دوفصلنامه تحقیقات بیماری های گیاهی
سال دوم، شماره دوم، پاییز و زمستان 1393
صص 70-55

توانائی تولید افلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در تعدادی از گونه های قارچ آسپرژیلوس به روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC)

فاطمه اصغرنژاد[1]، صفرعلی مهدیان[*2]، بهنام امیری بشلی[2]، سید سامان سید جعفر نظری[3]

تاریخ دریافت: 93/3/11 تاریخ پذیرش: 93/6/19

چکیده

افلاتوکسین ها متابولیت‌های ثانویه شدیداً سمی گونه های به خصوصی از قارچ آسپرژیلوس هستند که به دنبال رشد روی طیف وسیعی از محصولات کشاورزی و غذائی تولید می شوند. در این بررسی به ارزیابی تولید افلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 در چند گونه قارچ *Asprgillus* شامل: *A. terreus*، *A. ustus*، *A. candidus*، *A. carneus*، *A. ostianus*، *A. auricomus*، *A. niveus*، *A. niger*، *A. fumigatus*، *A. parasiticus*، *A. caespitosus*، *A. awamori* و *A. sclerotiorum* در محیط کشتی مناسب و ساده (سیب زمینی دکستروز براث PDB) و به روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) پرداخته شده است. قارچ های یاد شده پس از جداسازی و خالص سازی مورد شناسایی قرار گرفتند و در 50 میلی لیتر محیط PDB مایه زنی شدند. قارچهای مایه زنی شده در شرایط مشابه محیط طبیعی رشد قارچ در دمای 26 درجه سانتیگراد، رطوبت 80% و تاریکی به مدت22 روز نگهداری و سپس افلاتوکسین های حاصل از آن‌ها استخراج شد. ترشحات قارچی نمونه ها توسط 10 میلی لیتر کلروفرم از عصاره فیلتر شده محیط غذائی استخراج و پس از تبخیر حلال، رسوب حاصله در 3 میلی لیتر متانول حل و فیلتر شده و به دستگاه HPLC تزریق گردید. نتایج آزمایشات نشان داد از میان 13 گونه قارچ آسپرژیلوس، گونه *A. parasiticus* بیشترین میزان افلاتوکسین کل را تولید نمود. افلاتوکسین G_1 در گونه‌های *A. terreus*، *A. fumigatus*، *A. carneus*، *A. niveus*، *A. parasiticus*، *A. caespitosus*، *A. ostianus* و *A. niger* تولید نشد و افلاتوکسین G_2 در گونه‌های *A. niger*، *A. ostianus*، *A. niveus* و *A. sclerotiorum* و افلاتوکسین B_2 در گونه‌های *A. carneus* و *A. sclerotiorum* و افلاتوکسین B_1 در گونه *A. ostianus* تولید نشدند. در گونه *A. parasiticus* میزان تولید افلاتوکسین B_1 بیشترین و افلاتوکسین G_1 کمترین مقدار در بین چهار نوع افلاتوکسین مورد آزمایش بود.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، مایکوتوکسین، افلاتوکسین، ایمنی غذایی، HPLC

[1]- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[2]- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[3]- دانشجوی دکتری رشته شیمی تجزیه دانشگاه مازندران.
[*]- نویسنده مسئول مقاله: safaralim@gmail.com

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها (Mycotoxins) یکی از بارزترین آلوده کننده های مواد غذائی هستند که بهداشت عمومی، امنیت غذائی و اقتصاد ملی بسیاری از کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه را تحت تاثیر قرار می‌دهند (رحیمی و همکاران، 1387). مایکوتوکسین‌ها یکی از منابع آلوده کننده برخی از محصولات غذایی و به خصوص دانه‌های روغنی، غلات، سبزیجات و میوه‌ها هستند (Reddy *et al*., 2008). این سموم عمدتاً توسط پنج جنس از قارچ‌ها شامل گونه‌هائی از *Aspergillus* sp. ،*Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. و *Claviceps* sp. تولید می‌گردند. یکی از مهمترین مایکوتوکسین‌ها، افلاتوکسین‌ها هستند که عمدتاً توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس مانند *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* تولید می‌گردند. افلاتوکسین در اکثر محصولات گیاهی به ویژه در دانه‌های روغنی نظیر بادام زمینی، پسته، نارگیل، سویا، ذرت، پنبه دانه، برنج و گندم یافت می‌شود (D'Mello and MacDonald, 1997). امکان انتقال این توکسین از مواد غذایی کپک زده به زنجیره غذایی انسان نیز وجود دارد. قارچ آسپرژیلوس به ویژه گونه *A. flavus* می تواند در مزرعه به دانه غلات و حبوبات حمله کند و در آنها عفونت ایجاد کند. قارچ پس از آلوده نمودن محصولات تکثیر یافته و تولید زهرآبه می کند. اگر تنش های مختلف محیطی وجود داشته باشد تولید زهرآبه افزایش می یابد. بیشترین میزان آلودگی به افلاتوکسین در این گیاهان قبل از برداشت محصول و در حال رشد اتفاق می افتد(Almasian *et al*., 2008). شرایط موجود پس از برداشت محصولات کشاورزی نیز روی تولید این متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار بوده و معمولاً در مراحل حمل و نقل، فرآوری و انبارداری تولید این توکسین می‌تواند ادامه پیدا کند. از عوامل مؤثر در تولید افلاتوکسین ها می توان به عوامل ژنتیکی و محیطی مانند نوع قارچ، نوع بستر، رطوبت، دما، رشد و صدمات محصول، انبارداری و تهویه محصول، نور و pH اشاره کرد. رشد قارچ های آسپرژیلوس لزوماً به مفهوم تولید افلاتوکسین ها نیست. علاوه بر این رطوبت بالا و هوای گرم، برای تولید بالاترین میزان افلاتوکسین در مواد غذائی لازم است. کپک آسپرژیلوس در دمای 33-28 درجه سانتیگراد و در رطوبت 97-83 درصد رشد می کند. دمای بهینه برای تولید افلاتوکسین بین 30- 24 درجه سانتیگراد گزارش شده است. از میان 18 نوع افلاتوکسین شناخته شده، افلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) در گروه A (سمی ترین) عوامل سرطانزا قرار گرفته اند. در این میان سمیت و سرطانزائی افلاتوکسین B_1 بیشتر از انواع دیگر گزارش شده است. افلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 متابولیت های سمی دی هیدروفوران- تتراهیدروفوران هستند که به حلقه کومارینی متصل می شود. افلاتوکسین، خاصیت سمیت حاد بازدارنده ایمنای، جهش زایی، ناهنجارزایی و سرطان زایی دارد (Ricordy *et al*., 2005). چندین روش برای سنجش کمی و کیفی تولید افلاتوکسین استفاده می شود. این روش ها شامل روش های مبتنی بر کشت، تجزیه دستگاهی، سرولوژیک و مولکولی است. روش های مبتنی بر کروماتوگرافی شامل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (HPLC) است. این تکنیک ها حساسیت بسیار بالائی داشته و به همین دلیل کاربردهای متعددی بعنوان یک ابزار تشخیصی مناسب پیدا نموده اند. کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (High performance liquid chromatography; HPLC) به عنوان

