

جداسازی اسپرژیلوس و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی، ذرت و کنجاله سویا

منصور میاحی، محمد راضی جلالی* و نگین سلامات

گروه بیماری‌های طیور - دانشگاه شهید چمران اهواز

*گروه علوم درمانگاهی - دانشگاه شهید چمران اهواز

پست الکترونیکی: mansoormayahi@scu.ac.ir

چکیده

بسیاری از مواد غذایی انسانی و دامی مستعد رشد و تکثیر قارچ می باشند. این قارچ‌ها، تولید کننده‌های اصلی آفلاتوکسین‌ها که گروهی از متابولیت‌های قارچی بسیار سمی و سرطان‌زا هستند، می‌باشند. معمولی‌ترین آفلاتوکسین‌ها G_1 ، B_2 ، B_1 و G_2 هستند که آفلاتوکسین B_1 بیشترین سمیت را دارد. عمده‌ترین نشانه‌های آفلاتوکسیکوز در پرندگان کاهش رشد، افزایش ضریب تبدیل غذایی، کاهش وزن بدن، کاهش تولید و وزن تخم مرغ و تضعیف سیستم ایمنی پرندگان می‌باشد. در بررسی حاضر میزان آلودگی به انواع قارچ‌های اسپرژیلوس و آفلاتوکسین در اقلام عمده تشکیل دهنده جیره پرندگان، کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۷۵ نمونه مواد اولیه خوراک پرندگان شامل ۲۵ نمونه از هر یک از اقلام کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی از دو کارخانه تولید دان پرندگان اهواز و مرغداری‌های اطراف اهواز طی یک سال جمع‌آوری شد و میزان آلودگی آن‌ها به قارچ اسپرژیلوس و سم آفلاتوکسین اندازه‌گیری گردید. جداسازی قارچ به روش رقت‌سازی و سپس کشت قارچ به روش پورپلیت انجام شد. استخراج آفلاتوکسین نیز با استفاده از حلال‌های متانول ۵۵ درصد و به روش کروماتوگرافی لایه نازک بر روی صفحات آلومینیم‌دار انجام گرفت. در این بررسی میزان آلودگی به قارچ و آفلاتوکسین به ترتیب در کنجاله سویا ۹۶ و ۴۰ درصد، در ذرت ۸۸ و ۴۰ درصد و در پودر ماهی ۱۰۰ و ۶۰ درصد بود. کنجاله سویای وارداتی، ذرت تولید داخل و پودر ماهی تولید داخل بیشترین میزان آلودگی به قارچ اسپرژیلوس را دارا بودند. بیشترین مقدار آلودگی به سم آفلاتوکسین B_1 در پودر ماهی تولید داخل به مقدار ۱۵ میکروگرم در کیلوگرم بود.

واژه‌های کلیدی: اسپرژیلوس، آفلاتوکسین، سموم قارچی، ماکیان، کنجاله سویا، ذرت، پودر ماهی

مقدمه

زمان قرار گرفتن در معرض سم بستگی دارد. میزان حساسیت پرندگان به آفلاتوکسین‌ها متفاوت بوده و به گونه، سن و جنس بستگی دارد [۵، ۱۰ و ۱۱].

غالب مواد غذایی که به مصرف انسان یا حیوان می‌رسند محیط کشت مناسبی برای رشد قارچ‌ها و تولید توکسین‌ها می‌باشند. این سموم تغییرات بافتی در محیط ایجاد کرده که این تغییرات بیشتر در کبد عارض می‌شود و منجر به اختلالات کبدی، سیروز^۱ و بالاخره سرطان کبد می‌گردد [۷]. آفلاتوکسیکوز^۲ باعث کاهش رشد، کاهش تولید، افزایش کلسیفیکاسیون استخوان‌ها، افزایش زمان انعقاد خون و نیز اثرات سرطان‌زایی می‌شود [۵ و ۷]. آفلاتوکسیکوز در انسان یا به طور مستقیم از راه خوردن غذاهای آلوده به سم و غیرمستقیم از طریق فرآورده‌های دامی آلوده مانند شیر، گوشت و تخم‌مرغ ایجاد می‌شود [۵، ۱۲ و ۱۳]. در سال ۲۰۰۴ آفلاتوکسیکوز شدید ناشی از خوردن شیر و غذاهای آلوده به آفلاتوکسین، منجر به مرگ ۱۲۵ نفر در کنیا شد [۴ و ۱۴]. حد مجاز و استاندارد آفلاتوکسین در هر یک از مواد اولیه خوراک پرندگان به میزان ۳۰ میکروگرم در کیلوگرم و برای خوراک آماده ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد [۱۵].

فیشر و همکاران در سال ۱۹۹۵ از ۵۱ درصد از ۳۹ نمونه ذرت مورد مطالعه خود ۷۵۰-۲۰ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین جدا نمودند [۱۶]. شواپتزر در سال ۲۰۰۱ موفق به جدا کردن آفلاتوکسین از نمونه‌های ذرت استفاده شده برای تغذیه بوقلمون‌ها، که از سراسر جورجیا جمع‌آوری شده بود، شد [۵]. هنک و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش نمودند از میان ۱۴۲ نمونه دانه‌های گیاهی جیره طیور جمع‌آوری شده از قسمت‌های مرکزی، جنوبی و شرقی تگزاس در ۷ درصد نمونه‌ها میزان

بر اساس برخی تخمین‌ها سالانه بیش از ۲۵ درصد کل غلات تولیدی جهان در معرض آلودگی قارچی قرار دارند [۱]. آسپرژیلوز از بیماری‌های مهم پرندگان می‌باشد که می‌تواند دستگاه تنفس، اندام‌های احشایی و مغز را درگیر کند. این بیماری توسط گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس ایجاد می‌شود. از میان انواع قارچ‌های آسپرژیلوس ایجادکننده بیماری، دو نوع آسپرژیلوس فلاووس و فومیگاتوس، نقش بیشتری نسبت به سایر انواع آسپرژیلوس (نظیر آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس گلاکوس) ایفا می‌نمایند [۲]. معمول‌ترین راه انتقال بیماری، راه تنفسی است که در سیستم‌های بسته بیشتر دیده می‌شود. اما راه‌های دیگری نظیر انتقال از راه هجری و یا انتقال بیماری از طریق آلودگی سطح تخم‌مرغ‌ها نیز وجود دارد [۲ و ۳].

