غلظت آفاتوکسین در ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع PDB از رابطه‌ی ۲ و برای تعیین میلی‌گرم

آفاتوکسین ترشح شده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع، از رابطه‌ی ۳ استفاده شد (عباس و همکاران، ۲۰۰۶).

$$Cx(25ml) = Cx(rml) \times \frac{2}{25} \quad [2]$$

که در آن:

Cx = غلظت آفاتوکسین در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت

$$mg Af(25ml) = \frac{25 \times Cx(25ml)}{1000} \quad [3]$$

که در آن:

$mg Af$ = میلی‌گرم آفاتوکسین 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 آفاتوکسین به طور کمی و

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 آفاتوکسین به طور کمی و

مقایسه شدند. نتایج بر مبنای ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع محاسبه، ارزیابی و گزارش شدند. (محاسبات بر اساس ۲۵ میلی لیتر عصاره انجام شد و جواب به دست آمده از رابطه‌ی ۳ در عدد ۲ ضرب شد تا در ۵۰ میلی لیتر 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.

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

جدول ۱- آفلاتوکسین تولید شده توسط دو گونه قارچ اسپرژیلوس در ۵۰ میلی لیتر محیط مایع PDB طی مدت ۳۲ روز بر حسب میلی گرم.

مجموع آفلاتوکسین‌ها		G_2		G_1		B_2		B_1		آفلا.
<i>A. foetidus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. flavus</i>	زمان (روز)
۰/۴	۲۷۲/۷۶	۰	۰	۰/۱	۸۸/۶۷	۰	۳/۷۷	۰/۳۹	۱۸۰/۲۳	۴
۰/۰۶	۳۴۱/۳	۰	۰	۰	۷۶/۰۷	۰	۶/۶۶	۰/۰۶	۲۵۸/۵۷	۸
۲/۴	۲۶۶/۲	۰	۰	۰/۹۲	۹۰/۲۲	۰/۰۲	۲/۹۱	۱/۴۶	۱۷۳/۰۷	۱۲
۰/۷۲۵	۳۴۰/۶۳	۰	۰	۰/۱۸۵	۶۹/۶۲	۰/۰۱	۶/۳۸	۰/۵۳	۲۶۴/۶۳	۱۶
۰/۷۴	۶۳۵/۶۵	۰/۰۲	۸/۵۷	۰/۰۸	۱۲۰/۷	۰	۱۸/۴۶	۰/۶۴	۴۸۷/۹۲	۲۰
۱۲/۳۱	۴۷۰/۴۳	۰	۱/۰۷	۱/۳	۱۲۶/۴۹	۲/۳	۹/۹۱	۸/۷۱	۳۳۲/۹۶	۲۴
۵/۲۵	۴۰۰/۶۰	۰/۰۱	۰/۵۸۶	۰/۳۷	۵/۷۸	۰/۰۸	۸/۸	۴/۷۹	۳۸۵/۴۴	۲۸
۲۷/۶۳	۱۲۰۸/۳۲	۰/۱۸	۸/۴۱	۰/۵۳	۹/۴۵	۰/۹۲	۲۷/۶۶	۲۶	۱۱۶۲/۸	۳۲
		۰/۲۱	۱۸/۶۳۶	۳/۴۸۵	۵۸۷	۳/۳۳	۸۴/۵۵	۴۲/۵۸	۳۲۴۵/۶۲	کل
		۰/۰۶	۳/۸۲	۰/۴۶	۴۵/۱۲	۰/۸۲	۸/۴۱	۸/۸۷	۳۲۳/۴۱	SD
			۲/۳۲ ^b		۷۳/۳۷ ^b		۱۰/۵۶ ^b		۴۰۵/۷۰ ^a	Mfl
		۰/۰۲ ^d		۰/۴۳ ^d		۰/۴۱ ^d		۵/۳۵ ^b		Mfo