یک روش اندازه گیری افلاتوکسین با کاربردی ساده و حساسیت بالا در آنالیز افلاتوکسین های B و G در مواد غذائی با حساسیت تکنیک یک نانوگرم بر گرم است. مزیت اصلی HPLC سرعت بالا، اتوماسیون و دقت بالای آن است. این روش در مقایسه با سایر روش ها قابل اطمینان ترین و معمول ترین روش استفاده برای آنالیز و شناسائی افلاتوکسین است که به عنوان یک روش استاندارد و برتر در مقابل سایر روش های جدید شناخته شده است (Haung, 2007; Reddy *et al*., 2009). هدف اصلی این پژوهش تعیین کمّی و کیفی تولید افلاتوکسین درتعدادی از گونه های آسپرژیلوس در شرایط محیطی تعریف شده بوده است. بدین منظور پس از استخراج افلاتوکسین تولید شده از محیط کشت، جداسازی، شناسایی و اندازه گیری آنها با استفاده از دستگاه **HPLC** انجام شد.

مواد و روشها

نمونه برداری و جدا سازی

به منظور جداسازی قارچ آسپرژیلوس نمونه هایی از بذور گندم و ذرت از مراکز فروش منطقه ساری جمع آوری شدند. از هر فروشگاه خوراک دام مقدار 500 گرم بذر گندم و 500 گرم بذر ذرت خریداری شد و به آزمایشگاه منتقل شد. تعدادی از جدایه های قارچ آسپرژیلوس از آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شدند. این نمونه ها از خاک مناطق مختلف کشور قبلاً جداسازی شده بودند. بذور گندم و ذرت با هیپوکلریت سدیم 0/5 درصد 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 خالص سازی شد. قارچ خالص شده روی محیط کشت چاپک داکس آگار کشت داده شد و با استفاده از کلید شناسائی *بارنت و همکاران* (1979)، جنس آسپرژیلوس تشخیص داده شد. جهت شناسائی گونه های آسپرژیلوس، از محیط کشت‌های (چاپک عصاره مخمر آگار[1]، چاپک داکس آگار[2]، چاپک عصاره مخمر آگار سوکروز 20 درصد[3] و عصاره مالت آگار[4]) استفاده شد. قطعه ای پنج میلی متری از نمونه قارچ در سه نقطه تشتک آزمایش روی محیط کشت مایه زنی شد و درون اتاقک رشد با دمای 25 درجه سانتی گراد، نور 12 ساعت روشنائی و 12 ساعت تاریکی و طوبت نسبی 80 – 70 درصد به مدت یک هفته نگهداری شد (Agarwal and Sinclair, 1997). مشخصات مختلف ماکرو و میکرومورفولوژیکی نمونه ها (اندازه کلونی، رنگ کنیدیوم، رنگ میسیلیوم، رنگ معکوس(زیر تشتک)، ایجاد تراوش، تولید رنگدانه، تولید سختینه، شکل و اندازه وزیکول، تعداد لایه سلول ها روی وزیکول، اندازه، رنگ و وضعیت دیواره کنیدیوم و نیز پایه و مشخصات فرم جنسی در صورت تشکیل) بررسی و یادداشت شد و با استفاده از کلید شناسائی کلیک (Klick, 2002) تعداد 13 گونه آسپرژیلوس از هم متمایز و تشخیص داده شدند(جدول 1) و در آزمایش بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

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

تولید افلاتوکسین

به منظور ارزیابی توانائی تولید افلاتوکسین در هر یک از گونه‌ها با استفاده از لوپ سترون، قطعه ایی از قارچ همراه با محیط PDA به قطر تقریبی پنج میلی متر در محیط مایع عصاره سیب زمینی دکستروز(PDB 50 ml) مایه‌زنی شدند. قارچ های مایه زنی شده در اتاقک رشد در محیط تاریک با دمای 26 درجه سانتیگراد، رطوبت 80% و به صورت ساکن نگهداری شدند. در روز 22 پس از کشت قارچ ها، به منظور آزمایش تولید و یا عدم تولید افلاتوکسین عصاره گیری انجام شد. این بررسی در غالب طرح کاملاً تصادفی در 3 تکرار قارچ آسپرژیلوس در محیط مایع PDB انجام شد.