برخی از انواع گونه‌های قارچ آسپرژیلوس در شرایط مناسب قادر به تولید آفلاتوکسین‌ها هستند [۴، ۱ و ۵]. از این میان آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس مهم‌ترین تولیدکنندگان این سموم می‌باشند. آفلاتوکسین‌ها ترکیبات شیمیایی خاصی هستند که طی یک سری واکنش‌های متوالی آنزیمی توسط تعدادی از گونه‌های قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم هنگام رشد و نمو در شرایط مناسب روی بسیاری از مواد مختلف تولید می‌شوند [۱، ۳، ۴، ۵ و ۶].

تاکنون ۱۸ نوع مختلف از انواع آفلاتوکسین‌ها شناسایی شده‌اند ولی فقط آفلاتوکسین‌های نوع G_1 ، B_2 ، B_1 و G_2 به عنوان آلوده‌کننده‌های غذا و منابع غذایی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند، که در میان آن‌ها آفلاتوکسین B_1 دارای بالاترین میزان سمیت می‌باشد [۴، ۷ و ۸]. این سموم منجر به تضعیف سیستم ایمنی خونی و ایمنی با واسطه سلولی پرنده‌ها می‌شود و آن‌ها را نسبت به سایر عفونت‌ها حساس‌تر می‌کند [۵ و ۹]. اثرات زیان‌آور و نامطلوب آفلاتوکسین بر روی پرندگان به دو عامل، میزان سم و مدت

1- Chirrhosis

2- Aflatoxicosis

محلول متانول آب (۴۵+۵۵)، محلول بنزن- استونیتریل (۱+۹۸)، سولفات سدیم بی‌آب، اسید سولفوریک ۵۰ درصد، محلول های استاندارد آفلاکسین B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 با غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در بنزن- استونیتریل، دی اتیل اتر بدون آب، آسیاب، دستگاه حرارت‌دهنده و مخلوط کننده، دستگاه تکان‌دهنده یا چرخاننده مغناطیسی (ویبراتور)، سانتریفوژ، حمام آب گرم، صفحات کروماتوگرافی به ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی‌متر با عمق ۰/۲۵ میلی‌متر، الک با منافذی به قطر ۱ میلی‌متر، اتاقک UV.

ب) روش نمونه‌گیری

نمونه‌گیری از دو کارخانه فعال تهیه دان طیور شهرستان اهواز و نیز از مرغداری‌های دارای انبار دان طی یک سال انجام شد. جمعاً تعداد ۷۵ نمونه شامل ۲۵ نمونه از هر یک از اقلام ذرت، سویا و پودرماهی جمع‌آوری گردید. جهت تهیه نمونه همگن در هر بار نمونه‌گیری ۵۰۰ گرم به طور تصادفی و از قسمت‌های گوناگون برداشته شد [۲۰].

ج) روش آزمایش

برای جداسازی قارچ اسپرژیلوس از روش رقت‌سازی و کشت به صورت پورپلیت استفاده شد [۲۱]. ابتدا هر یک از نمونه‌ها را جداگانه آسیاب کرده تا کاملاً یکنواخت شوند، بعد ۲۵ گرم از آن را وزن نموده و به یک ارلن حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد.

برای مدت ۲۰ دقیقه بر روی چرخاننده مغناطیسی قرار

داده شد. سپس در دو لوله آزمایش رقت‌های $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$

نیز از این نمونه تهیه گردید. سپس سه پلیت در نظر گرفته

و ۱ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$

آفلاتوکسین بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم بود که ۸۳ درصد این نمونه‌ها ذرت بودند [۱۷]. سالس ویوشیزاوا در سال ۲۰۰۵ با مطالعه بر روی ۷۸ نمونه برنج از کشورهای تایلند و ویتنام آلودگی ۹۴ درصد از نمونه‌ها را به قارچ‌های اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس و سم آفلاتوکسین گزارش نمودند [۱۸]. میزان استاندارد قارچ در مواد پروتئینی گیاهی شامل سویا و ذرت 5×10^5 پرگنه در هر گرم و مواد پروتئینی حیوانی شامل پودرماهی 10^4 پرگنه در هر گرم می‌باشد [۱۹]. حد مجاز سم آفلاتوکسین در هر یک از مواد اولیه خوراک طیور ۳۰ میکروگرم در هر کیلوگرم و برای غذای آماده شده ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد [۱۹].

