Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Identification of Toxigenic Aspergillus Species in Rice Produced in Khuzestan and Mycotoxins in Iimported Cereals

Razie Ranjbar[1], Mohammad Roayaei Ardakani[1*], Mehdi Mehrabi Kushki[2], Iraj kazeminezhad[3]

1. *Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz , Ahvaz, Iran*
2. *Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
3. *Department of Physic, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

10.30699/ijmm.13.5.355

ABSTRACT

Background: Due to their high amount of carbohydrate and enough moisture, cereals are a good environment for the growth of toxigenic fungi. Because of the carcinogenicity and mutagenicity of mycotoxins, preventing them from entering the food chain is essential. Therefore, the present study was conducted to determine the amount and type of contaminated imported cereals and rice produced in Khuzestan province.

Materials & Methods: In October and November 2015, a total of 50 random samples of rice was collected from paddy fields. Aspergillus were identified based on available diagnostic criteria and PCR. The amount and type of aflatoxin in rice samples and mycotoxins in imported cereals (winter 2015 to autumn 2016) were evaluated by HPLC.

Results: Based on one sample t-test and comparing the mean of mycotoxins contaminating cereals in different seasons with national maximum standard, the amount of mycotoxins in barley and wheat were within the standard range but %8.4 of corn was higher than the permitted level (ppb5). Analysis of aflatoxins in rice also showed that 16 samples were contaminated with aflatoxin B1. *Aspergillus flavus* was the major pollutant (%42.1) isolated from rice.

Conclusion: *Aspergillus flavus* is the major producer of aflatoxin B1 in domestic rice. Examination of imported cereals also showed high rates of fungal growth and production of secondary metabolites, possibly due to inadequate storage conditions, high temperature and humidity. Therefore, it is recommended to strengthen the monitoring tools in the processing and storage of rice and cereals.

Keywords: Mycotoxin, HPLC, Carcinogenic, Aspergillus, Cereals

Received: 2019/10/08; **Accepted**: 2020/02/06; **Published Online:** 2020/02/11

Corresponding Information: **Mohammad Roayaei Ardakani,** Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Email: roayaei_m@yahoo.com

Copyright © 2019, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Ranjbar R, Roayaei Ardakani M, Mehrabi Kushki M, kazeminezhad I. Identification of Toxigenic Aspergillus Species from Rice of Khuzestan and Mycotoxins in Imported Cereals. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (5) :355-373

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Mycotoxins are low-molecular-weight natural products that are produced by filamentous fungi as secondary metabolites **(1)**. There are five important mycotoxins that are naturally present in crops, including Aflatoxin produced by *Aspergillus flavus*, ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*, Zearalenone and doxy-nivalenol produced by *Fusarium graminearum*, and Fumonisin produced by *Fusarium verticillioides* **(2)**. Six of the 18 different types of aflatoxin identified are of major importance, including B1, B2, G1, G2, M1, M2. Aflatoxin B1 has been classified as a Group A carcinogen by world health organization (WHO), for its constant contribution to the pathogenesis of liver cells **(1,5)**. Currently being used to detect a wide variety of mycotoxins, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) leads to the production of

reliable data and accurate, precise and repeatable results, and will usually be of interest to researchers **(6)**.

Although the weather in a particular country may not cause the development of a particular mycotoxin such as aflatoxin, the problem may come from another country in the form of crops such as peanuts and corn.

Materials and Methods

Isolation of Aspergillus Species

Collecting Rice Samples

In November 2015, 50 samples of rice husk from Baghmalek (23 samples of Champa), Shadegan (12 samples of Anbarboo) and Shooshtar (15 samples of Anbarboo) were collected through non-random convenience sampling. About 300 gr of rice husk was collected and transferred to the laboratory in sterile bags.

Isolation of Aspergillus Colonies from Rice Samples

One hundred rice seeds were randomly selected from each sample after washing and culturing on Sabouraud dextrose agar (SDA), based on colonial appearance and reproductive organs.

Identification of Aspergillus Strains Based on Morphological Traits

After 5 to 7 days of daily growth of the fungi and the type and shape of the colonies (Figure 1), Aspergillus fungi were identified by mycological and physiological methods according to John I. Pitt Diagnostic Key.

Classification of this group based on morphological identification is a traditional way that is very difficult and can lead to misdiagnosis, especially for *Aspergillus niger* species, which are a group of morphologically indistinguishable species **(8-10)**.

Identification of Aspergillus Strains Based on ITS Sequencing

Fungal Mycelium Production and DNA Extraction

The grown mycelium mass was collected in SDB medium, washed with sterile distilled water and then dehydrated. The mycelium mass was powdered in liquid nitrogen. DNA isolation was performed with the modification of Raeder & Broda (1985) (with minor modification) **(11,12)**.

Mycelium powder was purified and protein degraded in three successive stages using phenol, chloroform, and isoamyl alcohol. The DNA was finally collected by ethanol precipitation and washed with 70% ethanol.

ITS Gene Amplification

The ITS1-F and ITS4-R primer pairs were used to amplify around 600 bp of ITS regions. The reaction was performed in a thermocycler (Biorad) with the following temperature program: 3 min at 95°C and then 35 cycles, 95°C for 30 sec., 52°C for 40 sec., 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 5 min.

Measurement and Determination of Mycotoxins Level and Type by HPLC

Sample Collection

The analysis of mycotoxins in imported cereal was carried on 50 samples out of 2750 samples referred from Imam Khomeini Port Customs in winter, spring, summer and autumn 2016. It should be noted that the basis for the determination and detection of mycotoxins by the HPLC method was the same in all cases according to the standards of the National Iranian Standards Organization.

Sample Preparation

Fifty grams of samples were weighed for testing mycotoxins according to Iranian National Standard No. 6872 “Human-Animal Feed, Measurement of Group B and G Aflatoxins”, No. 9238 “Cereals and its Products - Measurement of Ochratoxin A”, No. 9239 “Cereals and Products” Its weights - the zearalenone measurement”, and No. 9240 “doxylamine content determination”

Measuring the Amount and Type of Mycotoxins

The toxin was extracted from the samples by solvent extraction (methanol 80%). The extract was diluted with Watman filter paper to a certain concentration after being filtered through a sinter filter. Extracts obtained from the immunoaffinity column containing specific antibodies (ZearalaTest™, AflaTest™, OchraTest ™, DONTest ™) were passed at a drop per second rate and the antigen present in the extract was bound to specific antibodies in the column. Injection, isolation, detection, and determination of Mycotoxins was calculated by reversed-phase HPLC columns and derivative and fluorescence detector, through comparison of the standard substrate surface with an unknown specimen, taking into account the dilution factor in ng/g (HPLC device, KNAUER, Germany). In order to calculate the recovery rate of mycotoxin toxins with a concentration of 1.6 ppb in healthy specimens, spiked specimens were read and extracted in a similar manner. Recovery rates of mycotoxins were in the range of 0-6%. This range is acceptable by national standards and indicates that the extraction operations are well performed.

Results

Investigation and Identification of Aspergillus Isolates from Rice

Of the 19 samples sequenced, 8 isolates (group I) were identified as *Aspergillus flavus*, 2 isolates (group II)

as *Aspergillus terreus*, 1 isolate as *Aspergillus nidulans* (Group III), 3 isolates as *Aspergillus tubingensis*, 3 isolates as *Aspergillus niger* and 1 isolate as *Aspergillus SP* (Figures 2 and 3).

The ITS region sequences in the studied samples showed 99-100% similarity to the type strains of any gene in the NCBI database (Table 1).