استخراج افلاتوکسین

به منظور استخراج افلاتوکسین ها از محیط کشت مایع PDB ابتدا محتوای هر یک ار فلاسک ها به طور یکنواخت مخلوط شد. مقدار 25 میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی هر یک از گونه های یاد شده از فیلتر کاغذی عبور داده شد. به این محلول 10 میلی لیتر حلال کلروفرم (Reddy *et al*., 2008; Fardos *et al*., 2009) اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت 20 دقیقه درون قیف دکانتور به هم زده شد. پس از گذشت مدت زمان کوتاهی فاز پایینی شامل حلال کلروفرم و افلاتوکسین های تولید شده جدا شد. این محلول (حاوی افلاتوکسین) به وسیله دستگاه تبخیر کننده چرخان (Rotary evaporator, Eyela N-1000, Japan) در دمای 45 درجه سانتیگراد و تحت خلاء حلال پرانی شد (Abbas *et al*., 2006). باقیمانده در سه میلی‌لیتر حلال متانول (Merk KGaA, Germany) دارای خلوص HPLC حل و از فیلتر سرسرنگی 0/22 میکرومتر (Einmal filter, Germany) عبور داده شد. نمونه های تغلیظ شده در فریزر 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه به دست آمده حاوی افلاتوکسین‌های تغلیظ شده به منظور شناسائی کیفی و اندازه گیری کمی به دستگاه HPLC تزریق شد. برای نمونه شاهد عملیات مشابه در محیط مایع PDB بدون مایه زنی قارچ انجام شد.

آزمایش با اشعه فرابنفش UV

نمونه های استخراج شده از محیط کشت مایع، جهت ارزیابی اولیه زیر نور UV (Kruss, Germany)، با طول موج 365 نانومتر قرار داده شدند. نمونه های محلول از نظر تابش فلوئورسنت زرد مایل به سبز آزمایش شدند. وجود افلاتوکسین در هر یک از نمونه ها با تابش نور زرد مایل به سبز مشخص شد (Fente *et al*., 2001; Rodrigues *et al*., 2009). نمونه شاهد فاقد تابش نور زرد مایل به سبز بود.

شرایط دستگاه HPLC و آنالیز نمونه ها

در این پژوهش از دستگاه HPLC شرکت واترز (Waters HPLC Empower system) با ستون تجزیه ای ODS2 C_{18} (250×4.6 mm, 10µm) استفاده گردید. آشکارسازی افلاتوکسین های جداسازی شده توسط آشکارساز فلوئورسنت در طول موج برانگیختگی 365 و طول موج نشر 425 نانومتر (Fente *et al*., 2001) انجام شد. فاز متحرک مورد استفاده مخلوط متانول، آب، استونیتریل (Khanafari *et al*., 2007) و اسیداستیک به ترتیب به مقدار 20، 59، 20 و 1 درصد حجمی بود که قبل از اجرای عملیات اقدام به گاز زدائی آن شد. کلیه حلال‌های مصرفی

دارای خلوص HPLC بودند. تزریق نمونه ها پس از ثابت گردیدن خط پایه و به حداقل رسیدن نویزهای دستگاهی با استفاده از میکروسرنگ همیلتون (Micro Syringe 50µl, Hamilton and Socorex) انجام شد. در کلیه اندازه گیری‌ها حجم نمونه تزریق شده 20 میکرولیتر بود. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی لیتر در دقیقه بود (عباس و همکاران، 2006). شناسایی کیفی افلاتوکسین ها در نمونه مجهول از طریق مقایسه زمان بازداری پیک‌ها در نمونه استاندارد (محلول افلاتوکسین های B_1، B_2، G_1و G_2 با غلظت 500 میلی گرم بر لیتر تهیه شده از موسسه استاندارد استان مازندران) و نمونه مجهول انجام شد. برای اندازه‌گیری کمی افلاتوکسین ها در نمونه‌های مجهول از مساحت سطح زیر پیک آن ها و مقایسه آن با سطح زیر پیک نمونه استاندارد استفاده شد. بدین منظور از سطح زیر پیک‌های افلاتوکسین ها در تزریق های تکراری نمونه و نیز سطح زیر پیک های افلاتوکسین در کروماتوگرام استاندارد میانگین گیری به عمل آمد. میانگین سطح زیر پیک افلاتوکسین در نمونه در غلظت استاندارد افلاتوکسین تزریق شده (500 میلی گرم بر لیتر) ضرب شد و عدد حاصله بر میانگین سطح زیر پیک افلاتوکسین استاندارد تقسیم شد. این عدد غلظت افلاتوکسین بر اساس واحد در سه میلی لیتر عصاره غلیظ محسوب شد (رابطه ریاضی (1)).

رابطه ریاضی (1)

$$Cx\left(۲ml\right) = \frac{Ax \times Cs}{As}$$

A_s= میانگین سطح زیر پیک‌های افلاتوکسین درمحلول استاندارد افلاتوکسین 500 میلی‌گرم بر لیتر

Cs= غلظت استاندارد افلاتوکسین (500 میلی‌گرم بر لیتر)

A_x= میانگین سطح زیر پیک‌های افلاتوکسین در نمونه استخراج شده

برای به دست آوردن غلظت افلاتوکسین در 25 میلی‌لیتر محیط مایع PDB از رابطه ریاضی (2) و برای تعیین میلی گرم افلاتوکسین ترشح شده در 25 میلی لیتر محیط مایع رابطه ریاضی (3) استفاده شد.

رابطه ریاضی (2):

$$Cx(۲۵ml) = Cx(۲ml) \times \frac{۲}{۲۵}$$

C_x (25 ml)= غلظت افلاتوکسین در 25 میلی‌لیتر از محیط کشت

رابطه ریاضی (3):

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

mg_{Af}= میلی‌گرم افلاتوکسین ترشح شده در 25 میلی‌لیتر از محیط کشت

بررسی کروماتوگرام ها

پس از تزریق و تهیه کروماتوگرام نمونه ها، کروماتوگرام حاصل از هر نمونه با کروماتوگرام نمونه استاندارد مقایسه شد. وجود یا عدم وجود افلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 و مقادیر آن ها در نمونه ها ارزیابی شد و گونه‌های مورد آزمایش از نظر تولید کمی و کیفی افلاتوکسین مقایسه شدند. با توجه به پیک های ظاهر شده در زمان بازداری، وجود و عدم وجود افلاتوکسین هایB_1 ، B_2، G_1 و G_2 و میزان آن ها در گونه های مورد آزمایش در نظر گرفته شد. منحنی تغییرات برای هر نوع افلاتوکسین در طی دوره 22 روزه وارد نرم افزار اکسل شد و با توجه به این منحنی، میزان تولید افلاتوکسین در بین گونه های شناسایی شده مورد مقایسه قرار گرفت. بر اساس داده‌های بدست آمده، تغییرات موجود در پیک ها و مقایسه گونه ها از نظر تولید کمی و کیفی افلاتوکسین ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