می‌توان گفت در اقلام عمده مواد غذایی، بالقوه آلودگی به قارچ و سم ناشی از آن وجود دارد. برخی از مناطق کشورمان نظیر استان خوزستان به دلیل شرایط اقلیمی خاص از نظر درجه حرارت و میزان رطوبت نسبی، شرایط مناسبی برای رشد قارچ‌های توکسین‌زا و تولید سم توسط آن‌ها بر روی منابع غذایی فراهم می‌سازد و در این شرایط اقلیمی حتی مواد اولیه وارداتی نیز به راحتی به این قارچ‌ها و سموم حاصل، آلوده می‌شوند. به دلیل اهمیت زیاد آفلاتوکسین و قارچ‌های تولیدکننده آن به خصوص اسپرژیلوس‌ها در بهداشت انسان و دام، این بررسی به منظور جداسازی گونه‌های مختلف اسپرژیلوس و اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودرماهی، ذرت و سویا انجام گرفت تا ارتباط بین آلودگی اجزاء مختلف دان با نوع قارچ و سم حاصله مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

الف) مواد و وسائل مورد نیاز

محیط کشت سابورو دکستروز آگار ساخت شرکت‌های مدیا هند، محلول شفاف کننده لاکتوفنل کاتلن‌بلو، هگزان نرمال،

به ترتیب در هر پلیت ریخته و پس از آن ۱۲ میلی لیتر محیط آماده شده سابورو دکستروز آگار به هر یک اضافه گردید. پس از سفت شدن محیطها، پلیتها در انکوباتور ۳۷ سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ۳ تا ۵ روز تعداد پرگنه‌های قارچ آسپرژیلوس در پلیتی که کمتر از ۱۵۰ پرگنه داشت شمارش شده و در عکس رقت ضرب شد. سپس با میکروسکوپ بررسی گردید. آسپرژیلوس فومیگاتوس پرگنه‌های صاف و سفید رنگ ایجاد نموده که به سرعت به رنگ خاکستری مایل به سبز کرکی و یا چین دار تغییر می‌کند. کونیدیوفور آن پهن و بزرگ و به شکل وزیکول بوده و روی آن تعدادی فیالید وجود دارد. آسپرژیلوس فلاووس ایجاد پرگنه‌های صاف و یا شیاردار به رنگ زرد تا زرد مایل به سبز می‌نماید. کونیدیوفور آن دارای دیواره ضخیم، فاقد رنگدانه، ناصاف و طویل می‌باشد. وزیکول‌ها کروی بوده و فیالیدها دور تا دور آن قرار دارند. آسپرژیلوس نیجر دارای پرگنه‌های سیاه رنگ بوده، کونیدیوفور تیره و وزیکول‌ها گرد بوده و ایجاد فیالیدهایی در تمام سطح خود می‌کنند.

برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین، ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌های آسیاب شده را وزن نموده و در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتر به آن، ۵۰ میلی لیتر متانول ۵۵ درصد و ۲۰ میلی لیتر هگزان اضافه و برای ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. سپس به ظروف سانتریفوژ منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن ۳ لایه مجزا در لوله‌ها ایجاد می‌شود که به وسیله یک پیپت، ۲۵ میلی لیتر از لایه وسط برداشت شده و وارد قیف جداکننده گردید. سپس ۴۰ میلی لیتر کلروفرم به آن اضافه شد. قیف را به مدت یک دقیقه به هم زده تا دو لایه ایجاد شود. لایه پایین را روی یک کاغذ صافی حاوی ۱۰ گرم سولفات سدیم بدون آب و ۱۰ گرم سلیکاژل، روی یک قیف ساده، عبور داده در شیشه‌های کوچک درب‌دار جمع‌آوری شد. عصاره استخراج شده در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلروفرم

کاملاً تبخیر شده و عصاره خشک گردد. سپس ۱۰۰ لاندا استونیتریل بنزن به عصاره خشک شده اضافه گردید و پس از بستن درب ظرف شیشه‌ای، آن را به شدت تکان داده تا کاملاً حل شود. با استفاده از سرنگ هامیلتون ۱۰ لاندا از محلول را برداشته، روی صفحات سلیکاژل به ابعاد ۲۰×۲۰ سانتیمتر، با عمق ۰/۲۵ میلیمتر، نقطه‌گذاری شد. در کنار نقطه‌ها ۱۰ لاندا از محلول‌های استاندارد نیز نقطه‌گذاری گردید. سپس صفحات خشک شده در تانک حاوی محلول کلروفرم-استن قرار داده شد تا آفلاتوکسین همراه محلول روی صفحه صعود کند. سپس صفحات به صورت وارونه در تانک حاوی دی‌اتیل‌اتر قرار داده شدند تا مواد اضافی حذف گردد. سپس صفحات خشک شده بوسیله اسیدسولفوریک ۵۰ درصد اسیدی شدند تا آفلاتوکسین ظاهر شود و بعد هر صفحه در اتاقک UV بررسی گردید. سموم B_1 و B_2 به رنگ آبی و G_1 و G_2 به رنگ سبز مشاهده گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از آلودگی کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی به قارچ آسپرژیلوس و آفلاتوکسین در جداول ۱ و ۲ آمده است. بالاترین میزان آلودگی به آفلاتوکسین و قارچ آسپرژیلوس مربوط به پودر ماهی می‌باشد. میزان و درصد آلودگی کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی تولید داخل و وارداتی به سم آفلاتوکسین و پرگنه‌های قارچ در جداول ۳، ۴ و ۵ آمده است. بالاترین میزان آفلاتوکسین B_1 ، G_1 و G_2 در کنجاله سویا وارداتی به ترتیب ۵، ۹ و ۱۵ میکروگرم در کیلوگرم بود و آفلاتوکسین B_2 در کنجاله سویای وارداتی قابل اندازه‌گیری نبود. در کنجاله سویای تولید داخل بالاترین میزان B_1 و G_2 به ترتیب ۹ و ۱۵ میکروگرم در کیلوگرم بوده و میزان B_2 و G_1 قابل اندازه‌گیری نبود. بالاترین میزان آفلاتوکسین B_1 در ذرت

وارداتی و تولید داخل به ترتیب ۱۰ و ۸ میکروگرم در کیلوگرم بود و G_1 در ذرت وارداتی ۴ میکروگرم در کیلوگرم بود ولی B_2 در ذرت تولید داخل و وارداتی و G_1 در ذرت تولید داخل و G_2 در ذرت وارداتی قابل اندازه گیری نبود. در پودر ماهی وارداتی و تولید داخل بالاترین میزان آفلاتوکسین B_1 به ترتیب ۱۰ و ۱۵ میکروگرم در کیلوگرم و G_1 و ۱۵ و ۷ میکروگرم در کیلوگرم بود و B_2 و G_2 قابل اندازه گیری نبودند.

