جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس خوراک دام

سمیرا رنجبر [۱]، راضیه نظری [۱*]، میترا نوری [۲]

۱ـ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم ـ ایران.

۲ـ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک ـ ایران.

*نویسنده مسئول: Nazarill02002@yahoo.com

دریافت مقاله: ۲۱ بهمن ۸۹ ، پذیرش نهایی: ۴ خرداد ۹۰

چکیده

برخی گونه‌های جنس آسپرژیلوس مولدین بالقوه آفلاتوکسین می‌باشند که مایکوتوکسینی با اثرات کارسینوژنیک و تراتوژنیک است. آلودگی خوراک دام با گونه‌های آسپرژیلوس سبب تولید آفلاتوکسین، انتقال آن به شیر و فراورده‌های لبنی و اختلال در سلامت دام، شیر و افراد مصرف کننده آن می‌گردد. در این تحقیق ترکیبات خوراک سالانه مورد استفاده در ده دامداری شهر اراک در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ بررسی گردید. نتایج نشان داد بیشترین مواد تشکیل دهنده خوراک دام شامل ذرت، کنجاله پنبه دانه و کلزا، مکمل‌های غذایی، جو، سبوس گندم، نان خشک، پودر چربی و یونجه بوده است. پس از جداسازی و کشت در محیط اختصاصی ، آسپرژیلوس‌های جداشده از خوراک دام با روش میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت شناسایی مولکولی آسپرژیلوس های جداشده از روش PCR استفاده شد. جهت شناسایی گونه‌ها قطعه ژنی S-ITS5.8-1ITS درون کمپلکس ژنی DNA ریبوزومی تعیین توالی و در Gen Bank مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در دامداری‌های شهر اراک خوراک دام با دوگونه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس کلاواتوس آلوده بوده است. مجله میکروبیولوژی دامپزشکی ،۱۳۹۰، دوره ۷، شماره ۱، ۱۷-۱۱.

واژه‌های کلیدی: خوراک دام، آسپرژیلوس فلاووس، PCR.

مقدمه

قارچ‌ها از عوامل بیولوژیک مهم آلوده کننده خوراک دام بوده و با ترشح آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف می‌توانند نه تنها باعث فساد و از بین بردن غلات از جمله گندم شوند بلکه می‌توانند با تولید سموم مختلف از جمله آفلاتوکسین از عوامل تهدیدکننده جدی سلامت انسان از جمله در کشور ما باشند (۱۳و۱۰). آفلاتوکسین از جمله سموم قارچی است که به وسیله گونه‌هایی نظیر آسپرژیلوس فلاووس تولید شده و در صورت آلودگی غذایی انسان یا حیوان با آن می‌تواند باعث تخریب حاد کبد، سیروز کبد، محرک و القا کننده سرطانی شدن سلول‌های

Isolation and molecular identification of *Aspergillus* species of cattle feed

Ranjbar, S.[1], Nazari, R.[1*], Noori, M.[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom- Iran.*

[2]*Department of Biology, Faculty of Science, University of Arak, Arak- Iran.*

Abstract

Some species belonging to the genus *Aspergillus* are potential producers of aflatoxin, a mycotoxin with teratogenic and carcinogenic effects. Cattle feed pollution with the species of *Aspergillus* cause production of aflatoxin and its transfusion to milk and milk products. Utilizing polluted feed disorder health domestic, milk and consumers. In this study used feed composition were examined in ten animal's farm in arak in the years 2009 and 2010. Results showed the most feed composition materials were corn, cotton and canola meal, feed supplements, barley, wheat bran, dried bread, fat powder and alfalfa. Isolation, cultivation and identification of feed *Aspergillus* on macroscopic colony characteristics and microscopic morphology were done. A PCR assay was used to indentify species of *Aspergillus* from one another. DNA sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region of ribosomal DNA gene complex was also conducted for the identification of species by comparative Gen Bank sequence analysis. The results indicated the presence of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* in cattle feed of the animal's farm. ***J. Vet. Microbiol. 7,1:11-17, 2011.***

Keywords: *Aspergillus flavus*, PCR, Cattle feed.