میانگین و خطای معیار از میانگین نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و به وسیله آزمون توکی محاسبه و با هم مقایسه شدند. کلیه نتایج بر مبنای 50 میلی لیتر محیط کشت مایع محاسبه، ارزیابی و گزارش شدند(محاسبات بر اساس 25 میلی لیتر عصاره انجام شد و جواب بدست آمده از معادله 3 در عدد 2 ضرب شد تا در 50 میلیتر محیط کشت بدست آید).

نتایج

شناسایی گونه های *Aspergillus* sp.

قارچ های آسپرژیلوس جدا شده از بذور گندم و ذرت و خاک مناطق مختلف با توجه به خصوصیات ماکرو و میکرومورفولوژیکی آنها با استفاده از کلید شناسائی کلیک (2002) از هم متمایز و شناسایی شدند. بر اساس مشخصات مورفولوژیکی جدایه ها که روی محیط کشت بدست آمد، تعداد 13 گونه قارچ Asprgillus شامل: *A. terreus*، *A. ustus* ، *A. candidus* ، *A. carneus* ، *A. ostianus* ، *A. auricomus* ، *A. niveus*، *A. niger* ، *A. fumigatus*، *A. parasiticus*، *A. caespitosus*، *A. awamori* و *A. sclerotiorum* تشخیص داده شدند(مشخصات کامل گونه ها در حال انتشار است). گونه های شناسایی شده برای تولید افلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفتند و اثبات اولیه تولید افلاتوکسین با نور UV مورد آزمایش قرار گرفت.

آزمایش اولیه با نور UV:

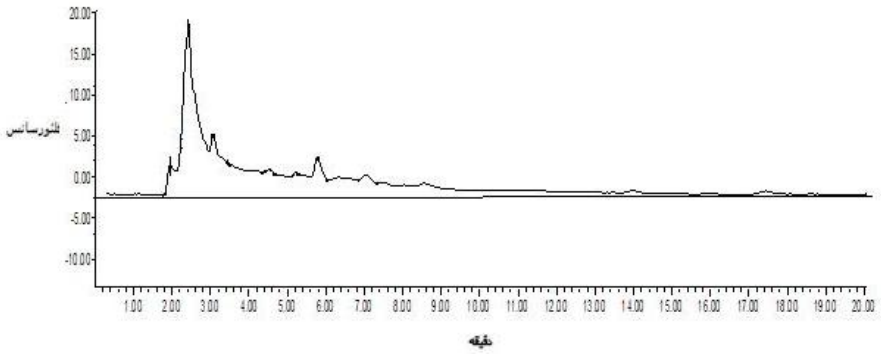
نتایج حاصل از ارزیابی مقدماتی وجود افلاتوکسین، با استفاده از لامپ UV با طول موج 365 نانومتر نشان داد که ترکیبات فلوئورسانس زرد مایل به سبز در کلیه گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مورد آزمایش وجود داشتند. در نمونه شاهد ترکیبات فلوئورسانس زرد رنگ مشاهده نشد. پس از این آزمایش جهت تشخیص تولید افلاتوکسین اقدام به بررسی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه HPLC گردید.

تجزیه و تحلیل کروماتوگرام های دستگاه HPLC

به منظور تعیین کیفی افلاتوکسین نمونه های مورد آزمایش، پیک افلاتوکسین مورد نظر (B_1، B_2، G_1 و G_2) در کروماتوگرام هر گونه از طریق مقایسه با زمان بازداری افلاتوکسین مربوطه در کروماتوگرام استاندارد، شناسائی شد. در مقایسه نمونه شاهد (محیط PDB بدون مایه زنی) با نمونه استاندارد، هیچ گونه پیکی که مربوط به وجود انواع افلاتوکسین مورد بررسی باشد، مشاهده نشد (شکل1). بیشترین میزان تولید افلاتوکسین در گونه *A. parasiticus*، پس از آن در گونه *A. terreus* و کمترین میزان تولید افلاتوکسین در گونه *A. ostianus* مشاهده شد (شکل2).

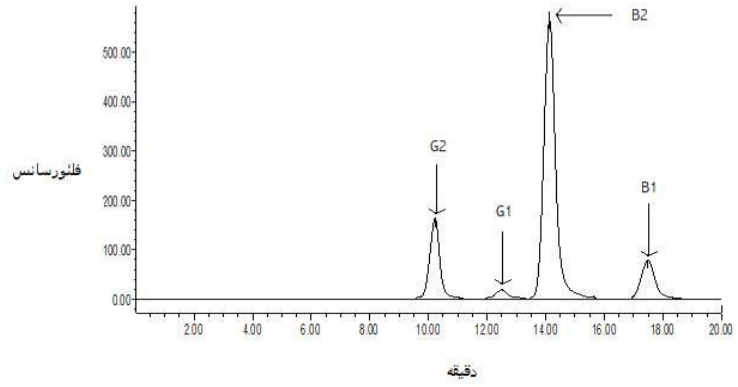
نتایج حاصل از بررسی میزان تولید افلاتوکسین در گونه های مختلف قارچ آسپرژیلوس در جدول 1 و شکل 3 نشان داده شده است. در گونه قارچی *A. parasiticus* بیشترین میزان تولید افلاتوکسین های B_1، B_2 و G_2 مشاهده شد. میزان کل افلاتوکسین تولیدی در این گونه 354/16 ± 40/85 میلی گرم در 50 میلی لیتر محیط مایع سیب زمینی دکستروز براث بوده که بالاترین مقدار در بین گونه های مورد بررسی است. در این گونه تولید افلاتوکسین G_1 مشاهده نشد. پس از آن گونه های قارچی *A. terreus*، *A. candidus*، *A. sclerotiorum*، *A. ustus*، *A. fumigatus*، *A. awamori*، *A. carneus*، *A. caespitosus*، *A. niveus*، *A. auricomus*، *A. niger* و *A. ostianus* به ترتیب با 0/68 ± 5/48، 0/36 ± 4/56، 0/23 ± 4/08، 0/23 ± 2/04، 0/22 ±2/00، 0/ 07 ±0/84، 0/08 ± 0/51، 0/05 ± 0/48، 0/05 ± 0/44، 0/03 ± 0/36، 0/05 ± 0/29 و 0/02 میلی‌گرم در 50 میلی لیتر محیط مایع سیب زمینی دکستروز براث به ترتیب بیشترین تا کمترین مقدار میانگین تولید مجموع چهار نوع افلاتوکسین را داشته اند.