جدول ۱- حداکثر و حداقل میزان آفلاتوکسین B_1, B_2, G_1 و G_2 در کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی وارداتی و تولید داخل کشور

میزان آفلاتوکسین	کنجاله سویا				ذرت				پودر ماهی			
	وارداتی		تولید داخل		وارداتی		تولید داخل		وارداتی		تولید داخل	
	حداکثر	حداقل	حداکثر	حداقل	حداکثر	حداقل	حداکثر	حداقل	حداکثر	حداقل	حداکثر	
B_1	۹	۵	۹	۵	۱۰	۵	۸	۵	۱۰	۱۵	۵	
B_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G_1	۵	-	۴	۳	-	-	۱۵	۷	۵	-	-	
G_2	۱۵	-	-	-	۱۰	-	-	-	-	-	-	

جدول ۲- تعداد و درصد آلودگی کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی به قارچ اسپرژیلوس

نمونه	کل نمونه‌ها	تعداد و درصد نمونه آلوده			
		اسپرژیلوس	اسپرژیلوس فلاووس	اسپرژیلوس فومیگاتوس	اسپرژیلوس نیجر
سویا	۲۵	۲۴(٪۹۶)	۲۳(٪۹۲)	۶(٪۲۴)	۲۳(٪۹۲)
ذرت	۲۵	۲۲(٪۸۸)	۲۱(٪۸۴)	۴(٪۱۶)	۱۹(٪۷۶)
پودر ماهی	۲۵	۲۵(٪۱۰۰)	۲۰(٪۸۰)	۸(٪۳۲)	۲۳(٪۹۲)
مجموع	۷۵	۷۱	۶۴	۱۸	۶۵
درصد آلودگی		٪۹۴/۶	٪۸۵/۳	٪۲۴	٪۸۶/۶

جدول ۳- تعداد و درصد آلودگی کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی به آفلاتوکسین بر اساس میکروگرم در کیلوگرم

نمونه	تعداد نمونه	تعداد و درصد نمونه آلوده				
		آفلاتوکسین	AF B_1	AF B_2	AF G_1	AF G_2
سویا	۲۵	۱۰(٪۴۰)	۸(٪۳۲)	-	۱(٪۴)	۱(٪۴)
ذرت	۲۵	۱۰(٪۴۰)	۸(٪۳۲)	-	۲(٪۸)	۱(٪۴)
پودر ماهی	۲۵	۱۵(٪۶۰)	۱۰(٪۴۰)	-	۷(٪۲۸)	۱(٪۴)
مجموع	۷۵	۳۵	۲۶	-	۱۰	۳
درصد آلودگی		(٪۴۶/۶)	(٪۳۴/۶)	-	(٪۱۳/۳)	(٪۴)

جدول ۴- میزان و درصد آلودگی کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی وارداتی و تولید داخل کشور به قارچ اسپرژیلوس و آفلاتوکسین بر اساس میکروگرم در کیلوگرم

نمونه	تعداد نمونه	تعداد و درصد آلودگی بالای حد استاندارد به قارچ اسپرژیلوس	تعداد و درصد آلودگی پایین تر از حد استاندارد به قارچ اسپرژیلوس	تعداد و درصد آلودگی به آفلاتوکسین
کنجاله سویا وارداتی	۱۷	-	۱۷(٪۱۰۰)	۸(٪۴۷)
کنجاله سویا تولید داخل	۸	-	۷(٪۸۷/۵)	۲(٪۲۵)
ذرت وارداتی	۱۶	-	۱۵(٪۹۳/۷)	۶(٪۳۷/۵)
ذرت تولید داخل	۹	-	۷(٪۷۷/۷)	۴(٪۴۴/۴)
پودر ماهی وارداتی	۱۵	۲(٪۱۳/۳)	۱۳(٪۸۶/۶)	۱۰(٪۶۶/۶)
پودر ماهی تولید داخل	۱۰	۱(٪۱۰)	۹(٪۹۰)	۵(٪۵۰)
مجموع	۷۵	۳(٪۴)	۶۸(٪۹۰/۶)	۳۵(٪۴۶/۶)

جدول ۵- میانگین آلودگی آفلاتوکسین و تعداد پرگنه‌های قارچ کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی تولید داخل و وارداتی

نوع نمونه	میانگین شمارش پرگنه‌های قارچ	میانگین آفلاتوکسین استخراج شده
سویا وارداتی	۹۷۷۷	۳/۲۳
سویا تولید داخل	۸۹۲۵	۱/۷۵
ذرت وارداتی	۴۸۳۱	۲/۶۲
ذرت تولید داخل	۲۱۲۳۳	۴
پودر ماهی وارداتی	۳۳۸۲	۵/۸
پودر ماهی تولید داخل	۱۶۳۵۶	۴/۵