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

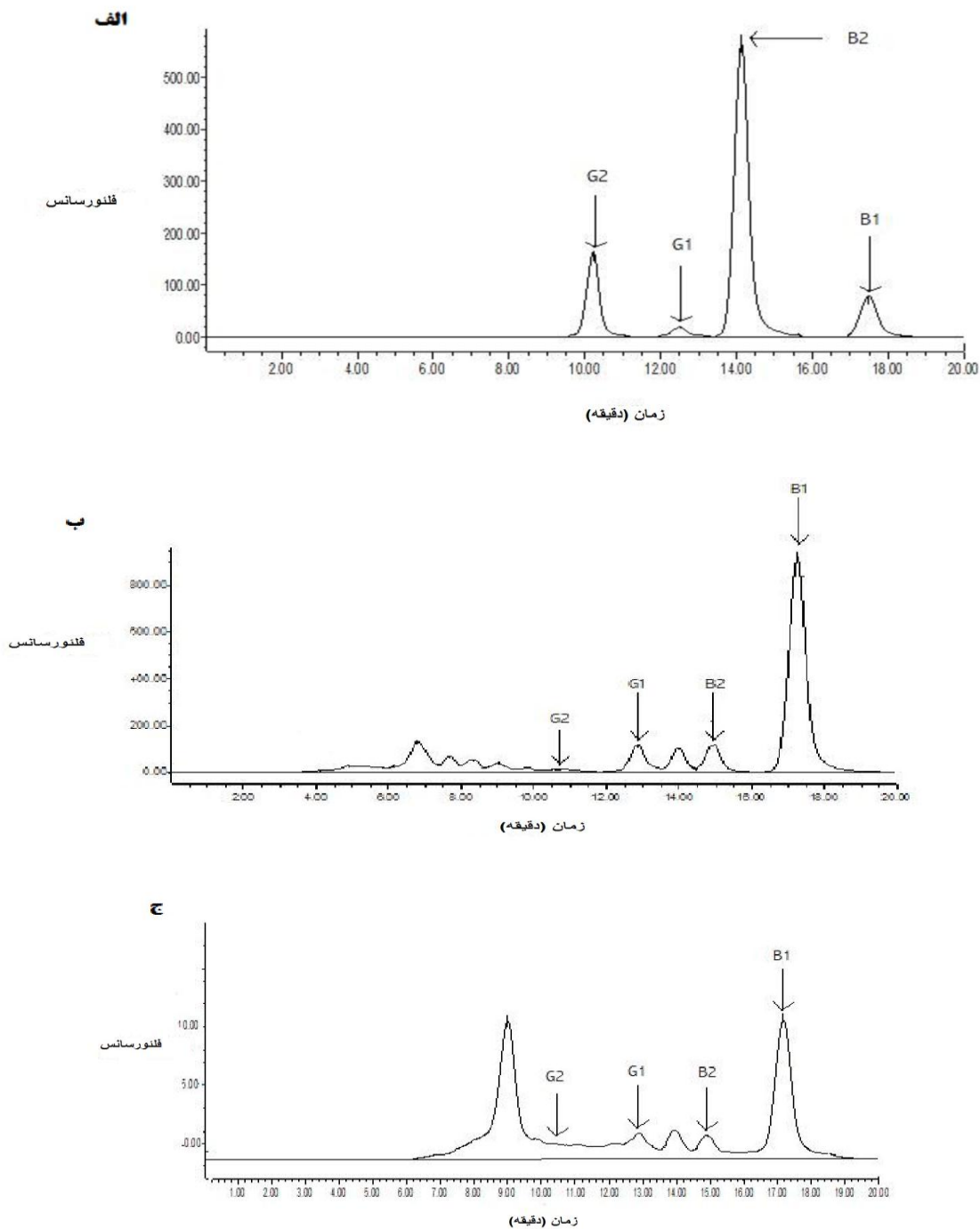
اختلاف نشان می‌دهد که گونه‌ی *A. flavus* به شدت توکسین‌زاست و گونه‌ی *A. foetidus* مقدار کمی توکسین تولید می‌کند. مطابق نتایج بدست آمده (جدول