Table 1. Identification results of isolates based on blast morphology and search and their access number registered in the gene bank

Aspergillus has the most similarity	Isolate name (registered in GenBank)	Gathering location	Accession Number of Sequences Registered for this Study in GenBank
			ITS
Aspergillus flavus	*Sho_R1f*	Shooshtar	KY490723
	Sho_R2f	Shooshtar	KY490717
	Bag _R6f	Baghmalek	KY490710
	Bag _R7f	Baghmalek	KY490714
	Bag _R8f	Baghmalek	KY490709
	Bag_R10f	Baghmalek	KY490722
	Sha_R15f	Shadegan	KY490712
	Sha_R18f	Shadegan	KY490711
Aspergillus terreus	*Sha_R12t*	Shadegan	KY490721
	Sha_R14t	Shadegan	KY490708
Aspergillus tubingensis	*Sha_R11tu*	Shadegan	KY490713
	Sha_R13tu	Shadegan	KY490707
	Sha_R16tu	Shadegan	KY490706
Aspergillus nidulans	*Bag_R5ni*	Baghmalek	KY490724
Aspergillus niger	*Sho_R4n*	Shooshtar	KY490718
	Bag_R9n	Baghmalek	KY490715
	Sha_R17n	Shadegan	KY490720
	Sha_R19n	Shadegan	KY490719
Aspergillus SP	*Sho_R3a*	Shooshtar	KY490716

***All samples have 100-99% sequence similarity to standard samples in the NCBI database**.

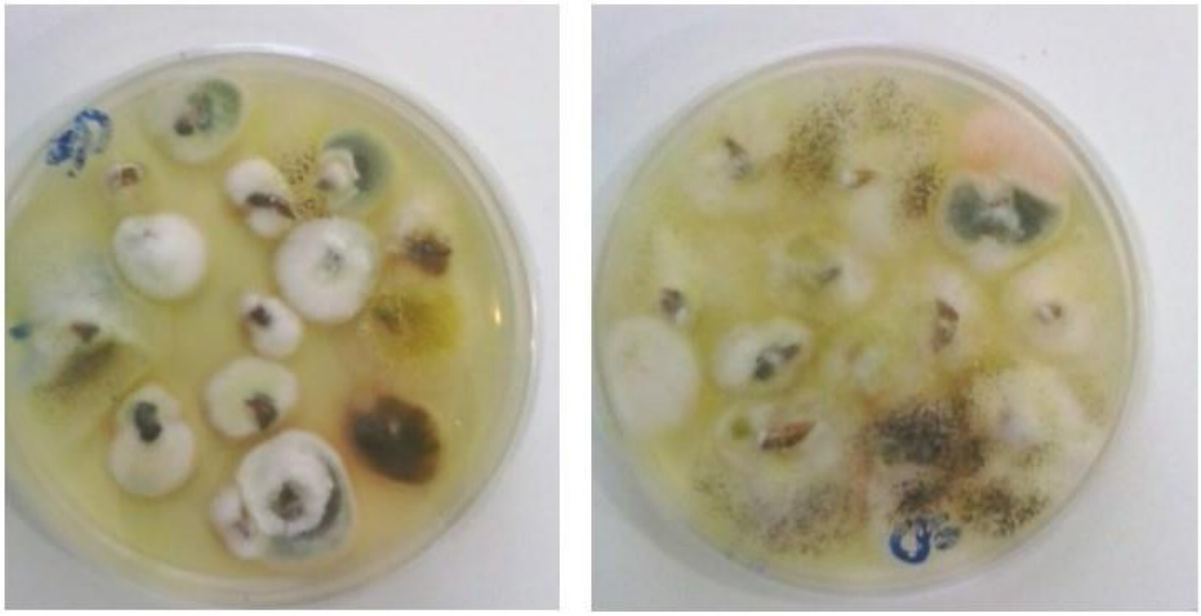


Figure 1. Fungal colonies appearing on the SDA medium at 28°C for five days.

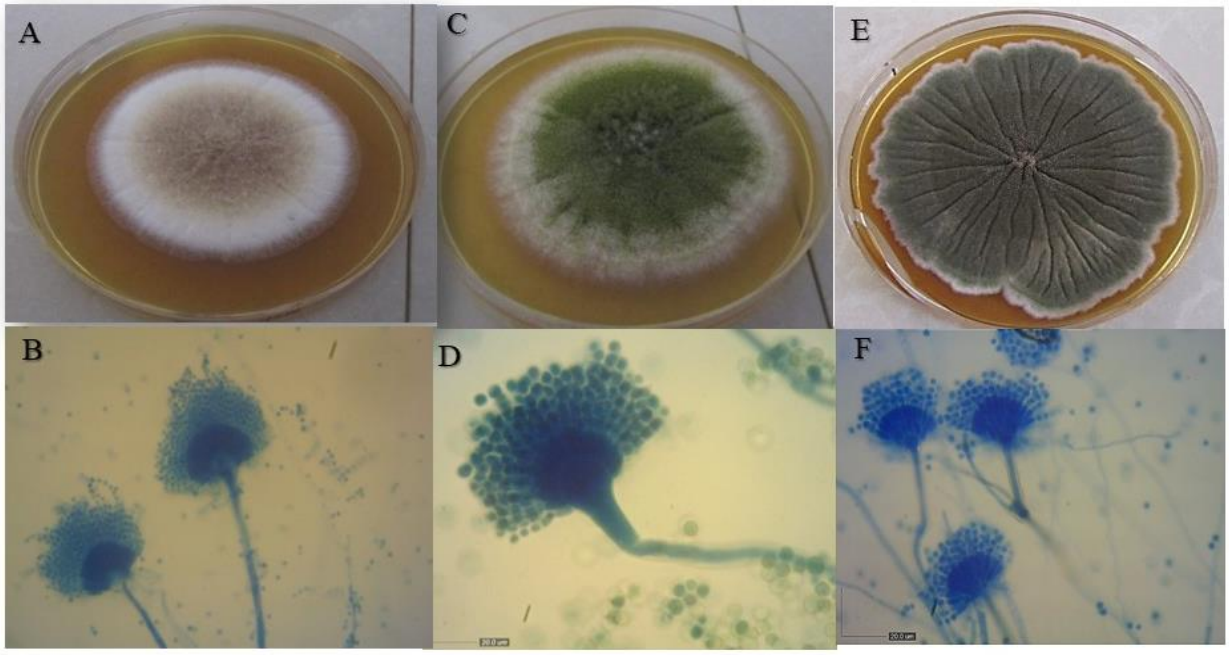


Figure 2. Microscopic image of Aspergillus terreus (A: conidiophore (x40); B: Isolated image on the plate, (Aspergillus flavus; C: conidiophore (x40) D: isolate image on the plate) and Aspergillus nidulans (E: conidiophore (x40) F: isolate image on the plate)

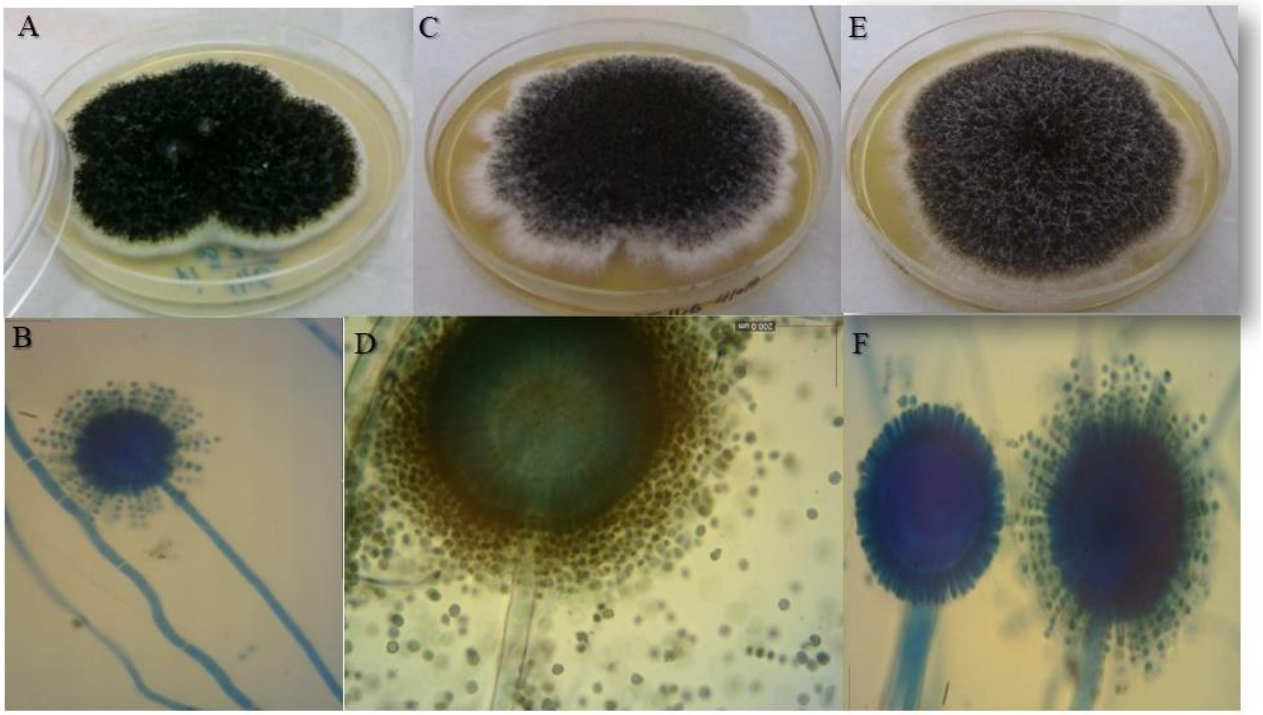


Figure 3. Microscopic image of *Aspergillus tubingensis* (A: *conidiophore* (x40) B: Isolated image on the plate), *Aspergillus niger* (C: *conidiophore* (x40) D: isolate image on the plate) and *Aspergillus sp.* (E: *conidiophore* (x40) F: isolate image on the plate)

Results of Mycotoxins Assay

The presence of mycotoxins in imported cereals was evaluated qualitatively and quantitatively. From winter to autumn 2016, the type and amount of mycotoxin were measured in 2750 samples of cereals referred to customs in three laboratories in Ahvaz. These included corn, wheat, and barley. The mycotoxins tested on these cereals were aflatoxins, zearalenone, deoxynivalenol, and ochratoxin, according to applicants.