بحث

این بررسی بر روی ۷۵ نمونه از مواد اولیه خوراک طیور شامل ۲۵ نمونه از هر یک از اقلام سویا، ذرت و پودر ماهی جمع‌آوری شده از دو کارخانه تولید کننده دان پرندگان و مرغداری‌های دارای انبار غذایی انجام گرفت. جداول ۱، ۲

و ۳ نشان می‌دهد از ۲۵ نمونه کنجاله سویا، ۲۴ نمونه (٪۹۶) آلوده به قارچ اسپرژیلوس و ۱۰ نمونه (٪۴۰) آلوده به سم آفلاتوکسین بودند که از این بین، ۸ مورد (٪۳۲) آلوده به سم آفلاتوکسین B_1 و ۱ نمونه (٪۴) آلوده به سم آفلاتوکسین G_1 و G_2 بودند که بالاترین مقدار آفلاتوکسین B_1 ، G_1 و G_2 به ترتیب به میزان ۹، ۵ و ۱۵ میکروگرم در کیلوگرم مربوط به کنجاله سویای وارداتی بود. بالاترین میزان آلودگی قارچی مربوط به اسپرژیلوس فلاووس و نیجر با ۲۳ نمونه (٪۹۲) بود. میانگین تعداد پرگنه سویای داخلی از میانگین تعداد پرگنه سویای وارداتی کمتر بود. میزان آلودگی قارچی تمام نمونه‌های سویا از میانگین آلودگی استاندارد کشورمان که 5×10^5 می‌باشد کمتر بود. به نظر می‌رسد کمتر بودن میزان آلودگی احتمالاً به علت رعایت شرایط بهداشتی در هنگام برداشت، افزودن مواد نگهدارنده و ضدقارچ به کنجاله سویا و فراهم کردن شرایط خوب و مناسب حمل این ماده به کارخانه‌های تولیدکننده خوراک ماکیان می‌باشد. نکته قابل توجه این‌که میانگین تعداد پرگنه اسپرژیلوس در نمونه‌های جمع‌آوری شده از

ذرت انبارها بیشتر می باشد که به نظر می رسد طولانی شدن مدت زمان نگهداری ذرت در انبار مرغداری و فراهم شدن شرایط مناسب رشد قارچ می تواند در افزایش میزان آلودگی ذرت به قارچ موثر باشد.

جدول ۶- میانگین آلودگی آفلاتوکسین و تعداد پرگنه های قارچ کنجاله سویا، ذرت و پودر ماهی انبار کارخانجات و مرغداری ها

نوع نمونه	میانگین شمارش پرگنه های قارچ	میانگین آفلاتوکسین استخراج شده
سویا اخذ شده از انبارها	۱۵۱۳	۲/۶۶
سویا اخذ شده از مرغداری ها	۲۰۲۶۲	۲/۸۱
ذرت اخذ شده از انبارها	۵۵۰۸	۲/۹۱
ذرت اخذ شده از مرغداری ها	۱۵۵۲۳	۳/۳
پودر ماهی اخذ شده از انبارها	۲۲۲۰	۶/۶۳
پودر ماهی اخذ شده از مرغداری ها	۱۴۲۷۹	۴/۲۱

۲۵ نمونه پودر ماهی مورد مطالعه آلوده به قارچ اسپرژیلوس بودند و بالاترین میزان آلودگی مربوط به قارچ اسپرژیلوس نیجر با ۲۳ نمونه (۹۲٪) و سپس به ترتیب اسپرژیلوس فلاووس با ۲۰ نمونه (۸۰٪) و اسپرژیلوس فومیگاتوس با ۸ نمونه (۳۲٪) می باشد (جدول ۲). بیشترین میزان آلودگی قارچی مربوط به پودر ماهی داخلی بود (جدول ۶). میانگین تعداد پرگنه های پودر ماهی مرغداری ها از میانگین تعداد پرگنه های پودر ماهی انبارها بیشتر بود. از ۲۵ نمونه پودر ماهی، ۱۰ نمونه (۴۰٪) فاقد آلودگی به هر گونه سم آفلاتوکسین بودند. ۱۰ نمونه (۴۰٪) آلوده به B_1 ، ۷ نمونه (۲۸٪) آلوده به G_1 و یک نمونه (۴٪) آلوده به

مرغداری ها نسبت به نمونه های جمع آوری شده از انبارها بیشتر می باشد و این امر موید آن است که در مرغداری ها به علت افزایش زمان نگهداری دان و فراهم شدن شرایط مناسب رشد، تعداد بیشتری از قارچ ها رشد می کنند و اگر بعد از تهیه دان مدت نگهداری طولانی گردد، میزان آلودگی قارچی افزایش می یابد. از طرفی میزان آلودگی در کنجاله سویای وارداتی بیش از کنجاله سویای داخلی بود که علت آن به شرایط نامناسب مانند بالا بودن رطوبت انبارها در کشتی های حمل کننده دان های وارداتی و نیز افزایش فاصله زمانی بین تولید تا مصرف دان بر می گردد. بنا به گزارش آلام و همکاران در سال ۲۰۰۱ احتمال آلودگی انواع مختلف دان طیور به قارچ اسپرژیلوس و سم آفلاتوکسین ارتباط مستقیم با میزان رطوبت و طول مدت نگهداری دارد [۲۲].