در مقایسه‌ی کل آفلاتوکسین‌های تولید شده بین دو گونه‌ی یاد شده، گونه *A. flavus* نزدیک به ۷۴ برابر گونه‌ی *A. foetidus* توکسین تولید نموده است. این

نتایج این پژوهش از نظر تغییرات میزان تولید آفاتوکسین در دو گونه قارچ *A. flavus* و *A. foetidus* طی مدت ۳۲ روز از طریق سطح زیر پیک هر یک از آفاتوکسین‌ها در نمونه‌ی استاندارد با نمونه مورد آزمایش مقایسه شد. زمان بازداری آفاتوکسین مربوطه در نمونه‌ی استاندارد مبنا واقع شد و بر اساس آن در نمونه‌های مورد آزمایش نوع آفاتوکسین تعیین گردید. در شکل ۱ کروماتوگرام آفاتوکسین‌های 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 آفاتوکسین‌های B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 در گونه‌ی *A. flavus* در روز ۲۰ پس از مایه‌زنی $635/65 \pm 87/31$ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB بود. در گونه‌ی *A. foetidus* بیشینه‌ی میزان تولید مجموع آفاتوکسین‌های B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 در روز ۲۴ پس از مایه‌زنی اتفاق افتاد و مقدار آن $14/12 \pm 2/18$ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB بود (شکل ۲). مطالعات مختلف در دنیا نشان می‌دهد که مصرف فراورده‌های غذائی حاوی آفاتوکسین از عوامل ایجاد کننده سرطان کبد در انسان هستند (میاحی و همکاران ۱۳۸۶). آفاتوکسین‌ها عمدتاً توسط جدایه‌هایی از دو گونه‌ی *A. parasiticus* و *A. flavus* تولید می‌گردند و قارچ *A. foetidus* به عنوان تولید کننده‌ی مهم آفاتوکسین مطرح نیست بلکه گونه‌ای است که مقدار بسیار کمی آفاتوکسین تولید می‌کند. در این پژوهش برای آزمایش مقایسه‌ای به کار گرفته شده است.