کبدی و عوارض تراتوژنیک در انسان و حیوان شود. همچنین این سم می تواند از راه مصرف غذا و خوراک دام‌ها از راه شیر و فرآورده‌های آن به انسان منتقل شود (۹). با توجه به اینکه شیر ماده غذایی اصلی برای رشد کودکان می‌باشد، وجود آفلاتوکسین در شیرهای تجاری موجود، شیر مادر و فرآورده‌های شیری یکی از جدی ترین مشکلات بهداشت جهانی است (۳). در بین گونه‌های مولد آفلاتوکسین، قارچ آسپرژیلوس فلاووس از مهم ترین و شایع ترین قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در خوراک دام بوده است(۵). اسپورهای این قارچ از راه هوا منتشر و سبب آلودگی غلات، حبوبات، علوفه و خوراک دام به آفلاتوکسین می‌گردد (۸). استفاده از خوراک دام ناسالم و آلوده سبب اختلال در چرخه سلامت دام، شیر و افراد مصرف کننده شیر و فرآورده‌های لبنی می‌گردد. پژوهش‌های مختلف بر روی خوراک دام نشان داده است که آلودگی خوراک دام به کپک‌ها بویژه گونه‌های آسپرژیلوس سبب تولید آفلاتوکسین و انتقال آن به شیر و فرآورده‌های آن می‌شود. در علوفه، غلاتی مانند ذرت، جو، گندم، سویا، کپک‌ها به آسانی در حین داشت، برداشت، فرآوری، حمل و انبارداری رشد نموده و در آن‌ها آفلاتوکسین تولید می‌کنند. تا کنون گزارش‌های بسیاری در خصوص آلودگی کپکی خوراک دام، وجود آفلاتوکسین در آن‌ها و تلفات دام و طیور در اثر مصرف این خوراک‌ها گزارش شده است. Goldbatt در سال ۱۹۶۹ مرگ بیش از صد هزار بوقلمون را در انگلستان بر اثر آلودگی بادام زمینی برزیلی به کپک آسپرژیلوس و تولید آفلاتوکسین در آن‌ها گزارش نمود (۴).

شناسایی سنتی گونه‌های آسپرژیلوس معمولاً بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن‌ها بوده که گاهی اوقات شناسایی و تمایز بین گونه‌ها بر اساس این ویژگی‌ها نیز با مشکل مواجه می‌گردد. همچنین شناسایی سنتی گونه‌ها به چندین روز زمان جهت کشت نیاز دارد. لذا امروزه روش‌های سریع بر اساس اسید نوکلئیک جهت شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس توسعه یافته و جایگزین روش‌های شناسایی سنتی شده است. موفق ترین روش مورد استفاده در این مسیر روش PCR می‌باشد که به عنوان روش سریع، حساس و اختصاصی جهت شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس شناخته شده است. نواحی هدف DNA که معمولاً به طور گسترده جهت تشخیص و تمایز گونه‌های آسپرژیلوس در روش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، قطعاتی در کمپلکس ژنی DNA ریبوزومی بوده که عمدتا ناحیه S-ITS5.8-1ITS می‌باشد. تکثیر این ناحیه از طریق PCR و تعیین توالی و بررسی آن در Gene bank عمدتا جهت شناسایی مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱و۷).

هدف از انجام این تحقیق بررسی خوراک دام در دامداری‌های شهر اراک از لحاظ آلودگی با گونه‌های آسپرژیلوس و شناسایی و بررسی مولکولی آسپرژیلوس‌های جدا شده جهت تعیین دقیق گونه‌های آن می‌باشد.