از ۲۵ نمونه ذرت جمع آوری شده ۲۲ نمونه (۸۸٪) آلوده به قارچ اسپرژیلوس بودند که به ترتیب اسپرژیلوس فلاووس از ۲۱ نمونه (۸۴٪) اسپرژیلوس نیجر از ۱۹ نمونه (۷۶٪) و از ۴ نمونه (۱۶٪) نیز اسپرژیلوس فومیگاتوس جدا شده است. میزان آلودگی قارچی تمام نمونه های ذرت از میانگین استاندارد کشورمان که 5×10^5 می باشد کمتر است. میانگین تعداد پرگنه های ذرت داخلی به مقدار ۲۱۲۳۳ بود که از میانگین تعداد پرگنه های ذرت وارداتی که به تعداد ۴۸۳۱ می باشد کمتر است. به نظر می رسد کمتر از حد استاندارد بودن آلودگی قارچی نمونه های ذرت به علت رطوبت کم، افزودن مواد ضد قارچ، نگهداری و حمل مناسب از مبدأ تا مقصد می باشد. از ۲۵ نمونه ذرت، ۱۰ مورد (۴۰٪) آلوده به آفلاتوکسین بودند که ۸ مورد (۳۲٪) آلوده به آفلاتوکسین B_1 ، ۲ مورد (۸٪) آلوده به G_1 و ۱ مورد (۴٪) آلوده به G_2 بود. بالاترین مقدار آفلاتوکسین B_1 مربوط به ذرت وارداتی به میزان ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم بود. جدول ۶ نشان می دهد میانگین تعداد پرگنه های ذرت مرغداری ها از میانگین پرگنه های

از طرفی در بررسی حاضر، نمونه برداری‌ها از هر یک از اقلام دان به صورت جداگانه انجام گرفت، در حالی که بنا به گزارش لانیاسونیا و همکاران در سال ۲۰۰۵ تا مرحله تبدیل این اقلام به دان مخلوط و آماده شده، به علت عدم اطلاع کافی بسیاری از مرغداران در نگهداری صحیح دان آماده شده و یا عدم وجود انبار و جایگاه مناسب برای نگهداری دان، به خصوص در مناطق و فصولی که درصد رطوبت هوا بالا می‌باشد شرایط مساعد برای رشد بیشتر قارچ و تولید بیشتر سم فراهم خواهد شد [۴]. سوسل در سال ۲۰۰۴ با مطالعه بر تعداد زیادی نمونه‌های اخذ شده از کشورهای مختلف آمریکای جنوبی گزارش نمود آب و هوای گرم و مرطوب این کشورها شرایط مساعدی برای رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین فراهم می‌کند [۲۶].

پودر ماهی و کنجاله سویا به علت خرد شدن و نداشتن پوسته محافظ، به راحتی در دسترس قارچ‌ها قرار گرفته و قارچ‌ها می‌توانند به راحتی روی آن‌ها رشد کنند. ذرت دارای حداقل آلودگی قارچی بود زیرا دارای پوسته کامل می‌باشد و هنگام برداشت به وسیله کارخانه‌های ذرت خشک‌کنی رطوبت آن را به کمتر از ۱۰ درصد می‌رسانند که این دو فاکتور باعث ایجاد شرایط نامساعد برای رشد قارچ‌ها می‌شوند. بنا به گزارش چیک و شول در سال ۱۹۸۵ و آلام و همکاران در سال ۲۰۰۱ در دانه‌های فاقد پوشش طبیعی و یا دانه‌هایی که پوشش آن‌ها دچار آسیب شده، احتمال آلودگی به قارچ اسپرژیلوس و سم آفلاتوکسین بیشتر است [۲۱ و ۲۲].

وجود آلودگی به قارچ اسپرژیلوس و سم آفلاتوکسین در نمونه‌های مورد آزمایش می‌تواند در اثر عدم دقت کافی در هنگام خشک کردن این مواد باشد زیرا قارچ‌ها به دلیل گسترش بسیار زیاد و پتانسیل رشد بالایی که دارند به محض فراهم شدن شرایط رشد، شروع به رشد می‌کنند [۲۷]. فرآورده‌هایی از قبیل پودر ماهی، ذرت و

G_2 بودند. بالاترین مقدار B_1 و G_1 به ترتیب مربوط به پودر ماهی داخلی و پودر ماهی وارداتی می‌باشد. علی‌رغم این که میانگین تعداد پرگنه‌های اسپرژیلوس در سویا، ذرت و پودر ماهی از حد استاندارد کشورمان کمتر می‌باشد ولی اگر شرایط مساعد کننده نظیر رطوبت و دما فراهم باشد و مدت نگهداری تحت شرایط مناسب رشد قارچ افزایش یابد، احتمالاً میزان آلودگی بیشتر می‌شود و گله‌های تغذیه کننده با غذای تهیه شده از این مواد را به خصوص در هنگامی که سیستم ایمنی آن‌ها تضعیف شده باشد تحت تاثیر قرار دهد [۵]. کسکین در سال ۱۹۹۱ ارتباط مثبت بین افزایش رشد قارچ و تولید سم را با افزایش مدت نگهداری دان گزارش نموده بود [۲۳]. آلام و همکاران در سال ۲۰۰۱ با مطالعه بر ۶ نوع دانه گیاهی جیره پرندگان گزارش نمودند که همراه با افزایش رطوبت دان و طول مدت نگهداری آن میزان آلودگی قارچی افزایش می‌یابد [۲۲]. از طرفی وجود آلودگی بالا با اسپرژیلوس فلاووس که عامل بالقوه تولید سم می‌باشد را می‌بایست در نظر داشت. حتی مصرف مقادیر کم قارچ و سموم قارچی اثرات مخرب و زیان‌آوری بر سیستم ایمنی پرنده وارد می‌سازد [۵]. گیامبرون و همکاران در سال ۱۹۸۵ تضعیف سیستم ایمنی با واسطه سلولی در جوجه بوقلمون‌های یک روزه تغذیه شده با جیره آلوده به ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین و نیز ۱۰۰٪ مرگ و میر طیور تغذیه شده با ۱۰۰۰-۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم جیره آلوده به آفلاتوکسین را گزارش نمود [۲۴]. این سموم همچنین دارای اثر منفی بر رشد و تمامی پارامترهای دیگر نظیر ضریب تبدیل غذایی، وزن، میزان تولید تخم‌مرغ و غیره می‌باشد. پرز در سال ۲۰۰۱ این اثرات مخرب را با تغذیه بوقلمون‌ها با دان حاوی آفلاتوکسین بررسی نمود [۲۵].