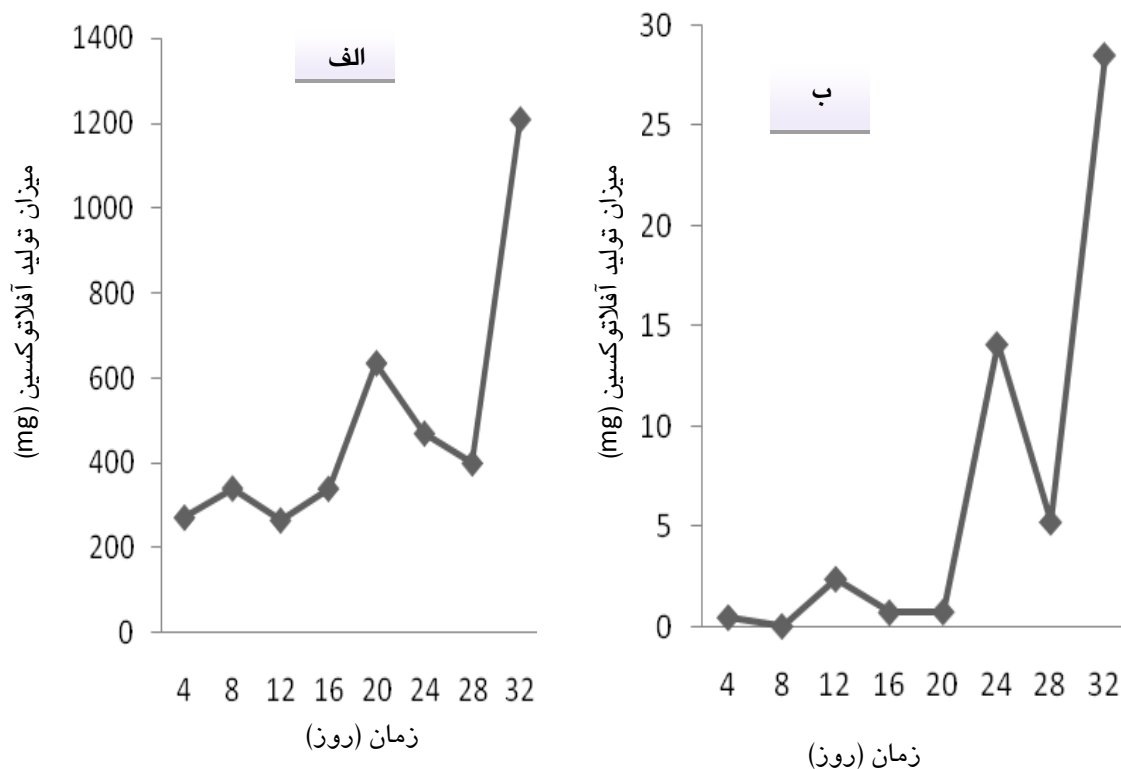
۱) میزان تولید آفاتوکسین در دو گونه‌ی یاد شده روند سینوسی داشته است. به طوری که بعد از یک مرحله کاهش تولید در مرحله‌ی بعد با افزایش تولید مواجه شده است. بیشینه‌ی تولید آفاتوکسین G_1 ($126/49$) در گونه‌ی *A. flavus* در روز ۲۴ پس از مایه‌زنی و آفاتوکسین‌های B_1 ($487/92$)، B_2 ($18/46$) و G_2 ($8/57$) 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 آفاتوکسین B_1 افزایش فزاینده‌ای ($1162/8$) میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB) نسبت به قبل نشان داد. در گونه‌ی *A. foetidus* بیشینه تولید آفاتوکسین G_2 ($0/02$) در روز ۲۰ پس از مایه‌زنی و آفاتوکسین‌های B_1 ($8/71$)، B_2 ($2/3$) و G_1 ($1/3$) میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB در روز ۲۴ پس از مایه‌زنی اتفاق افتاد. در این گونه نیز در پایان دوره‌ی ۳۲ روزه، مقدار تولید آفاتوکسین B_1 با روند صعودی (۲۶ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB) نسبت به قبل همراه بود. احتمال داده می‌شود این افزایش مربوط به تبدیل آفاتوکسین‌های موجود در محیط به آفاتوکسین B_1 باشد یا به خاطر تغییر شرایط محیطی به وجود آمده باشد (میاحی و همکاران ۱۳۸۶). در مورد آفاتوکسین‌های 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.



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 فلئورسانس: طول موج تهییج ۳۶۵ و طول موج نشر ۴۲۵ نانومتر، ستون: ODS2 C₁₈ (250×4.6 mm, 10μm)، دمای محیط ۲۷ درجه سانتیگراد، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر.

اندازه‌گیری میزان تغییرات تولید آفلاتوکسین در دو گونه‌ی فوق‌الذکر در محیطی نیمه مصنوعی است.

نتایج آزمایشات نشان داد (شکل ۲) میزان تولید آفلاتوکسین در گونه‌ی *A. flavus* بسیار فراتر از *A. foetidus* بوده است. این بررسی اولین پژوهش در جهت



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

انواع قارچ‌ها به ویژه کپک‌ها و مخمرهاست. این محیط مشابه محیط PDA است که در آن آگار حذف شده است (مظاهری ۲۰۰۹). در پژوهش هوانگ (۲۰۰۷) بیان شده است که هر چه محیط رشد قارچ به محیط طبیعی نزدیک‌تر باشد تولید توکسین بیشتر خواهد شد. آنها نشان دادند که افزایش مقادیر متفاوتی از قندهای سوکروز و گلوکز به محیط کشت نیز منجر به تغییر در میزان توکسین تولید شده در محیط کشت می‌شود. شرم و همکاران (۲۰۰۵) به این نتیجه رسیدند که تغییرات میزان