الف



زمان (دقیقه)

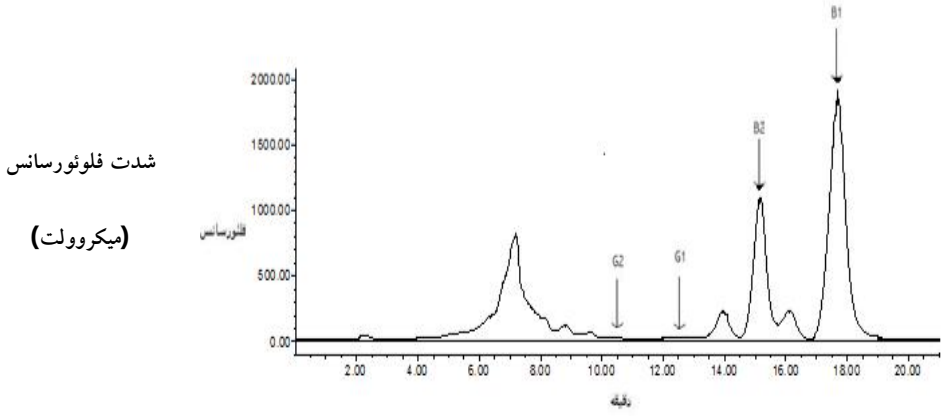
ب



زمان (دقیقه)

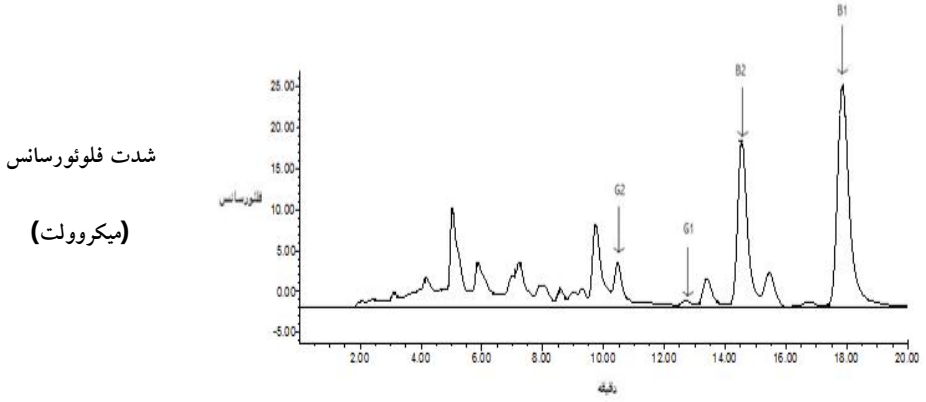
شکل 1- کروماتوگرام افلاتوکسین های مختلف در الف) نمونه استاندارد 500 میلی گرم بر لیتر؛ ب) محیط مایع سیب زمینی دکستروز براث (شاهد). شرایط دستگاه HPLC: ستون: (250×4.6 mm, 10µm) ODS2 C_{18}، فاز متحرک: متانول، استونیتریل، آب و اسید استیک با نسبت های حجمی 20: 20: 59: 1 درصد، دمای محیط 27 درجه سانتیگراد، سرعت جریان یک میلی لیتر بر دقیقه، آشکارسازفلئورسنت: طول موج برانگیختگی 365 و طول موج نشر 425 نانومتر ، حجم تزریق 20 میکرولیتر.

الف



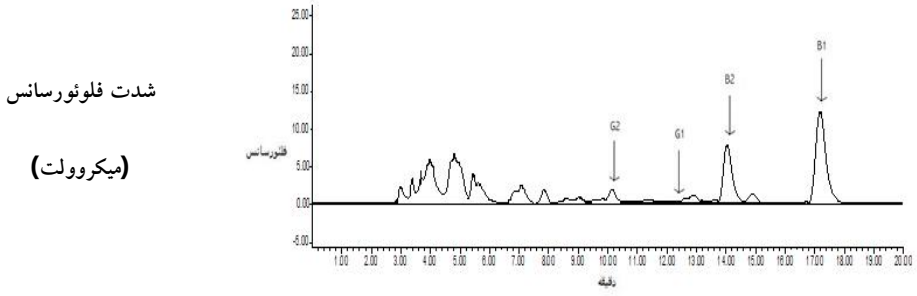
زمان (دقیقه)

ب



زمان (دقیقه)

ج



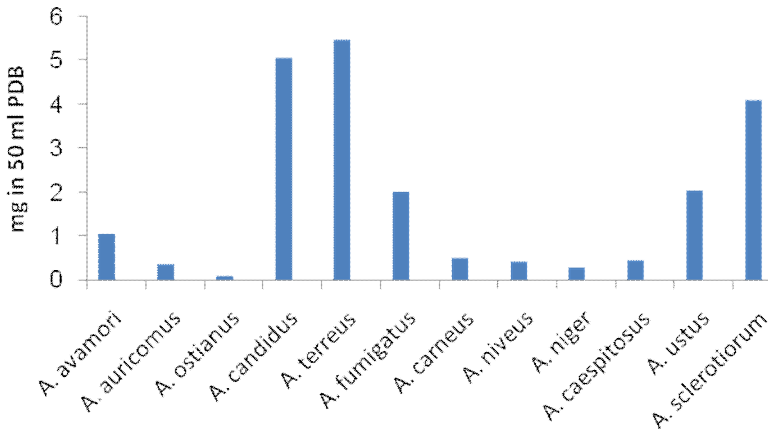
زمان (دقیقه)