مواد و روش کار

۱. تهیه ونمونه‌برداری از خوراک دام:

تعدد ۱۰ دامداری صنعتی و سنتی به طور تصادفی در شهر اراک انتخاب شد(جدول ۱).

از پاییز سال ۱۳۸۸ تا تابستان ۱۳۸۹ از مجموع ۱۰ دامداری، تعداد ۵۳۲ نمونه خوراک دام که شامل مواد مختلف از جمله نان خشک، کاه، یونجه، ذرت سیلو شده، آرد سبوس و خوراک مخلوط بود نمونه‌برداری انجام گرفت(جدول ۳و۲).

برای تهیه نمونه‌های خوراک دام به دامداری‌های واقع در شمال و جنوب و شرق اراک در چهار فصل سال مراجعه شد. از هر یک از ترکیبات خوراک دام‌های مورد استفاده، نمونه‌های ۲۰۰ گرمی از مکان‌های مختلف انبار خوراک دام تهیه و در کیسه‌های کاغذی، برچسب‌دار، استریل قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲. جداسازی آسپرژیلوس‌های خوراک‌های دام:

جهت جداسازی گونه‌های آسپرژیلوس از خوراک دام، ابتدا خوراک دام‌ها را به طور جداگانه در داخل پلیت خالی ریخته و سپس به آن‌ها اندکی آب مقطر در حدی که خوراک مرطوب شود افزوده و با چرخاندن پلیت آب بطور یکنواخت در تمام سطح خوراک پخش گردید. سپس پلیت‌ها درمکان تاریک در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار گرفت.

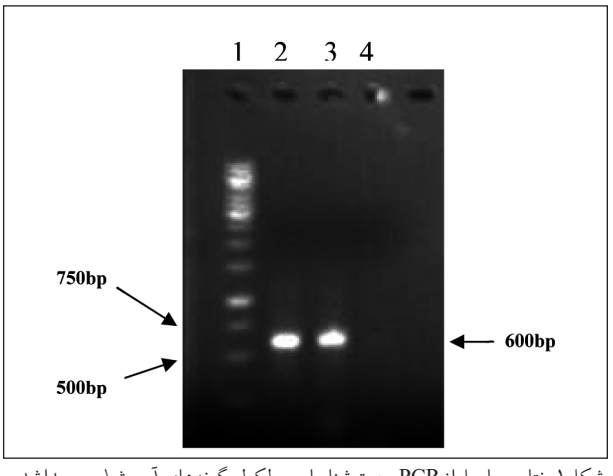
کلنی‌های رشد یافته در هر پلیت ابتدا مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. برای این منظور با یک سیم خم شده با زاویه ۹۰ درجه بخش کوچکی از کلنی جدا و روی لام قرار داده شد. یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو به آن افزوده و به آرامی یک لامل بر روی لام قرار داده شد. سپس لام‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی گردید و براساس ساختار میسلیوم، اسپرانژیوفور، اسپرانژیوسپور، کونیدی، کونیدیوفور شناسایی اولیه گونه‌های

جدول ۱ ـ کد و نام ایستگاه‌های دامداری مورد مطالعه.

code	Name
S1	Bahare
S2	Abasi
S3	Asra
S4	Azad
S5	Sosanabad
S6	Mansori
S7	Alba
S8	Eydi
S9	Gavar
S10	Mir yahya

جدول ۳ - تعداد خوراک دام‌های مورد مطالعه در دامداری‌ها. Composition: N.F.C .Number of Feed

N	N.F.C.
S1	۲۱
S2	۱۷
S3	۱۳
S4	۲۰
S5	۷
S6	۱۸
S7	۱۳
S8	۶
S9	۷
S10	۱۱



شکل ۱ ـ نتایج حاصل از PCR جهت شناسایی مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس جداشده. ستون ۱- مارکر (Fermentas) 1kb ستون ۲،۳- محصول PCR دو گونه آسپرژیلوس، ستون ۴: ـ کنترل منفی.