محیط کشت‌های متنوعی برای رشد قارچ آسپرژیلوس از جمله: محیط‌های مصنوعی مانند گلوکز سوکروز^۱، نیمه مصنوعی مانند PDA و طبیعی مانند برنج، گندم و ذرت وجود دارد. در این محیط‌ها کپک آسپرژیلوس مقادیر متفاوتی توکسین تولید می‌نماید (هوانگ ۲۰۰۷، مظاهری ۲۰۰۹). محیط PDB شامل: ۲۰۰ گرم عصاره‌ی سیب زمینی، ۲۰ گرم دکستروز (دی گلوکز) در یک لیتر آب مقطر در pH=۵/۱ است که محیطی مناسب برای کشت

^۱Glucose Sucrose(GS)

میلی گرم در کیلوگرم گزارش شده است (سوک چون 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 می تواند در آن آلودگی ایجاد کند و آفلاتوکسین تولید نماید، شناسایی شده و به حداقل رسانده شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که در تصویب، تامین اعتبار و اجرای این پروژه همکاری نموده اند تشکر و قدردانی می نمایند.

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 کشت های مختلفی از آگار، چاپکس آگار، عصاره مخمر آگار با روش HPLC بررسی نمودند. آن ها اعلام کردند که محیط حاوی عصاره مخمر آگار بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین را تولید می کند در حالیکه دسایبی و قوش (۲۰۰۳) با بررسی توانائی تولید آفلاتوکسین در ایزوله های *A. flavus* روی محیط کشت های 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، استرین های *Aspergillus flavus* مقادیر بسیار بالائی آفلاتوکسین تولید کرد.

حد مجاز آفلاتوکسین در کشورهای مختلف برای آفلاتوکسین B₁، ۰ تا ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم و برای مجموع آفلاتوکسین های B₁، B₂، G₁ و G₂ از صفر تا ۵۰

منابع

- ارشاد ج، ۱۳۸۹. قارچ های ایران. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران.
- الماسیان ص، حسینی غ، سوهانی دربان، ع و ملک زادگان ف، ۱۳۸۷. بررسی میزان آفلاتوکسین در بلغور ذرت. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، مشهد ۲۴ تا ۲۶ مهر ۱۳۷۸، صفحه ۱۴۷.
- 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، صفحه های ۶۶ تا ۷۱.
- رنجبر ر، ۱۳۸۷. روش های مختلف تشخیص توکسین ها. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج)، شماره ۱۰ صفحه های ۱ تا ۱۰.
- رهایی س، امام جمعه ز، رضوی س و مظاهری م، ۱۳۸۸. توانایی سویه لاکتوباسیلوس رامنوسوس (LBGG) GG جهت کاهش آفلاتوکسین B₁ موجود در پسته. مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد اول، شماره ۳. صفحه های ۵۱ تا ۶۴.
- میاحی م، راضی جلالی م و سلامات ن، ۱۳۸۶. جداسازی آسپرژیلوس و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی، ذرت و کنجاله سویا. مجله علوم دانشگاه شهید چمران، شماره هفتم، قسمت ب: صفحه های 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 edition, 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 G₁ 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 B₁ 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 B₁, B₂, G₁ and G₂ Aflatoxins in Two Species of *Aspergillus* With HPLC Method

F Asgharnezhad¹, S Mahdian^{2*}, B Amiri Besheli³ and S Jafar Nazari⁴

¹Former MSc Student of Plant Pathology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

²Assistant Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

³Associate Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

⁴Assistant 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 B₁, B₂, G₁ and G₂ 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°C, 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 B₁, B₂ and G₁ with 8.71, 2.3 & 3.1 mg after 24 days post-inoculation and the maximum amount of G₂ with 0.02 after 20 days post-inoculation per 50 ml of PDB. *A. flavus* produced the maximum amount of B₁, B₂ and G₂ with 487.92, 18.46 & 8.57 mg after 20 days post-inoculation and the maximum amount of G₁ with 126.49 mg after 24 days post-inoculation per 50 ml of PDB. Overall the B₁ is maximum afltoxin in *A. flavus* and G₂ is the minimum aflatoxin in *A. foetidus*.

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