The results of the mean cereal contamination of different mycotoxins and their comparison with the national standard of Iran (5925) are presented in Table 1, 2 and 3 respectively (one sample t-test) (Graph pad prism 8). The results of statistical analysis showed that the mean of mycotoxins in different grains had a significant difference with the maximum national standard of each mycotoxin (P<0.05)

Out of 2111 corn samples, 8.4% (689) were over contaminated (5 ppb) in AFB1 and 0.4 (9), 3.3 (2), and 0.1 (3) of samples were over contaminated in AFB2, AFG1, and AFG2, respectively.

The levels of ZEN, DON and OTA mycotoxins in 1139 corn samples were lower than the national standard and lower than 200 ppb, 1000 ppb, and 50 ppb, respectively. Of 166 wheat samples, 4.2% (1.2%) and 1.2% (2%) of samples were contaminated at concentrations below 5 ppb with AFB2 and AFG1, respectively. Also, 13.8% (16) of the samples were contaminated with OTA at less than 5 ppb.

None of the wheat samples showed contamination with DON, ZEN, AFB1, and AFG2. Of the 149 barley samples imported during the sampling interval of this study, only aflatoxins were detected in which no contamination was observed in any of the samples. ANOVA and LSD post hoc tests were used to compare the mean levels of mycotoxins in different months of the year (January to December 2015). According to the results of this test, there was a significant difference between the mean of other mycotoxins in different months of the year (P<0.05).

Of the 50 rice samples tested for aflatoxins, 16 were contaminated with aflatoxin B1, of which only 1 showed more than 5 ppb. Samples 2 and 4 were contaminated with AFB2 and AFG1, respectively, (<5 ppb). The results of the study of mean rice contamination with aflatoxins and comparison with the national standard of Iran are presented in Table 4 (one sample t-test).

Table 2. Comparison of mean mycotoxin contaminants of imported corn with the national standard of Iran in winter and spring 2016

Grains	mycotoxins	National standard maximum allowable (ng /g)	Winter2016			Spring 2016			Maximum contamination(ng/g)
			Average (ng/g)	Standard deviation	P-value	Average (ng/g)	Standard deviation	P-value	
Corn	DON	1000	105.8	62.31	<0.0001	329.9	278.2	0.0007	**868.57**
	ZEN	200	13.47	13.35	<0.0001	33.58	4.582	0.0003	**123.731**
	OTA	50	0.035	0.1385	<0.0001	0.71	0.6621	<0.0001	-
	AFB1	5	1.151	2.669	<0.0001	0.05	0.0734	<0.0001	**169.08**
	Total AFs	20	0.8	0.973	<0.0001	1.25	2.253	<0.0001	**266.77**

Table 3. Comparison of mean mycotoxins of imported corn contaminants with the national standard of summer and autumn 2016

Grains	Mycotoxins	National standard maximum allowable (ng /g)	Summer2016			Autumn2016		
			Average (ng/g)	Standard deviation	P-value	Average (ng/g)	Standard deviation	**P-value**
Corn	DON	1000	496.6	175.6	<0.0001	0	0	**NC**
	ZEN	200	54.43	30.89	<0.0001	0	0	**NC**
	OTA	50	0.97	0.73	<0.0001	0.98	0.71	**<0.0001**
	AFB1	5	7.03	19.23	0.28	7.553	18.52	**0.0025**
	Total AFs	5	11.91	32.86	<0.0001	11.02	29.32	**<0.0001**

Table 4. Comparison of mean mycotoxins contaminated by imported wheat with Iranian national standard in spring 2016

Grains	mycotoxins	National standard maximum allowable (ng /g)	Spring 2016			Maximum contamination (ng/g)
			Average (ng/g)	Standard deviation	P-value	
Wheat	DON	1000	0	0	NC	-
	ZEN	200	0	0	NC	-
	OTA	5	2.67	1.053	<0.0001	**4**
	AFB1	5	0	0	NC	-
	Total AFs	20	0.21	0.07	0.0016	-

Table 5. Comparison of the average Aflatoxins of Khuzestan rice production contaminants with the national standard of Iran

mycotoxins	National standard maximum allowable (ng /g)	Average(ng/g)	Standard deviation	P-value	Maximum contamination(ng/g)
AFB1	5	2.45	4.42	0.036	18.612
Total AFs	20	2.60	4.52	<0.00001	-

Discussion

In this study, Aspergillus susceptible to toxin production was identified and isolated from rice seeds of Khuzestan province (Champa and Anbarboo). Results showed high percentages of *Aspergillus flavus* (42.1%) followed *by Aspergillus niger, Aspergillus tubingensis, Aspergillus terreus,* and *Aspergillus nidulans* with 21.5%, 15.7%, 10.52%, and 5.26%, respectively. The findings of Nyongesa *et al.* (2015), Riba *et al.* (2010) and Gao *et al.* (2007) showed that *Aspergillus flavus* was the main pollutant in oilseeds (pistachio, almond, hazelnut), corn, wheat, cereals, and beans, respectively. The results of the studies of Makun *et al.* (2007), Amadi *et al.* (2009) were also consistent with this study (13, 14, 15, 16, 17). Because of the saprophyte and widespread toxinogenic fungi such as Aspergillus, rice and cereal products have some relative contamination from the beginning.

The presence of spores and their propagation during transport and storage of grains or contamination of the storage environment with these fungi can lead to the spread of contamination. As Magnussen & Parsi (2013) found out, drought stress is one of the factors increasing the susceptibility of plants to Aspergillus and as a result of aflatoxin infection (18), the results of this study also suggest that the rate of these fungi can be increased with high heat conditions and increased storage time.

By stage of infection, mycotoxins are "field mycotoxins" produced mainly by Fusarium species and "Mycotoxins in storage", which are produced by Aspergillus and Penicillium species in the pre-harvest period or immediately after harvest during storage **(19,20)**.

The growth of fungi and the accumulation of mycotoxins in food and feed are influenced by various factors which in general relative humidity and temperature are critical factors in the drying and storage period **(21)**. Findings from the study of the amount and type of cereal mycotoxins imported from Imam Khomeini port, mainly from South American countries, showed that the contaminations were not nearly acceptable by Iranian national standard, and corn samples showed the highest levels of mycotoxins, especially aflatoxins. The findings of a study by Mazaheri *et al.* (2018) also confirmed that corn is most susceptible to mycotoxins, especially aflatoxins **(22)**. The findings of this study indicate that the maximum concentration of mycotoxins is in September and November. These results illustrate the impact of the duration of storage of grain in shipments or in warehouses. This is confirmed by Najafian *et al.* (2014) **(25)**.

In a study, Ranjbar *et al.* (2010) showed that Aspergillus and Aflatoxin levels decrease in spring and summer and due to the use of stocked livestock feed and the lack of proper storage conditions, the rate of milk contamination with aflatoxin M1 increases in the autumn and winter. They stated that inappropriate storage, in addition to contaminating livestock feed with Aspergillus and subsequent aflatoxin production, also transmitted it to *packaged* milk **(26)**.

Cano-Sancho *et al.* (2013) also stated that the presence of mycotoxins in food depends on many conditions such as season, weather (temperature, humidity), target area, harvesting method, storage and processing **(27)**. Lahouar *et al.* (2015) studied the effect of temperature and incubation time on the growth rate of *Aspergillus flavus* and AFB1 production on sorghum seeds, and reported that the flavus isolate from Tanzanian sorghum has the ability to grow over a wide range of temperatures (15-37°C), however, aflatoxin production occurs at a lower temperature range (25-37°C) **(28)**. Ghali *et al.* (2010) showed that the highest aflatoxin production occurred at 24°C but the highest flavus strain growth occurred at -35°C **(19)**.