آسپرژیلوس انجام گرفت. پس از تشخیص آسپرژیلوس‌ها کشت اختصاصی هر گونه روی محیط سابرودکستروزآگار انجام گردید و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

جدول ۲ - انواع خوراک دام‌های مورد مطالعه.

معادل فارسی	معادل انگلیسی	علامت اختصاری
یونجه	Medicago sativa (alfalfa)	Me
ذرت	Zea myse (corn)	Ze
کاه	Wheat straw	Wh
اوره	Urea	Ur
جو	Barley	Ho
سویا	Soya	So
کنجاله کلزا	Canola meal	Cc
کنجاله پنبه دانه	Cotton seed meal	Csc
سبوس گندم	Wheat bran	Wb
چغندرقند	Beet pulp	Bp
نان خشک	Dried bread	Db
کنستانتره	Concentrate	Co
توکسی بان	Toxiban	To
اسیدباف	Acid Buf	AB
گلیکولین	Glycolin	Gl
کولین	Culin	Cu
بیوتکس	Biotex	Bi
مونوسین	Monocin	Mo
تپاکس	Tepax	Te
اکسیدمنیزیم	MgO	MgO
جوش شیرین	Baking soda	Bs
پودرچربی	Fat powder	Fap
پودرماهی	Fish powder	Fip
مکمل مواد معدنی	Mineral supplement	Mfc
مکمل ویتامین	Vitamin supplement	Vfc
کربنات کلسیم	CaCO3	CaCO3
انزیمیت	Enzymit	En
نمک	Nacl	Nacl
رومیفات	Romifut	Ro
پلی میکس	Polymix	Po
فسفات کلسیم	Ca2po4	Ca2po4
مکمل غذایی	Food supplement	Fc

گرما گذاری شد. سپس کلنی‌های حاصل بررسی و جهت اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها از روش کشت برروی لام (Slide culture technique) استفاده شد.

۳. استخراج DNA ژنومیک از گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از خوراک دام:

```
Query  1    CCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCC 60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  23   CCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCC 82

Query  61   GGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAG 120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  83   GGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAG 142

Query  121  TGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT 180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  143  TGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT 202

Query  181  CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTG 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  203  CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTG 262

Query  241  AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  263  AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC 322

Query  301  GAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCC    360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  323  GAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGG 382

Query  361      ACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT 420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  383  GGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT 442

Query  421  GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGT 480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  443  GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGT 502

Query  481  TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA 538
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  503  TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA 560
```

شکل۲ـ نتیجه حاصل از Blast توالی محصول PCR مربوط به یکی از آسپرژیلوس های جداشده.

***Aspergillus flavus* strain NRRL 32354 internal transcribed spacer. 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal. transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal. RNA gene, partial sequence. Length=945**

Score = 994 bits (538), Expect = 0.0. Identities = 538/538 (100%), Gaps = 0/538 (0%). Strand=Plus/Plus

جدول۴ ـ مراحل واکنش PCR جهت شناسایی مولکولی آسپرژیلوس های جداشده از خوراک دام.

شماره	مرحله	دما	زمان	تعداد
1	دناتوراسیون اولیه	95	5 min	1
2	دناتوراسیون	94	1 min	35
3	پرایمر anneling	58	1 min	35
4	تکثیرابتدایی	72	1 min	35
5	تکثیرنهایی	72	5 min	1
6	Hold	15		1

برای استخراج DNA ژنومیک ابتدا آسپرژیلوس های جدا شده از خوراک دام در محیط سابرودکستروزبراث کشت داده شد. برای این منظور تعداد ۱۰۷اسپور به ۵۰ میلی لیتر محیط سابرودکستروزبراث درون ارلن های ۲۵۰ میلی لیتر تلقیح گردید. ارلن ها روی شیکرانکوباتوردار دردمای ۲۸ درجه باد ور ۲۰۰rpm به مدت ۴۸ ساعت گرما گذاری گردید. جهت استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده شد. در نهایت تیوپ حاوی DNA در دمای ۱۵ ـ تا ۲۰ ـ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۴. واکنش PCR:

جهت شناسایی مولکولی آسپرژیلوس های خوراک دام قطعه S-ITS5.8-1ITSبرای طراحی پرایمر انتخاب و پرایمر Forward با توالی -5- G- GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-TCC و پرایمر Reverse با توالی ۳-5-C-TAT-TGA-TAT-TCC-TCC-GCT توسط شرکت سیناژن ساخته شد. در مرحله بعد واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse، DNA ژنومیک گونه های آسپرژیلوس جداشده به عنوان الگو و طی سیکل های حرارتی مطابق جدول ۴ انجام گردید. در نهایت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و با استفاده از UV

```
Query  1    CGTGTTTATCGTACCTTGTTGCTT                                    60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  214  CGTGTTTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTCTTCGGACGGCCGCCGGGGAG 273

Query  61                                 AAGACCACAACATGAACTCTGTTCTGAAGT 120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  274  GCCTCCGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCACAACATGAACTCTGTTCTGAAGT 333

Query  121  TTTGCAGTCTGAGTTGATTATCATAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT 180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  334  TTTGCAGTCTGAGTTGATTATCATAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT 393

Query  181  CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  394  CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG 453

Query  241  AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  454  AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC 513

Query  301  GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGGTTTCCCG 360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  514  GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGGTTTCCCG 573

Query  361  GGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG 420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  574  GGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG 633

Query  421  TCACCCGCTCTTGTAGGGCCGGCCGGCGCCTGTCGACACCAACCCAATTTTTCTAAGGTT 480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  634  TCACCCGCTCTTGTAGGGCCGGCCGGCGCCTGTCGACACCAACCCAATTTTTCTAAGGTT 693

Query  481  GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA  537
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  694  GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA  750
```

شکل۳ ـ نتیجه حاصل از Blast توالی محصول PCR مربوط به یکی از آسپرژیلوس های جداشده.

***Aspergillus clavatus* strain ATCC 1007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal. RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length=877**
Score = 992 bits (537), Expect = 0.0. Identities = 537/537 (100%), Gaps = 0/537 (0%). Strand=Plus/Plus.

مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

بررسی آلودگی خوراک دام با گونه‌های آسپرژیلوس:

تمامی ۵۳۲ نمونه خوراک دام جمع آوری شده از دامداری‌های مختلف در فصول متعدد از لحاظ آلودگی با گونه‌های آسپرژیلوس مورد بررسی و کشت قرار گرفت. نتایج نشان داد که از میان مواد تشکیل دهنده خوراک دام، ذرت و سبوس گندم بیشترین آلودگی با گونه‌های آسپرژیلوس را دارند.

درضمن بررسی خوراک دام در ۱۰ ایستگاه مورد نظر نشان داد که دو گونه از آسپرژیلوس به طور مشترک در همه فصول در دامداری‌های مورد مطالعه مشاهده گردید.

در مرحله بعد دو گونه آسپرژیلوس جدا شده با روش میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. براساس ویژگی های کلنی و نیز ساختار میسلیوم، اسپرانژیوفور، اسپرانژیوسپور، کونیدی، کونیدیوفور دو گونه به عنوان آسپرژیلوس معرفی گردید.