شکل2- کروماتوگرام افلاتوکسین‌های مختلف در الف) گونه *A. parasiticus* ؛ ب) گونه *A. terreus* و ج) گونه *A. ostianus*. شرایط دستگاهHPLC : ستون: ODS2 C_{18} (250×4.6 mm, 10µm)، فاز متحرک: متانول، استونیتریل، آب و اسید استیک با نسبت های حجمی 20: 20: 59: 1 درصد، دمای محیط 27 درجه سانتیگراد، سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، آشکارسازفلئورسنت: طول موج برانگیختگی 365 و طول موج نشر 425 نانومتر ، حجم تزریق 20 میکرولیتر.

مطابق این آزمایش ها در گونه های *A. awamori*، *A. auricomus* ، *A. candidus* و *A. ustus* هر چهار نوع افلاتوکسینB_1 ، B_2، G_1 و G_2 تولید شده و میزان کل افلاتوکسین تولیدی در این گونه ها به ترتیب 0/84±0/07 ،0/36±0/03 ، 4/56±0/36 و 2/04±0/23 میلی گرم در 50 میلی لیتر محیط PDB بود. در گونه *A. ostianus* تنها افلاتوکسین B_2 به میزان 0/01 میلی گرم در 50 میلی لیتر محیطPDB تولید شد. گونه های *A. terreus* ، *A. fumigatus* ، *A. caespitosus* و *A. parasiticus* فاقد توانائی تولید افلاتوکسین G_1 در این شرایط بوده اند. گونه های*A. niveus* و*A. niger* فاقد توانائی تولید افلاتوکسین نوع G_1 و G_2 بودند. گونه *A. carneus* فاقد توانائی تولید افلاتوکسین نوع B_2 و G_1 بوده و گونه *A. sclerotiorum* فاقد توانائی تولید افلاتوکسین نوع B_2 و G_2 بود. تولید افلاتوکسین در گونه های مورد بررسی در سطح 1% معنی دار بود (جدول1 و شکل 3).

جدول 1: مقادیر چهار نوع افلاتوکسین تولید شده در 13 گونه قارچ آسپرژیلوس برحسب میلی گرم در 50 میلی لیتر محیط مایع سیب زمینی دکستروز براث

گونه قارچی	افلاتوکسین				افلاتوکسین کل
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	
A.awamori	0/39	0/13	0/06	0/25	1/08
A. auricomus	0/10	0/01	0/26	0/01	0/39
A. ostianus	0	0/10	0	0	0/10
A. candidus	3/03	0/64	0/40	0/50	5/07
A. terreus	4/49	0/56	0	0/42	5/47
A. fumigatus	1/68	0/15	0	0/19	2/02
A. carneus	0/37	0	0	0/14	0/51
A. niveus	0/32	0/12	0	0	0/44
A. niger	0/24	0/05	0	0	0/29
A. caespitosus	0/32	0/07	0	0/08	0/47
A. ustus	0/86	0/36	0/62	0/22	2/06
A. sclerotiorum	0/16	0	3/95	0	4/11
A. parasiticus	309/57	38/86	0	5/75	354/18



شکل3- دیاگرام میزان تولید افلاتوکسین کل در 50 میلی لیتر محیط مایع PDB در12 گونه قارچ *Aspergillus* sp. گونه *A. parasiticus* نشان داده نشده است.

بحث

افلاتوکسین‌ها ترکیباتی هستند که به عنوان متابولیت های ثانویه عمدتاً به وسیله قارچ‌هایی چون *A. parasiticus* و *A. flavus* به دنبال رشد روی مواد غذائی مختلف تولید می شوند. دما و رطوبت نسبی برای رشد قارچ و تولید زهرابه قارچی اهمیت زیادی دارند. این عوامل محیطی برای تولید زهرابه های قارچی در مقایسه با رشد قارچ اهمیت بیشتری دارند و حتی ممکن است در مورد زهرابه های مختلف در یک گونه قارچی و گاه در مورد زهرابه های مشابه در بین چندین گونه قارچی متفاوت باشد (Gqaleni *et al*., 1997). این محققان بیان نمودند که دمای مناسب برای تولید افلاتوکسین B_1 دمای 35- 24 درجه سانتیگراد است و با کاهش دما میزان تولید افلاتوکسین کاهش می یابد. آن ها هم چنین حداقل رطوبت نسبی مورد نیاز برای تولید افلاتوکسین B_1 در گونه قارچی *A. flavus* را 87 -81% اعلام نمودند. *آروس و همکاران* (Arrus *et al*., 2005) در بررسی های خود اعلام کردند که دما و رطوبت نسبی نقش مهمی در آلودگی افلاتوکسین ایفا می نمایند. آن ها دمای 30 -25 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 99 -97% را به عنوان دما و رطوبت بهینه برای تولید افلاتوکسین در خشکبار بیان نمودند. *طیبی و همکاران* (Tayebi *et al*., 2001) بیان نمودند دمای 38 -18 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی بیش از 80% محیط مناسبی برای بیوسنتز افلاتوکسین در ذرت موجود در مزارع را فراهم نموده است. از این رو مطابق با تحقیقات فوق در این پژوهش دمای 26 درجه سانتیگراد و رطوبت 80% برای محیط نگهداری قارچ های مایه زنی شده جهت ارزیابی تولید افلاتوکسین در گونه های قارچ آسپرژیلوس انتخاب گردید. شرایط تعیین شده اخیر از این نظر حائز اهمیت بود که تقریباً مشابه شرایط محیط طبیعی و شرایط تولید افلاتوکسین در طبیعت بوده است.