In this study, the presence of Aspergillus did not indicate the presence of aflatoxins and, conversely, the presence of aflatoxins was not a reason for the presence of Aspergillus.

Conclusion

Given the widespread presence of mycotoxins in foods and their harms, especially AFB1, which is a contaminant in food products, control of AFB1 contamination in foodstuffs requires monitoring different factors such as raw materials and food supply, food processing, finished products, and storage.

Acknowledgment

The authors would like to express their gratitude to the Research Deputy of Khuzestan Agricultural Research Center and Parham Jonoub Company for their cooperation with this study.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۵ ـ آذر و دی ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس مولد توکسین در برنج‌های خوزستان و مایکوتوکسین‌های موجود در غلات وارداتی

راضیه رنجبر[۱]، محمد رعایایی اردکانی[۱*]، مهدی مهرابی کوشکی[۲]، ایرج کاظمی نژاد[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
۲. گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی،دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
۳. گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶

پذیرش:۱۳۹۸/۱۱/۱۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۱/۲۲

موضوع:

قارچ‌شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

محمد رعایایی اردکانی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

ایمیل: roayaei_m@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: غلات به واسطهٔ داشتن میزان زیادی کربوهیدرات و رطوبت کافی محیط مناسبی برای رشد قارچ‌های توکسین‌زا هستند. با توجه به سرطان‌زایی و جهش‌زا بودن مایکوتوکسین‌ها، جلوگیری از ورود آنها به زنجیرهٔ غذایی امری ضروری است. بنابراین مطالعهٔ حاضر به‌منظور تعیین میزان و نوع آلودگی غلات وارداتی و برنج تولیدی استان خوزستان انجام شد.

مواد و روش کار: ۵۰ نمونه برنج تولید خوزستان در آبان ماه ۹۴ به‌صورت دردسترس از شالیکاران جمع‌آوری شد. شناسایی آسپرژیلوس‌ها براساس معیارهای تشخیصی و نیز روش PCR، انجام شد. در ادامه میزان و نوع آفلاتوکسین نمونه‌های برنج و مایکوتوکسین‌های نمونه‌های غلات وارداتی (زمستان ۹۴ تا پاییز ۹۵) به روشHPLC مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: براساس آزمون one sample t-test و مقایسهٔ میانگین مایکوتوکسین‌های آلوده‌کننده غلات در فصل‌های مختلف با حد استاندارد ملی، میزان مایکوتوکسین‌ها در جو و گندم درحد استاندارد بود، اما ۸/۴٪ نمونه ذرت، آلودگی بیش از حدمجاز (۵ppb) به AFB1 نشان دادند. بررسی آفلاتوکسین‌ها در برنج نیز حاکی از آلودگی در حد مجاز ۱۶ نمونه به آفلاتوکسین B1 بود. *آسپرژیلوس فلاووس* با حضور ۴۲/۱ درصدی، آلاینده اصلی و گونهٔ غالب (۴۲/۱٪) جدا شده از برنج بود.

نتیجه‌گیری: *آسپرژیلوس فلاووس* مهم‌ترین عامل تولید کننده آفلاتوکسین B1 در برنج‌های داخلی است. بررسی غلات وارداتی نیز آمار بالایی از رشد قارچ‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه را نشان داد که احتمالا به‌خاطر مناسب نبودن شرایط نگهداری، دما و رطوبت بالا باشد. از این رو پیشنهاد می‌گردد ابزارهای نظارتی درکنترل مراحل فرآوری و ذخیره‌سازی برنج و غلات تقویت شود.

کلید واژه‌ها: مایکوتوکسین، HPLC، سرطان‌زایی، آسپرژیلوس، غلات

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها{Myco (قارچ)+ Toxin (سم)} محصولات طبیعی با وزن مولکولی پایین هستند که به‌وسیلهٔ قارچ‌های رشته‌ای به عنوان متابولیت ثانویه تولید می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها اساساً در مسیلیوم قارچ‌های مولد سم و نیز ممکن است در اسپور این ارگانیسم‌ها یافت شوند (۱).

آفلاتوکسین تولیدشده به‌وسیلهٔ *Aspergillus flavus*، اُکراتوکسین تولیدشده به‌وسیلهٔ *Aspergillus ochraceus* و *Penicillium verrucosum* ، زرالنون و داکسی نیوالنول تولید شده به‌وسیلهٔ *Fusarium graminearum* ، فومونیسین تولید شده به‌وسیلهٔ *Fusarium verticillioides* ، پنج مایکوتوکسین مهمی هستند که به طور طبیعی در محصولات کشاورزی حضور دارند (۲).

آسپرژیلوس‌ها از جمله قارچ‌های رشته‌ای، ساپروفیت و توکسین‌زا (در همه جا حضور دارند) و از مهم‌ترین قارچ‌های آلوده‌کننده غلات و مواد غذایی هستند. جنس آسپرژیلوس به راحتی بوسیلهٔ خصوصیات کونیدیوفور شناسایی می‌شود اما شناسایی و تمایز گونه‌ها پیچیده است (۳). در سال‌های اخیر با استفاده از PCR و شناسایی مولکولی در کنار روش‌های فیلوژنی و میکروسکوپی موفقیت‌های چشمگیری در افتراق گونه‌های این ارگانیسم حاصل شده است. از جمله نواحی ژنومی که اغلب برای شناسایی گونه‌های

آسپرژیلوس استفاده می‌شود، ناحیه ITS است (۴). مواد ژنتیکی قارچ‌ها در هسته و میتوکندری قرار دارند که از قسمت‌های مهم قارچی ژن‌هایی به نام rDNA هستند. در هر واحد ژنی نواحی جداکننده ITS1 و ITS2 ، نواحی بیان شونده را از هم جدا می‌کنند. این نواحی و نواحی جداکننده بین ژنی (IGS) به دلیل تنوع بالایی که دارند معمولا برای بررسی روابط فیلوژنتیک درون گونه‌ای یا گونه‌های یک جنس استفاده می‌شوند.

آفلاتوکسین‌ها در درجهٔ اول توسط *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* در محصولات کشاورزی از جمله غلات (گندم، ذرت و برنج) پنبه، بادام زمینی، آجیل درختی، فلفل و ادویه‌جات تولید می‌شوند. ۶ نوع از ۱۸ نوع مختلف آفلاتوکسین شناسایی شده از اهمیت زیادی برخوردارند که شامل B۱، B2، G1، G2، M1، M2 هستند. آفلاتوکسین B1 به دلیل سهم ثابتی که در پاتوژنز سلول‌های کبدی دارد توسط سازمان جهانی بهداشت، WHO، به‌عنوان مادهٔ سرطان‌زای گروه A طبقه بندی شده است (۱،۵).

روش‌هایی که جهت تشخیص و تعیین کیفیت مایکوتوکسین‌ها تعریف شده‌اند شامل TCC، HPLC، طیف‌سنجی جرمی، ELISA، ایمونوسنسور الکتروشیمیایی، هستند. در حال حاضر برای تشخیص انواع گسترده مایکوتوکسین‌ها از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) استفاده می‌شود. این روش سریع که به تولید داده‌های قابل اعتماد، نتایج دقیق، حتمی و قابل تکرار منجر می‌شود، معمولا مورد توجه پژوهشگران است (۶).

گرچه آب و هوا در یک کشـور خاص ممکن است بسط و گسترش مایکوتوکسین خاصی مثل آفلاتوکسین را باعث نشود اما این مشکل ممکن است از کشوری دیگر در قالب محصولات کشاورزی مثل بادام زمینی و ذرت وارد شود.