کافی و شرایط مناسب برای تولید توکسین ایجاد نمی‌گردد. به عنوان مثال دمای مطلوب و زمان لازم برای تولید آفلاتوکسین توسط اسپرژیلوس فلاووس ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ۷ تا ۹ روز می‌باشد. در ۳۰ درجه سانتی‌گراد زمان لازم ۵ تا ۷ روز و در ۲۰ درجه سانتی‌گراد مدت لازم برای تولید سم به ۱۱ تا ۱۳ روز می‌رسد. علاوه بر درجه حرارت و زمان لازم عوامل دیگری از قبیل ترکیبات مواد غذایی، رطوبت، PH و فشار اسمزی در تولید سم توسط قارچ اهمیت دارند. با توجه به شرایط ذکر شده می‌توان گفت نمونه‌هایی که به ظاهر دارای آلودگی قارچی کمتری نسبت به نمونه‌های دیگر بودند ولی میزان سم اندازه‌گیری شده در آنها بیشتر بوده، در شرایط مناسب‌تری از لحاظ تولید سم قرار داشتند، از طرفی ممکن است قارچ‌ها در صورت نامطلوب شدن شرایط از بین بروند اما سم تولید شده توسط آنها همچنان باقی می‌ماند. با توجه به این مطلب می‌توان نتیجه گرفت در برخی نمونه‌ها احتمالاً میزان آلودگی قارچی در مراحل قبل از نمونه‌برداری و انجام آزمایش بیشتر از مقدار اندازه‌گیری شده در هنگام آزمایش بوده است و تولید سم موجود در این نمونه‌ها به قبل از کاهش آلودگی قارچی در اثر نامطلوب شدن شرایط محیطی بر می‌گردد [۳۰ و ۳۱].

از مقایسه نتایج این بررسی و مطالعات انجام شده در سایر کشورها می‌توان نتیجه گرفت در اقلام عمده مواد غذایی بالقوه آلودگی به قارچ و سم ناشی از آن وجود دارد و می‌بایست در هنگام برداشت کلیه اقلام تشکیل دهنده خوراک پرندگان، استانداردهای جهانی اعمال گردد و تا زمان مصرف نیز شرایط مناسبی برای حمل و نگهداری آنها ایجاد شود. نکته قابل توجه دیگر این که هر چه زمان برداشت محصول در نقطه پایانی خط تولید یا در زمان تهیه خوراک تا زمان مصرف کمتر باشد، احتمال آلودگی کمتر است.

کنجاله سویا چنانچه در محیط‌های مرطوب نگهداری شوند یا در هنگام فراوری آنها یا در مسیر حمل و نقل آنها دقت لازم نشود شرایط رشد قارچ بر روی آنها فراهم شده، اسپوره‌های موجود رشد کرده و تولید سم می‌کنند [۵]. بنا به گزارش تامسون و هنک در سال ۲۰۰۰ تولید آفلاتوکسین در صورت وجود شرایط مناسب، بدون توجه به طول مدت ذخیره و شرایط آب و هوایی انجام می‌گیرد [۲۸]. هنک و همکاران در سال ۲۰۰۱ با مطالعه بر روی ۱۴۲ نمونه دانه‌های گیاهی گزارش نمودند در صورت فراهم بودن شرایط مناسب، امکان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در تمام مراحل از عمل‌آوری تا ذخیره وجود دارد [۱۷].

شرایط خوب بسته‌بندی در مورد پودر ماهی بسیار مهم است زیرا عدم تهویه و وجود رطوبت و عدم فراوری مطلوب می‌تواند از عللی باشد که پودر ماهی را به اقسام قارچ‌ها آلوده نماید. موضوع مورد توجه دیگر نگهداری مواد به صورت خرد شده یا سالم است، زیرا آلودگی قارچی، ابتدا به صورت فراوان در دانه‌های شکسته یا آسیب دیده یا دانه‌هایی که توسط غلاف پیچیده شده‌اند ولی این پوشش قادر نیست تا مواد ناشسته‌ای داخل آن را برای مدت طولانی حفظ نماید به وجود می‌آید. بنا به گزارش پیر در سال ۱۹۹۱ دانه‌های ذرت فاقد پوشش، فاقد سد طبیعی برای جلوگیری از آلودگی به اسپرژیلوس می‌باشند که تولید آفلاتوکسین را در این دانه‌ها تسهیل می‌کند [۲۹].