شناسایی وبررسی مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس جداشده با روش PCR:

پس از شناسایی اولیه گونه‌های آسپرژیلوس های جداشده، از روش PCR جهت شناسایی مولکولی استفاده شد. نتایج واکنش PCR ایجاد باند ۶۰۰ جفت بازی را نشان داد و مشخص نمود که هر دو نمونه مورد بررسی متعلق به جنس آسپرژیلوس می‌باشند(شکل۱). در مرحله بعد محصول PCR مربوط به هر نمونه به طور جداگانه در یخ جهت تعیین توالی به شرکت Seqlab آلمان ارسال گردید. توالی نوکلئوتیدی خوانده شده مربوط به هر محصول PCR به طور جداگانه در سایت (NCBI National Center for Biotechnology and Information) تحت آنالیز Blast قرار گرفت. نتایج حاصل از Blast

نشان داد که یکی از گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از خوراک دام ۱۰۰درصد با آسپرژیلوس فلاووس(شکل۲) و دیگری ۱۰۰درصد با آسپرژیلوس کلاواتوس(شکل۳) تشابه دارد و در نتیجه این دو گونه به عنوان آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس کلاواتوس معرفی و مورد تائید مولکولی قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی بر روی خوراک دام‌های نمونه‌برداری شده از نقاط مختلف انبار خوراک دام ده دامداری سنتی و صنعتی در شهر اراک نشان داد که ترکیب خوراک دام مورد استفاده در دامداری‌های مورد مطالعه متشکل از یونجه، ذرت، جو، کنجاله (کلزا، پنبه‌دانه)، سبوس گندم، نان خشک، پودر ماهی و چربی، مکمل‌های غذایی، خوراک دام مخلوط، آنتی بیوتیک، چغندرخشک، کاه، آرد (جو، گندم) می‌باشد(جدول۲). مطالعات میکروسکوپی ترکیبات خوراک دام نشان داد که دو گونه از آسپرژیلوس بر روی این مواد رشد نموده و آن‌ها را آلوده می‌سازند زیرا این مواد به علت دارا بودن فاکتورهای لازم جهت رشد قارچ‌ها مانند pH، کربوهیدرات‌ها، چربی، املاح و نمک برای رشد این کپک‌ها مناسبند. آب وهوای گرم ومرطوب، انبارداری نامناسب، عدم اطلاع کافی دامداران در نگه داری صحیح خوراک دام شرایط مناسبی را برای رشد کپک ها فراهم می‌کند. دو گونه از آسپرژیلوس به طور مشترک در همه دامداری های مورد مطالعه در این تحقیق بر روی خوراک‌های دام در تمام فصول مشاهده شد. سالس و یوشیزاوا در سال ۲۰۰۵ با مطالعه بر روی ۷۸ نمونه خوراک دام از کشورهای تایلند و ویتنام، آلودگی ۹۴ درصد از نمونه‌ها را به گونه‌های آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس گزارش نمودند(۱۲). همچنین Bergofer و همکاران در سال ۲۰۰۳ در استرالیا گندم و آرد گندم مورد استفاده در خوراک دام دامداری‌ها را مورد مطالعه قرار دادند و کپک‌های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و کلادوسپوریوم را جداسازی و شناسایی نمودند (۲). Halt نیز دانه‌های گندم، جو و ذرت مورد استفاده در دامداری‌های کشور کرواسی را مورد بررسی قرار داده و گونه آسپرژیلوس فلاووس را به عنوان عامل اصلی آلوده کننده معرفی نمودند (۵) که نتایج تحقیق کنونی با نتایج فوق مطابقت دارد.