به دلیل اینکه غلات وارداتی قبل از مصرف مدتی در انبارها نگهداری می‌شوند و با توجه به شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب استان خوزستان، شرایط مناسبی برای رشد انواع قارچها فراهم خواهد بود. بنابراین این مطالعه در قدم اول به بررسی میزان و نوع مایکوتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین (AF)، کَراتوکسینA (OTA)، زرالنون (ZEN) و داکسی نیوالنول (DON) در نمونه غلات وارداتی به بندر امام خمینی(ره)، اغلب از کشورهای آمریکای جنوبی، که عمده به صورت خوراک دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند پرداخته است و از آنجا که استان خوزستان جز استان‌های تولیدکننده برنج در جنوب کشور محسوب می‌شود، به بررسی حضور قارچهای مستعد تولید توکسین و اندازه‌گیری میزان انواع آفلاتوکسین‌ها در دانه‌های برنج محصول کشاورزان استان که در منازل نگهداری و مورد مصرف غذایی قرار می‌گیرند، صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی گونه‌های آسپرژیلوس

جمع‌آوری نمونه‌های برنج

در آبان ماه سال ۱۳۹۴، به صورت نمونه‌گیری غیرتصادفی دردسترس، ۵۰ نمونه شلتوک برنج با مراجعه به انبار شلتوک شالیکاران شهرستان‌های باغ ملک (۲۳نمونه برنج چمپا)، شادگان (۱۲نمونه عنبربو) و شوشتر (۱۵ نمونه عنبربو)، از سومین کیسهٔ قابل مشاهده در هر انبار با استفاده از سمپلرهای استریل حدود ۳۰۰گرم شلتوک اندازه گیری و در کیسه‌های نایلونی سترون جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی پرگنه‌های آسپرژیلوس از نمونه‌های برنج

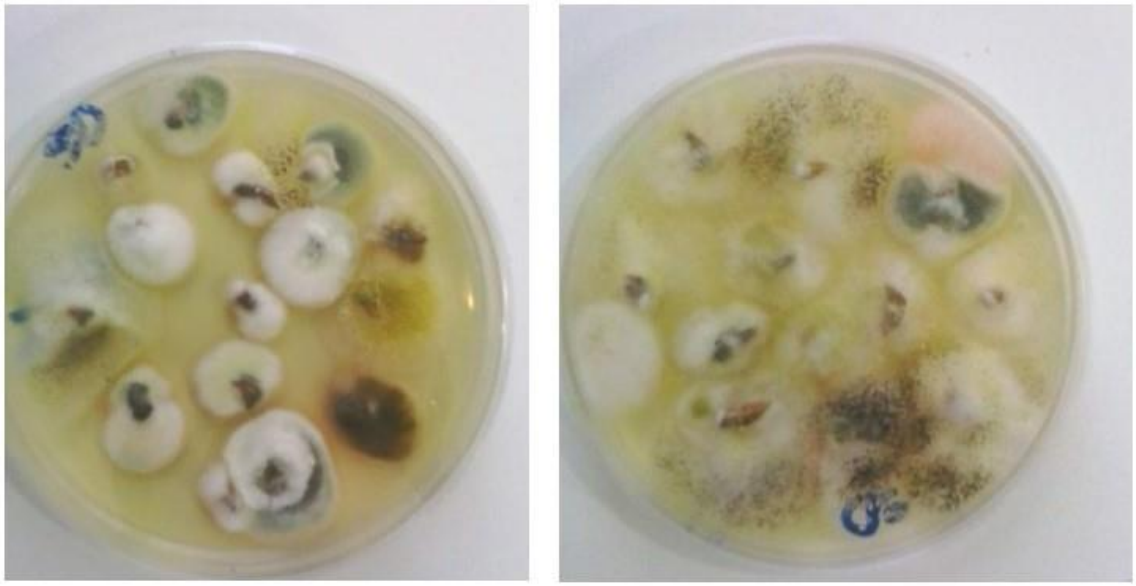
از هر نمونه به طور تصادفی ۱۰۰ دانه انتخاب وجهت رفع آلودگی سطحی از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد استفاده شد. پس از شستشو و خشک کردن دانه‌ها، به طور تصادفی ۲۰ دانه از بین آنها انتخاب و پس از دو نیم کردن در دو ظرف پتری حاوی محیط کشت سابرو دکستروز - آگار (SDA) به صورت مماس با محیط کشت قرار داده و در دمای ۲۵-۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. بعد از ۵-۲ روز، پرگنه‌های ظاهر شده اطراف دانه‌ها به ظروف جدید SDA منتقل شدند و بر اساس ظاهر پرگنه و اندام‌های تولیدمثلی، جدایه‌های آسپرژیلوس برای ادامهٔ بررسی انتخاب شدند.

خالص‌سازی جدایه‌های آسپرژیلوس

جدایه‌های آسپرژیلوس در ظروف پتری محتوی SDA کشت داده شد و برای اسپوردهی، در شرایط نور و دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس به مدت یک تا دو هفته نگهداری شدند. سپس با استفاده از آب مقطر استریل محتوی ۰/۱٪ توین۸۰، سوسپانسیون اسپور تهیه شد. رقت‌های مختلف سوسپانسیون اسپور روی محیط کشت SDA رشد داده شد و خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور انجام شد.

شناسائی جدایه‌های آسپرژیلوس بر اساس صفات ریخت‌شناسی

بعد از ۵ تا ۷ روز و بررسی روزانه، رشد انواع قارچها و نوع و شکل پرگنه‌ها (شکل۱)، قارچهای جنس آسپرژیلوس با روش‌های تشخیص قارچ شناسی از نظر ریخت‌شناسی و فیزیولوژی بر اساس کلید تشخیصی John I. Pitt مورد شناسایی قرار گرفتند (۷).



شکل ۱. *پرگنه‌های قارچی ظاهر شده روی محیط SDA، با شرایط نگهداری دمای ۲۸درجه سلسیوس به مدت پنج روز*

خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌ها با استفاده از کشت قارچ روی لام یا slide culture و پس از بلوغ کنیدیوفورها با اضافه کردن یک قطره لاکتوفنول یا کاتن‌بلو بر روی لام و عدسی ۲۰-۱۰۰ میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Dino Capture 2.0. version1.5.11.A ، مورد مطالعه قرار گرفت. صفات مورد استفاده جهت شناسائی شامل سرعت رشد پرگنه، اسپورزایی، تولید اسکلرت، رنگ میسلیوم، کنیدیوفورها و اسپورها، رنگدانه‌های محلول، پشت پرگنه، شکل انتهای کنیدی، وجود یا عدم وجود متولا بین وزیکل و فیالید، رنگ کنیدیوفور، اندازه، شکل و بافت کنیدیوفورها، وزیکل، متولا (اگر وجود داشت)، فیالید، کنیدی و سلول‌های Hulle بودند. طبقه‌بندی این گروه بر پایهٔ شناسایی مورفولوژیکی یک روش سنتی است که بسیار سخت بوده و می‌تواند منجر به تشخیص نادرست گردد، به‌خصوص درمورد گونه‌های آسپرژیلوس نیجرکه یک گروه از گونه‌های غیرقابل تشخیص از لحاظ مورفولوژی هستند (۸،۹،۱۰).

شناسائی جدایه‌های آسپرژیلوس بر اساس توالی‌یابی ناحیه ITS

تولید میسلیوم قارچی و استخراج DNA

سوسپانسیون اسپور جدایه‌های آسپرژیلوس را با نسبت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر به ظرف‌های حاوی محیط کشت SDB اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۲۸ درجهٔ سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. با استفاده از پمپ خلأ، قیف و کاغذ صافی سترون، توده میسلیومی رشد یافته در محیط کشت‌های مایع SDB جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شستشو و سپس آب‌گیری شد. توده میسلیومی درون نیتروژن مایع پودر شد. جداسازی DNA به روش ریدر و برودا (Raeder & Broda, 1985) با اندکی تغییر انجام گرفت (۱۱،۱۲). در این روش، ۵۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم از پودر میسلیومی با استفاده از بافر تخریب به لیزاتا تبدیل و سپس در سه مرحلهٔ متوالی با استفاده از فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل پروتئین زدایی و خالص‌سازی شد .درنهایت DNA با روش رسوب با اتانول (Ethanol Precipitation) گردآوری و با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد.

تکثیر ژن ITS

برای تکثیر حدود ۶۰۰bp از نواحی ITS، از جفت آغازگر عمومی ITS1-F و ITS4-R استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۰میکرولیترشامل ۲ میکرولیتر بافرPCR (۱۰x)، ۲میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵میلی‌مولار)، ۰.۸ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۱۰ میکرومولار)، ۰.۸ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای ۱۰ میکرومولار ITS1 و ITS4 ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Polymerase Taq DNA (5U/Ul)، یک میکرولیتر DNA الگو و ۱۲/۴ آب DW تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) با برنامهٔ دمایی زیر انجام شد: یک مرحله ۳ دقیقه‌ای در ۹۵ درجهٔ سلسیوس و سپس ۳۵ چرخه، ۹۵ درجهٔ سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سلسیوس برای ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱دقیقه و در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه

انجام گرفت. محصول PCR (۳میکرولیتر) پس از مخلوط کردن با بافر بارگزاری در ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ در بافر TBE (10X) الکتروفورز شد. سپس ژل به دستگاه ژلداک منتقل و عکس‌برداری صورت گرفت.