مقایسه آلودگی نمونه‌ها به قارچ اسپرژیلوس و سم آفلاتوکسین نشان می‌دهد که در برخی نمونه‌ها با وجود بالا بودن آلودگی قارچی میزان آفلاتوکسین پایین بوده است، ولی در برخی نمونه‌های دیگر با وجودی که میزان آلودگی قارچی به ظاهر زیاد نبوده اما همان مقدار قارچ تولید سم کرده است. نکته قابل ذکر این که هر یک از گونه‌های قارچ اسپرژیلوس در شرایط ویژه‌ای قادر به تولید سم می‌باشند. گاهی با وجود آلودگی قارچی بالا در یک نمونه فرصت

مراجع

- [۱۰] محسنی، امیررضا، آفلاتوکسیکوز در دام‌های اهلی، نحوه شناسایی و تشخیص آلودگی به آفلاتوکسین در خوراک دام، پایان‌نامه دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ۱۳۷۷، صفحات ۱۱۲-۱۱۱.
- [۱۱] میاحی، منصور، بیماری‌های باکتریایی و قارچی پرندگان، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۳۷۷، صفحات ۱۶۸-۱۶۵.
- [12] Bhat, R.V. and Vasanthi, S., Mycotoxin food safety risk in developing countries, *Food, Agriculture and Environment*, (2003) 1-2 .
- [13] Thorpe, W., Muriuki, H.G., Omore, A. and Steal, S., Dairy development in Kenya :The past ,the present and the future. Paper presented at the annual symposium of The Animal Production Society of Kenya, Nairobi, (2000) 22-23.
- [14] Kenya Ministry of Health (KMOH), Outbreak of aflatoxin poisoning in Eastern and central provinces, Kenia, Nairobi, (2000) 1-5.
- [۱۵] مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، روش نمونه‌برداری از محصولات کشاورزی جهت آزمون آفلاتوکسین، چاپ دوم، استاندارد، ۱۳۷۷، شماره ۲۵۸۱.
- [16] Fischer, J.R., Jain, A.V., Shipes, D.A. and Osborne, J.S., Aflatoxin contamination of corn used as bait for deer in the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 31 (1995) 570-572.
- [17] Henke, S.E., Gollardo, V.C., Martinez, B. and Bailey, R., Survey of aflatoxin concentration in wild bird seed purchased. *Journal of Wildlife Diseases*, 37, 4 (2001) 831-835.
- [1] International crops research Institute for the semi arid tropics, Aflatoxins in food. WWW.Aflatoxin.info.asp. (2004).
- [۲] بزرگمهری‌فرد، محمد حسن، راهنمای بیماری‌های طیور، انتشارات کوثر، ۱۳۷۵، صفحات ۲۲۲-۲۲۱.
- [3] Hofstad, M.S., Disease of poultry, Iowa State University Ames USA, (1984).
- [4] Lanyasunya, T.P., Wamae, L.W., Musa, H.H., Olowofeso, O. and Lokwaleput, I. K, The risk of mycotoxins cantamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, 3 (2005) 162-169 .
- [5] Schweitzer, S.H., Quist, C.F., Grimes, G.L. and Forster, D.L, Aflatoxin levels in corn available as wild turkey feed in Georgia. *Journal of Wildlife Diseases*, 37, 3 (2001) 657-659.
- [6] Plasencia, J., Aflatoxin in maize: A Mexican perspective. *Journal of Toxicology*, 23 (2004) 155-177.
- [7] Johri, T.S., Exogenous toxicants. *Central Avian Research Institute*, (2005).
- [8] Smela, M.E. and Curier, S.S., The chemistry and biology of aflatoxin B1, carcinogenesis. *Journal of Wildlife Diseases*, 22 (2001) 535-545.
- [9] Mohiudin, S.M., Effects of aflatoxin on immune respons in viral disease. *Poultry Adviser*, (1993) 63 – 66.

- [24] Giambro, J.J., Deiner, N.D. and Hoerr, F.J., Effect of purified aflatoxin on turkeys. *Poultry Science*, 64 (1985) 859-865.
- [25] Perez, M., Henke, S.E. and Fedynish, A.M., Detection of aflatoxin contaminated grain by three granivorous bird species. *Journal of Wildlife Diseases*, 37 (2001) 358-361.
- [26] Scussel, V.M., Aflatoxin and food safety: Recent south American perspectives. *Journal of Toxicology*, 23 (2004) 179-216.
- [27] Smith, J.E., *Aflatoxins*, In *handbook of plant and fungal toxicants*, CRC Press, Boca Raton, Florida, (1997) 269-285.
- [28] Thompson, C. and Henke, S.E., Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production and its associated risk to wildlife species. *Journal of Wildlife Diseases*, 36 (2000) 172-179.
- [29] Pier, A.C., Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science*, 70 (1992) 3964-3967.
- [30] Gold blat, L.A., *Food science and technology* (Aflatoxin), Academic Press, INC. LTD, (1969).
- [31] Lindenfelzer, L.A., *Food additives and contaminants*. Inc Company, (1970) 167-176.
- [18] Sales, A.C. and Yoshizawa, T., Updated profile of aflatoxin and aspergillus section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *Journal of Toxicology*, 22 (2005) 429-439.
- [۱۹] مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، روش جستجو و شمارش قارچها، چاپ دهم، استاندارد، ۱۳۷۴، شماره ۹۹۷.
- [20] Carlile, M.Y. and Walkinson, S.C., *The fungi*, Academic press limited, (1994).
- [21] Cheeke, P.R. and Shull, L.R., Natural toxicants in feeds and poisonous plants. *American Veterinary Institute Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut*, (1985) 215-216.
- [22] Alam, M.S., Islam, M.R. and Banu, M.S., Abundance of fungal flora in relation to moisture content and storage period in different typs of poultry feed ingredient. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4, 10 (2001) 1194-1197.
- [23] Keskin, G. and Ugra, A., Fungal isolation, identification and quantification and mycotoxin detection in poultry feeds and raw feed materials, Pendik-Hastalıkları-Markez-Arasterma-Enstitute-Dergigi, 22 (1991) 138-147.