میاحی و همکاران (Mayahi *et al*., 2007) اعلام کردند که غالب مواد غذایی که به مصرف انسان یا حیوانات می رسند محیط کشت مناسبی برای رشد قارچ آسپرژیلوس و تولید افلاتوکسین است. در پژوهش *هانگ* (Haung, 2007) بیان شد هر چه محیط رشد قارچ به محیط طبیعی نزدیک تر باشد تولید توکسین بیشتر خواهد شد. به عبارت دیگر محیط هائی مانند محیط سیب زمینی دکستروز آگار به عنوان یک محیط طبیعی محسوب می شوند، زیرا اغلب مواد غذائی خود را از عصاره های گیاهی و یا جانوری کسب می‌نمایند. در این پژوهش محیط مایع سیب زمینی دکستروز براث به عنوان محیط مناسب و ساده برای ارزیابی تولید افلاتوکسین در گونه های قارچ آسپرژیلوس انتخاب گردید. این محیط در مقایسه با سایر محیط های موجود جهت بررسی افلاتوکسین به میزان زیادی به محیط های طبیعی چون گندم و ذرت نزدیک می باشد و می توان نتایج حاصل از آن را قابل استناد به نتایج حاصل از اندازه‌گیری افلاتوکسین بر روی بذور و مواد غذائی دانست.

در بررسی *اسچرم و همکاران* (Scherm *et al*., 2005) افلاتوکسین را به عنوان متابولیت ثانویه تولید شده در اعضاء گروه *Aspergillus* section *Flavi* به ویژه گونه های قارچی *A. flavus*، *A. parasiticus* و *A. nomius* معرفی نمودند. در بررسی *مهدی زاده و همکاران* (Mehdizadeh *et al*., 2008) قارچ *A. flavus* به عنوان تولید کننده افلاتوکسین های B_1 و B_2 معرفی شده است. آن ها اعلام نمودند گونه‌های دیگر قارچ آسپرژیلوس به نام های *A. parasiticus* و *A. nomius* نیز افلاتوکسین های گروه B و G را تولید می کنند. در این بررسی در گونه قارچی *A. parasiticus* بیشترین میزان تولید افلاتوکسین های B_1، B_2 و G_2 مشاهده شده است، میزان کل افلاتوکسین تولیدی در این گونه 7/08 گرم در لیتر محیط مایع سیب زمینی دکستروز براث و در بالاترین مقدار در بین 13 گونه مورد بررسی بوده است.

فنته و همکاران (Fente *et al*., 2001) خاصیت فلئورسانسی 14 ایزوله گونه های آسپرژیلوس را در محیط کشت (Aflatoxin Producing Ability= APA) بررسی کردند، از بین ایزوله ها ، هفت ایزوله از گونه *A. parasiticus* و پنج ایزوله از گروه *A. flavus* ، خاصیت فلئورسانسی نشان دادند. این آزمایش روی محیط عصاره مخمر سوکروز آگار(YES) نیز با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا(HPLC) انجام شد و نتایج بدست آمده مشابه نتایج این پژوهش بوده است. آن ها بیان نمودند تمام جدایه های گونه های قارچ آسپرژیلوس توانائی تولید افلاتوکسین را ندارند.

در سال 1988، آژانس بین المللی تحقیقات سرطان(IARC) افلاتوکسین B_1 را در لیست مواد سرطانزای انسان قرار داد، بر اساس گزارشات سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO) هر ساله میلیون ها تن ماده غذایی در اثر آلودگی به مایکوتوکسین ها از بین می روند. لذا سال 1988 برنامه ریزی های زیادی همراه با کارگاه های آموزشی برای کنترل بهداشتی مواد غذائی در دنیا صورت گرفت. *ردی و همکاران* (Reddy *et al*., 2009) در

بررسی خود میزان آلودگی افلاتوکسین B_1 را در 1200 نمونه برنج با استفاده از روش ELISA تعیین کردند. آن ها اعلام نمودند بیشترین میزان آلودگی مربوط به گونه های *A. flavus*، *A. niger*، *A. ochraceus* و *A. parasiicus* بوده است. همچنین 67/8% از نمونه ها به افلاتوکسین B_1 به میزان µg/kg 308 -0/1 آلوده گزارش شدند. *ویلا و مارکزی* (Villa and Markaki, 2009)، میزان آلودگی افلاتوکسین B_1 را در 55 نمونه گندم با استفاده از روش HPLC و ستون ایمیونوافینیتی بررسی کردند. آن ها اعلام نمودند 56/3% از نمونه ها به افلاتوکسین B_1 به میزان ng/g 1/42 آلوده بودند. *چان و همکاران* (Chun *et al*., 2007) با بررسی 85 نمونه خشکبار با استفاده از روش ELISAو HPLC اعلام نمودند در روش ELISA 31% از نمونه ها به میزان 0/06% آلوده به افلاتوکسین بودند. در روش HPLC میزان آلودگی µg/kg 25 /1- 0/08 گزارش شد. در این پژوهش میزان تولید افلاتوکسین B_1 در 12 گونه قارچ آسپرژیلوس مورد بررسی غیر از گونه *A. flavus* در محدوده میزان آلودگی در محصولات کشاورزی تعیین شد، که این نتیجه با تحقیقات پیشین یاد شده مطابقت دارد. بیشترین میزان آلودگی به افلاتوکسین B_1 مربوط به گونه های قارچی *A. parasiticus*، *A. terreus*، *A. candidus* و *A. fumigatus* بود. این میزان توانائی تولید افلاتوکسین در گونه های قارچ آسپرژیلوس مورد بررسی با توجه به این که حد مجاز افلاتوکسین B_1 در ماده غذائیppb 20 اعلام شده است، قابل توجه است. این موضوع به این دلیل نیز دارای اهمیت است که معمولاً در محصولات کشاورزی و غذائی در صورت فعالیت چند گونه قارچ آسپرژیلوس با توانائی تولید افلاتوکسین و مساعد بودن شرایط محیطی، میزان افلاتوکسین تولید شده بسیار بحرانی خواهد بود. بهترین روش برای کنترل آلودگی به افلاتوکسین ها پیشگیری از طریق مدیریت قبل و بعد از برداشت محصول است.