خالص‌سازی قطعه‌های افزایشی و توالی‌یابی

محصولات PCR مربوط به هر جدایه به روش رسوب با اتانول تغلیظ و شستشو شد. بدین منظور، ۰/۱ حجم محصول، استات سدیم ۳ مولار با pH ۵/۴ و۲-۳ برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه و به مدت یک شب در دمای ۸۰- نگهداری شد سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و xg ۱۰۰۰ سانتریفوژ و رسوب به دست آمده با استفاده از اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. رسوب نهایی در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر (DW) حل و برای توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس به شرکت توپازژن ارسال شد.

توالی‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار BioEdit ver4.0.6.2 ویراستاری و با نرم‌افزار DNA Baser ver3.5.0 مونتاژ شدند. توالی‌های بدست آمده در بانک ژنی ثبت و آنالیز توالی‌ها بعد از ویراستاری، با انجام جستجوی BLASTn میزان شباهت توالی‌های هر ژن از هر جدایه با گونه‌های مرجع آشکار شد و با استفاده از شاخص‌هایی همچون درصد شناسایی بیشینه، شاخص E و درصد پوشش توالی، جدایه‌ها شناسایی شدند (جدول۱).

اندازه‌گیری و تعیین میزان و نوع مایکوتوکسین‌ها به روش HPLC

جمع‌آوری نمونه

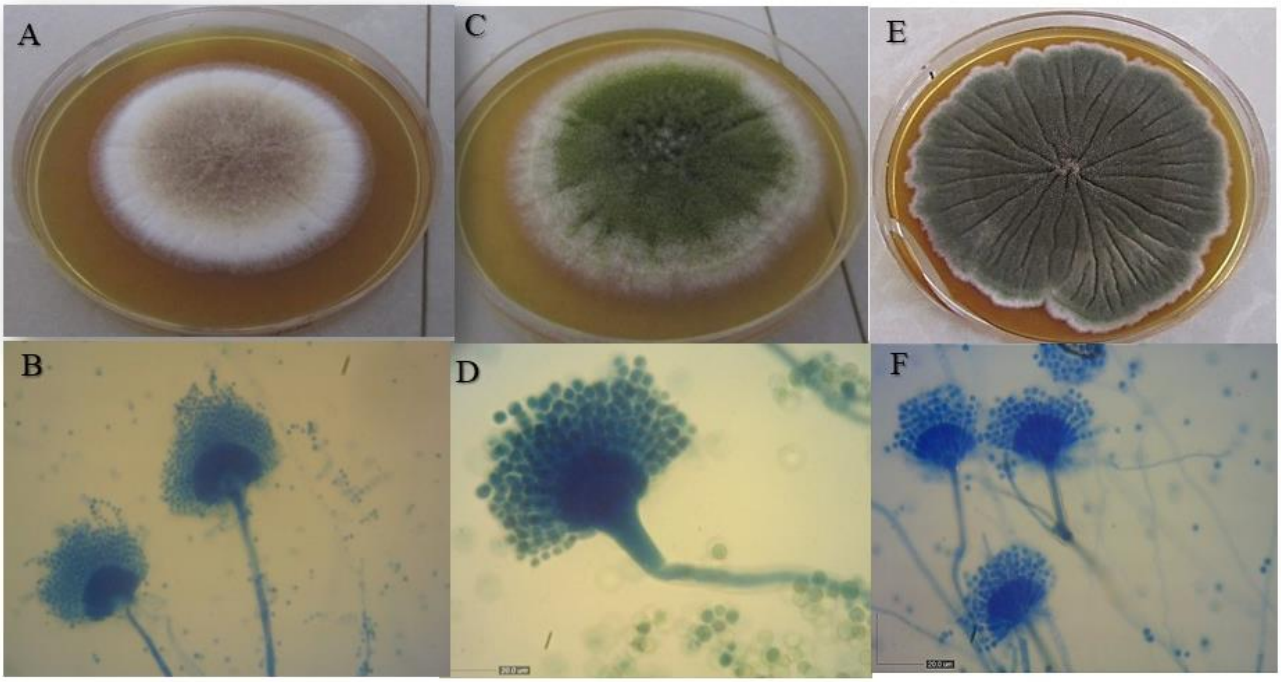
۵۰ نمونه، ۲۳ نمونه برنج چمپا، ۲۷ نمونه برنج عنبربو از کشاورزان سه ایستگاه کشاورزی واقع در شهرستان‌های باغ ملک، شادگان و شوشتر، مربوط به برداشت آبان ماه سال ۱۳۹۴، جمع‌آوری گردید و بررسی میزان و نوع آفلاتوکسین در آنها در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران انجام گرفت. بررسی مایکوتوکسین‌های غلات وارداتی، از ۲۷۵۰ نمونه غلات ارجاع شده از گمرک بندر امام خمینی(ره) طی فصل‌های زمستان ۹۴، بهار، تابستان و پاییز ۹۵ صورت گرفت. اندازه‌گیری‌ها در سه آزمایشگاه شهر اهواز از جمله آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران، شرکت پرهام جنوب و شرکت فناور اندیشه گستر کامیار انجام شد. لازم به ذکر است که که اساس تعیین و تشخیص مایکوتوکسین‌ها به روش HPLC در تمام موارد یکسان و بر اساس استانداردهای سازمان ملی استاندارد ایران صورت گرفته است.

آماده سازی نمونه‌ها

۵۰گرم از نمونه‌ها جهت آزمون مایکوتوکسین‌ها طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ « خوراک انسان-دام، اندازه گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونوافینیتی»، ۹۲۳۸ « غلات و فرآورده‌های آن- اندازه گیری اکراتوکسینA به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونوافینیتی- روش آزمون»، ۹۲۳۹ « غلات و فرآورده های آن –اندازه گیری زیرالنون به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونوافینیتی-روش آزمون» و۹۲۴۰ «غلات-تعیین مقدار داکسی نیوالنون- تخلیص به وسیله ستون ایمونوافینیتی به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا-روش آزمون» توزین شد.

اندازه‌گیری میزان و نوع مایکوتوکسین‌ها

استخراج توکسین از نمونه‌ها توسط حلال استخراج (متانول۸۰٪) انجام شد. عصاره به‌دست آمده پس از صاف شدن توسط کاغذصافی واتمن با حجم مشخصی از آب مقطر تا رسیدن به یک غلظت معین رقیق شد و پس از عبور از قیف سِنتر گِلَس، فیلتر گردید. عصاره‌های به دست آمده از ستون ایمونوافینیتی که دارای آنتی بادی اختصاصی (ZearalaTest™ ،AflaTest™ ،OchraTest™ ، DONTest™) است با سرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شد و آنتی‌ژن موجود در عصاره به آنتی‌بادی‌های اختصاصی درون ستون متصل شد. آنتی ژن متصل شده به آنتی بادی در درون ستون با عبور متانول از داخل ستون، شسته و در درون ویال جمع‌آوری و با آب رقیق شد. جهت تهیه منحنی‌های استاندارد کالیبراسیون، قبل از تزریق نمونه، ابتدا غلظت‌های معین از محلول‌های استاندارد مایکوتوکسین مورد اندازه‌گیری به دستگاه HPLC (KNAUER, Germany) تزریق شد. تزریق، جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار مایکوتوکسین‌ها با روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به ترتیب با استفاده از ستون فازمعکوس، مشتق ساز و دتکتور فلوئورسانس و از طریق مقایسه



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی آسپرژیلوس ترئوس(A: سرکنیدیوفور(۴۰x) B:تصویر جدایه بر روی پلیت)،
آسپرژیلوس فلاووس (C: سرکنیدیوفور (۴۰x)D: تصویر جدایه بر روی پلیت) و آسپرژیلوس نیدولانس (E: سرکنیدیوفور (۴۰x) F: تصویر جدایه بر روی پلیت)

سطح زیرمنحنی استاندارد با نمونه مجهول با احتساب ضریب رقت بر حسب نانوگرم برگرم محاسبه شد. برای محاسبه درصد ریکاوری سم‌های مایکوتوکسین با غلظت ۱.۶ ppb در بافت نمونه سالم اسپایک گردید و پس از عملیات استخراج به شیوه مشابه و تزریق به دستگاه، غلظت آنالیت‌ها خوانش شدند. درصد ریکاوری مایکوتوکسین های مورد نظر در محدوده ۸۰-۹۰ درصد تعیین گردیدند. این محدوده بر اساس استانداردهای ملی قابل قبول هستند و نشان می دهد که عملیات استخراج بخوبی انجام شده است.