در مرحله بعد در این تحقیق از واکنش PCR جهت شناسایی مولکولی آسپرژیلوس‌های جدا شده از خوراک دام استفاده شد. قطعه ژنی S-ITS5.8-1ITS درون کمپلکس ژنی DNA ریبوزومی برای این منظور انتخاب و پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR بر اساس این قطعه ژنی طراحی گردید (۶). در صورتی که قارچ جداشده به دسته آسپرژیلوس‌ها تعلق داشته باشد در اثر واکنش PCR با استفاده از این پرایمرها باند ۶۰۰bp ایجاد می‌گردد. نتایج واکنش PCR هر دو گونه آسپرژیلوس جدا شده از خوراک دام باند ۶۰۰bp را نشان داد که تائیدی بر شناسایی صحیح اولیه آسپرژیلوس با استفاده از تست‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی می‌باشد (شکل۱). این نتایج با نتایج Magnani در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد (۱۱). از آنجائیکه در مطالعات مختلف از قطعه ژنی فوق جهت شناسایی گونه‌های مختلف آسپرژیلوس استفاده شده است، در این تحقیق نیز به منظور تعیین گونه آسپرژیلوس‌های جداشده ،محصولات PCR تعیین توالی گردید (۱۱و۷). نتایج تعیین توالی محصولات PCR پس از بررسی با استفاده از سایت NCBI و آنالیز Blast نشان داد که یکی از گونه‌های آسپرژیلوس جداشده ۱۰۰درصد با آسپرژیلوس فلاووس شباهت دارد (شکل۲) و بنابراین به عنوان آسپرژیلوس فلاووس معرفی گردید. نتایج Blast توالی محصول PCR مربوط به گونه دیگر آسپرژیلوس جدا شده ۱۰۰درصد تشابه با آسپرژیلوس کلاواتوس را نشان داد(شکل۳) و بنابراین نمونه جدا شده به عنوان آسپرژیلوس کلاواتوس معرفی گردید.

با توجه به اینکه آسپرژیلوس‌های جدا شده از خوراک دام خصوصا آسپرژیلوس فلاووس یکی از مولدین اصلی آفلاتوکسین‌های کارسینوژنیک می‌باشد، بنابراین توصیه می‌شود تا شرایط استاندارد جهت انبار خوراک دام در دامداری‌ها رعایت گردد و به دامداران نیز آموزش‌های صحیح جهت نگهداری و انبار مناسب خوراک دام داده شود تا از آلودگی قارچی خوراک دام جلوگیری و سلامت دام و افراد مصرف کننده از محصولات دامی تامین گردد.

منابع

1. Andrew, M., Borman, E., et al. (2008) Molecular identification of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, **61(4)**: 7-12.
2. Berghofer, L. K., Hocking, A. D. (2003) Miskelly D.

Microbiology of wheat and flourmilling in Australia. *International Journal Food Microbiology*, **85(1-2)**: 137-49.

3. Galvano, F., Pietri, A., et al. (1996) Reduction of carry over of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbon. *Journal of Food Protection*, **59**: 551-554.
4. Goldbatt, L. A. (1969) Aflatoxin. Academic Press, New York, 1-40.
5. Halt, M. (1994) *Aspergillus flavous* and aflatoxin B1 in flour production. *Europian Journal Epidemiology*, **10(5)**: 555-8.
6. Henry, J., Whitaker, H., et al. (2002) Aflatoxin M1 the codex committee. *Food Additives and contaminants*, 135-139.
7. HinRikson, H. P., Hurst, S. F., et al. (2005) Molecular Methods for the identification of *aspergillus* species. *Medical Mycology Supplement*, **43**: 5129-5137.
8. Hwang, J. H., Lee, K. G. (2006) Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. *Food Chemistry*, **98(1)**: 71-75.
9. Kang'ethe, E. K., M'Ibui, G. M. et al. (2007) Prevalence of aflatoxin M1 and B1 in milk and animal feeds from urban smallholder dairy production in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya. *Eastern African Medical Journal*, **84(11)**: 83-6.
10. Khanafari, A., Soudi, H. et al. (2007) Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *Iranian Journal Environ Mental Health Sciences and Enginnring*, **4(3)**: 163-168.
11. Magnani, M., Fernandes, T., et al. (2005) Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Science Agriculture*, **62**: 45-49.
12. Sales, A. C., Yoshizawa, T. (2005) Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus* section flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *Journal of Toxicology*, **22**: 429-439.
13. Tayebi, J., Miraboualfathi, M. (2002) Aflatoxins B1, B2 and *Aspergillus flavus* contamination of several maize hybrids in field. *Applied Entomology Phytopathology*, **69(2)**: 79-84.