References

1. 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.
2. Agarwal VK and Sinclair JB. 1997. Seed treatment. pp. 423–460, *In*: VK Agarwal and JB Sinclair (eds). Principles of Seed Pathology. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press.
3. Almasian S, Hoseini Gh, Sohani-Darban A and Malekzadegan F. 2008. Study of aflatoxin amount in corn meal. Paper Presented at: 18th National Congress of Food Industry; 15–17 October; Mashad, Iran.
4. Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R and Holley RA. 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. Journal of Stored Products Research 41: 513–527.
5. Barnett HL and Barry BH. 1979. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. New York: APS Press. 218 p.
6. Chun HS, Kim HJ, Ok HE, Hwang JB and Chung DH. 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. Food Chemistry 102: 385–391.
7. D'Mello JPF and MacDonald AMC. 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology 69: 155–66.
8. 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: 68–76.
9. 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.
10. Gqaleni N, Smith EJ, Laceny J and Gettinby G. 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. Applied and Environmental Microbiology 63: 1048–1053.
11. Haung Ch. 2007. Mechanism of intraspecific toxin inhibition in *Aspergillus flavus*. [MSc]. [Baton Rouge (Louisiana)]: Louisiana State University.
12. 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: 163–168.
13. Klick MA. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. An Institute of the Royal Netherlands of Arts and Sciences, Dordrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) Publishing. 116 p.
14. Mayahi M, Jalali MR and Salamat N. 2007. Isalation of *Asperigillus* from fish powder, corn and soybean meal and measurement of their aflatoxin contents. Science (Shahid Chamran University) 17: 95–105.
15. Mehdizadeh M, Rabiei M, Moini Namin, M and Asghari Sh. 2008. Role of *Asperigillus* species in creating aflatoxicose. Journal of Shaeed Sdoughi University of Medical Sciences Yazd 16: 100–107
16. Rahimi E, Kargar AR and Zamani F. 2008. Assessment of aflatoxin B1 levels in animal feed of dairy farms in Chaharmahal & Bakhtiari. Pajouhsh & Sazandegi 79: 66–71

17. Reddy KRN, Reddy CS and Muralidharan K. 2009. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. Food Microbiolog. 26: 27–31.
18. Reddy KRN, Saritha P, Reddy CS and Muralidluran K. 2009. Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. African Journal of Biotechnology 8: 3303–3308.
19. Reddy SV and Waliyar F. 2008. Properties of afltoxin and it producing fungi. [cited 2013 Jun 10]. Available from: www.aflatoxin. Info/aflatoxin.asp.
20. Ricordy R, Cacci E, Augusti Tocco G. 2005. Aflatoxin B1 and cell cycle perturbation. pp. 213–231, *In* VR Preedy and R Watson (eds). Reviews in Food and Nutrition Toxicity, 4th ed. London: CRC Press.
21. 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.
22. Scherm B, Palomba M, Serra D, Marcello A and Migheli Q. 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and af lP 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.
23. Tayebi J and Mirabolfathi M. 2001. Infection of some hybrid corns to B_1 and B_2 aflatoxin and the casual fungus in the field. Journal of Applied Entomology and Phytopathology 69: 79–84
24. Villa P and Markaki P. 2009. Aflatoxin B_1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment. Food Control 20: 455–461.

Investigation of the production of B_1, B_2, G_1 & G_2 aflatoxins in some species of *Aspergillus* with high performance liquid chromatography (HPLC) methods

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

Abstract

Aflatoxins are very toxic secondary metabolites of some, *Aspergillus*s sp. that are produced when these fungi grow on different agricultural products under special environmental circumstances. In this study aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in some species of *Aspergillus* were investigated. These fungi included *A. terreus, A. ustus, A. candidus, A. carneus, A. ostianus, A. auricomus, A. niveus, A. niger, A. fumigates, A. parasiticus, A. caespitosus, A. awamori* and *A. sclerotiorum* that were grown in potato dextrose broth (PDB) and aflatoxins thereof were measured using high performance liquid chromatography (HPLC) methods. Pure cultures of the aspergilli were prepared and identified to species, and then each species was cultured for 22 days in 50 ml flask containing PDB at 26 ^{0}C, 80% humidity and in darkness, conditions similar to natural habitat. Fungal exudates in the broth cultures were extracted with 10 ml chloroform, the organic solvent was evaporated and the precipitate was dissolved in 3ml methanol. After filtration through 0.2 µm milipore filter, the final solute was injected into HPLC instrument. Maximum amount of aflatoxins was secreted by *A. parasiticus* while aflatoxin G_1 was not produced in *A. terreus, A. carneus, A. fumigatus, A. niveus, A. parasiticus, A. caespitosus, A. ostianus* and *A. niger*. As well, *A. niveus, A. ostianus, A. niger* and *A. sclerotiorum* did not produce aflatoxin G_2. No aflatoxin B_2 was detected in *A. sclerotiorum* and *A. carneus* and no aflatoxin B_1 was detected in *A. ostianus.* Among the four type of aflatoxins (B_1, B_2, G_1 and G_2), B_1 and G_1 had respectively the maximum and minimum amount of secreted aflatoxins in *A. parasiticus.*

Key words: Aspergillus, aflatoxin, HPLC

[1] - MSc student, Plant Protection Department, University of Agricultureal & Natural resources of Sari, Sari, Iran.
[2] - Assistant Professor, Plant Protection Department, University of Agricultureal & Natural resources of Sari, Sari, Iran.
[3] – PhD student, Chemistry Department, Mazandaran University, Sari, Iran.
*Corresponding author: safaralim@gmail.com