یافته‌ها

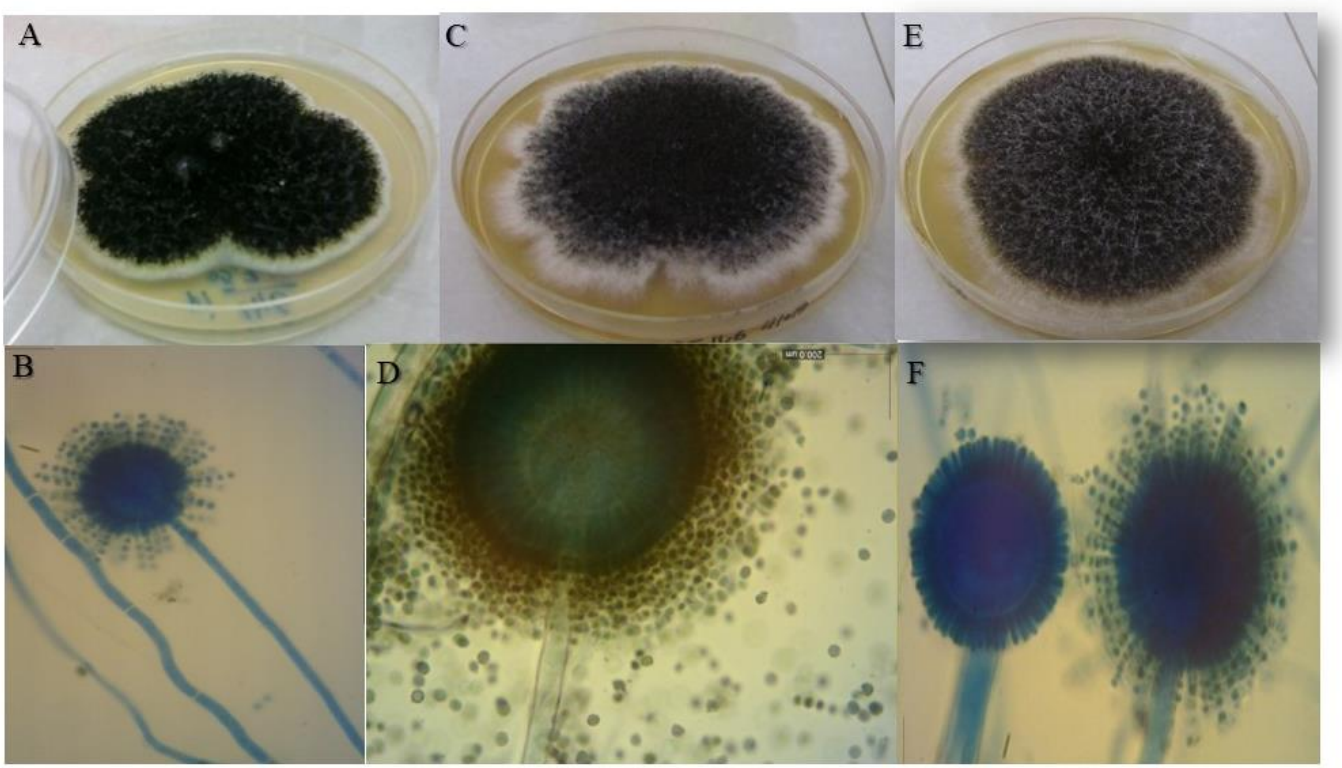
بررسی و شناسایی جدایه‌های آسپرژیلوس از برنج

از ۵۰ نمونه برنج مورد بررسی پس از انجام مراحل جداسازی از شستشوی سطحی تا تشخیص ریخت‌شناسی، ۱۹ جدایه آسپرژیلوس جداسازی شد. پس از بررسی مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، ۱۹ ایزولهٔ آسپرژیلوس، جداسازی و آنالیز DNA انجام شد. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ناحیه ITS کلیهٔ نمونه‌ها تکثیرگردید و برای تمامی جدایه‌ها یک باند به اندازهٔ تقریبی ۶۰۰bp مشاهده شد. پس از اطمینان از ماهیت جدایه‌ها در سطح گونه از طریق تعیین توالی و بررسی نمونه‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی، این نتیجه حاصل شد که مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی ۱۹ جدایه با ویژگی گونه‌ای که توسط توالی‌یابی معین شده‌بود، به طور کامل تطابق داشتند.

بدین ترتیب از ۱۹ نمونه‌ای که تعیین توالی شدند، هشت جدایه (گروه اول) به عنوان *آسپرژیلوس‌فلاووس*، دوجدایه (گروه دوم) *آسپرژیلوس‌ترئوس Aspergillus terreus* ، یک جدایه *آسپرژیلوس‌نیدولانس Aspergillus nidulans* (گروه سوم)، سه جدایه *آسپرژیلوس توبینجنسیس Aspergillus tubingensis*، سه جدایه *آسپرژیلوس نیجر Aspergillus niger* و یک جدایه به عنوان *آسپرژیلوس SP* تشخیص داده شد (شکل۲و۳). توالی ناحیه ITS در نمونه‌های مورد بررسی ۱۰۰-۹۹ درصد تشابه با استرین‌های تیپ مربوط به هر گونه موجود در بانک ژن (پایگاه داده‌ای NCBI) نشان دادند (جدول۱).

جدول ۱. نتایج شناسایی جدایه‌ها براساس ریخت‌شناسی و جستجوی بلاست و شماره دسترسی ثبت شده مربوط به آنها در بانک ژن

گونه آسپرژیلوس واجد بیشترین تشابه	نام جدایه (ثبت شده در بانک ژنی)	محل جمع‌آوری	شماره دسترسی توالی‌های ثبت شده این مطالعه در بانک ژن
			ITS
آسپرژیلوس فلاووس	*Sho_R1f*	شوشتر	KY490723
	Sho_R2f	شوشتر	KY490717
	Bag _R6f	باغ‌ملک	KY490710
	Bag _R7f	باغ‌ملک	KY490714
	Bag _R8f	باغ‌ملک	KY490709
	Bag_R10f	باغ‌ملک	KY490722
	Sha_R15f	شادگان	KY490712
	Sha_R18f	شادگان	KY490711
آسپرژیلوس ترئوس	*Sha_R12t*	شادگان	KY490721
	Sha_R14t	شادگان	KY490708
آسپرژیلوس توبنجنسیس	*Sha_R11tu*	شادگان	KY490713
	Sha_R13tu	شادگان	KY490707
	Sha_R16tu	شادگان	KY490706
آسپرژیلوس نیدولانس	*Bag_R5ni*	باغ‌ملک	KY490724
آسپرژیلوس نیجر	*Sho_R4n*	شوشتر	KY490718
	Bag_R9n	باغ‌ملک	KY490715
	Sha_R17n	شادگان	KY490720
	Sha_R19n	شادگان	KY490719
آسپرژیلوس sp	*Sho_R3a*	شوشتر	KY490716
* تمام نمونه‌ها دارای ۱۰۰-۹۹ درصد تشابه سکانس با نمونه‌های استاندارد موجود در پایگاه دادهٔ NCBI هستند.			



شکل۳. تصویر میکروسکوپی آسپرژیلوس توبینجنسیس (A: سرکنیدیوفور (۴۰x) B: تصویر جدایه بر روی پلیت)،
آسپرژیلوس نیجر(C: سرکنیدیوفور(۴۰x) D: تصویر جدایه بر روی پلیت)و آسپرژیلوس sp (E: سرکنیدیوفور (۴۰x) F: تصویر جدایه بر روی پلیت)

نتایج حاصل از بررسی مایکوتوکسین‌ها

حضور مایکوتوکسین‌ها در غلات وارداتی و نیز برنج تولیدی خوزستان، به صورت کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. طی بازهٔ زمانی زمستان ۹۴ تا پاییز ۹۵، نوع و میزان مایکوتوکسین‌ها در ۲۷۵۰ نمونه غلات ارجاع شده از گمرک به سه آزمایشگاه سطح شهر اهواز اندازه‌گیری شد. این غلات شامل ذرت، گندم، جو بود. مایکوتوکسین‌های مورد بررسی در این غلات طبق درخواست متقاضیان، اغلب آفلاتوکسین‌ها، زرالنون، دی‌اکسی‌نیوالنول و اُکراتوکسین بود.

نتایج حاصل از بررسی میانگین آلودگی غلات به مایکوتوکسین‌های مختلف و مقایسه آن با حد استاندارد ملی ایران(۵۹۲۵)، به تفکیک فصول سال در جدول ۳،۲و۴ آمده است (آزمون one sample t-test)(Graph pad prism8). نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان می‌دهد میانگین مایکوتوکسین‌ها در غلات مختلف با بیشینه استاندارد ملی هر مایکوتوکسین دارای اختلاف معناداری است($P<۰/۰۵$).

از ۲۱۱۱ نمونه ذرت ۸/۴٪ (۶۸۹) آلودگی بیش از حدمجاز (۵ppb) درAFB1 و به ترتیب ۰/۴ (۹)، ۳/۳ (۲) و ۰/۱ (۳) نمونه‌ها آلودگی بیش از حد مجاز در AFB2، AFG1وAFG2 را نشان دادند. میزان مایکوتوکسین‌های ZEN، DON و OTA در ۱۱۳۹ نمونه ذرت کمترازحد استاندارد ملی ایران و به ترتیب کمتر از ۲۰۰ppb، ۱۰۰۰ppb و ۵۰ppb بود. از۱۶۶ نمونه گندم ۴/۲٪ (۷) و ۱/۲٪ (۲) نمونه‌ها به ترتیب با غلظتی کمتر از ۵ppb به AFB2 و AFG1 آلوده بودند. ۱۳/۸٪ (۱۶) نمونه‌ها نیز با غلظتی کمتر از ۵ppb به OTA آلوده بودند. در هیچ یک از نمونه‌های گندم آلودگی به ZEN،DON، AFB1 و AFG2 مشاهده نشد. از ۱۴۹ نمونه جو وارداتی طی بازه زمانی جمع‌آوری نمونه‌های این مطالعه، تنها میزان آفلاتوکسین‌ها مورد بررسی قرار گرفت که در هیچ یک از نمونه‌ها آلودگی بیش از حد مجاز مشاهده نشد. به منظور مقایسه میانگین سطوح مایکوتوکسین‌ها در ماه‌های مختلف سال(دی ماه ۹۴ تا آذر ماه۹۵) نیز از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید. طبق نتایج حاصل از این آزمون به جز در AFG2 ($P>۰/۰۵$)، بین میانگین دیگر مایکوتوکسین‌ها در ماه‌های مختلف سال، تفاوت معناداری وجود داشت($P<۰/۰۵$).

از میان ۵۰ نمونه برنج که میزان آفلاتوکسین‌ها در آنها بررسی شد، ۱۶ نمونه به آفلاتوکسین B1 آلوده بودند، که تنها ۱ نمونه آلودگی بیش از 5ppb نشان داد. به ترتیب ۲ و ۴ نمونه به AFB2 و AFG1 آلوده بودند، که آلودگی‌ها کمتر از ppb ۵ بود.

نتایج حاصل از بررسی میانگین آلودگی برنج به آفلاتوکسین‌ها و مقایسه آن با حد استاندارد ملی ایران در جدول ۵ آمده است (آزمون one sample t-test)..

جدول ۲. مقایسه میانگین مایکوتوکسین‌های آلوده‌کننده ذرت وارداتی با حد استاندارد ملی ایران در زمستان۹۴ و بهار۹۵

بهار۹۵				زمستان ۹۴			بیشینه		
بیشینه آلودگی (g/ng)	P-value	انحراف معیار	میانگین (g/ng)	P-value	انحراف معیار	میانگین (g/ng)	مجاز استاندارد ملی (g/ng)	مایکوتوکسین‌ها	غلات
۸۶۸/۵۷	۰/۰۰۰۷	۲۷۸/۲	۳۲۹/۹	<۰/۰۰۰۱	۶۲/۳۱	۱۰۵/۸	۱۰۰۰	DON	ذرت
۱۲۳/۷۳۱	۰/۰۰۰۳	۴/۵۸۲	۳۳/۵۸	<۰/۰۰۰۱	۱۳/۳۵	۱۳/۴۷	۲۰۰	ZEN	
–	<۰/۰۰۰۱	۰/۶۶۲۱	۰/۷۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۱۳۸۵	۰/۰۳۵	۵۰	OTA	
۱۶۹/۰۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۷۳۴	۰/۰۵	<۰/۰۰۰۱	۲/۶۶۹	۱/۱۵۱	۵	AFB1	
۲۶۶/۷۷	<۰/۰۰۰۱	۲/۲۵۳	۱/۲۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۹۷۳	۰/۸	۲۰	Total AFs	

جدول۳. مقایسه میانگین مایکوتوکسین‌های آلوده‌کننده ذرت وارداتی با حد استاندارد ملی ایران در تابستان و پاییز۹۵

پاییز ۹۵			تابستان ۹۵			بیشینه مجاز		
P-value	انحراف معیار	میانگین (g/ng)	P-value	انحراف معیار	میانگین (g/ng)	استاندارد ملی (g/ng)	مایکوتوکسین‌ها	غلات
NC	۰	۰	<۰/۰۰۰۱	۱۷۵/۶	۴۹۶/۶	۱۰۰۰	DON	ذرت
NC	۰	۰	<۰/۰۰۰۱	۳۰/۸۹	۵۴/۴۳	۲۰۰	ZEN	
<۰/۰۰۰۱	۰/۷۱	۰/۹۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۷۳	۰/۹۷	۵۰	OTA	
۰/۰۰۲۵	۱۸/۵۲	۷/۵۵۳	۰/۲۸	۱۹/۲۳	۷/۰۳	۵	AFB1	
<۰/۰۰۰۱	۲۹/۳۲	۱۱/۰۲	<۰/۰۰۰۱	۳۲/۸۶	۱۱/۹۱	۵	Total AFs	

جدول۴. مقایسه میانگین مایکوتوکسین‌های آلوده‌کننده گندم وارداتی با حد استاندارد ملی ایران در بهار۹۵

بهار۹۵				(g/ng) بیشینه		
بیشینه آلودگی (g/ng)	P-value	انحراف معیار	میانگین (g/ng)	مجاز استاندارد ملی	مایکوتوکسین‌ها	غلات
–	NC	۰	۰	۱۰۰۰	DON	گندم
–	NC	۰	۰	۲۰۰	ZEN	
۴	<۰/۰۰۰۱	۱/۰۵۳	۲/۶۷	۵	OTA	
–	NC	۰	۰	۵	AFB1	
–	۰/۰۰۱۶	۰/۰۷	۰/۲۱	۲۰	Total AFs	

جدول ۵. مقایسه میانگین آفلاتوکسین‌های آلوده‌کننده برنج تولیدی خوزستان با حد استاندارد ملی ایران

مایکوتوکسین‌ها	بیشینه مجاز استاندارد ملی (g/ng)	میانگین (g/ng)	انحراف معیار	P value	بیشینه آلودگی (g/ng)
AFB1	۵	۲/٤٥	٤/٤۲	۰/۰۳۶	۱۸/۶۱۲
Total AFs	۲۰	۲/٦۰	٤/٥۲	<۰/۰۰۰۱	-

بحث

در این مطالعه آسپرژیلوس‌های مستعد تولید توکسین از دانه‌های برنج تولیدی استان خوزستان(چمپا و عنبربو) شناسایی و جداسازی شد. نتایج درصد بالای *آسپرژیلوس فلاووس* (۴۲/۱٪) و به دنبال آن *آسپرژیلوس نیجر*، *آسپرژیلوس توبینجنسیس*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس نیدولانس* با درصدهای ۲۱/۵، ۱۵/۷، ۱۰/۵۲ و ۵/۲۶، را نشان داد.

یافته های مطالعات Nyongesa و همکاران (۲۰۱۵)، Riba و همکاران (۲۰۱۰) و Gao و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که جنس *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب آلاینده اصلی در دانه‌های روغنی(پسته، بادام، فندق)، ذرت، گندم و غلات و حبوبات است. همچنین نتایج مطالعات Makun و همکاران (۲۰۰۷)، Amadi و همکاران (۲۰۰۹) نیز با نتایج این مطالعه همسو بود (۱۳-۱۷). به دلیل ساپروفیت و گسترده بودن قارچهای توکسین‌زایی چون آسپرژیلوس، محصولاتی چون برنج و غلات از ابتدا دارای مقداری آلودگی نسبی هستند. وجود اسپور آنها و انتشار در هنگام جابجایی و نگهداری دانه‌ها و یا آلودگی محیط نگهداری به این قارچها، منجر به گسترش و توسعه آلودگی می‌گردد. همانطور که Magnussen و Parsi (۲۰۱۳) تنش خشکی را یکی از عوامل افزایش دهنده حساسیت گیاهان به آسپرژیلوس و در نتیجه آلودگی به آفلاتوکسین دانستند (۱۸)، نتایج حاصل از این مطالعه نیز این احتمال را می‌دهد که میزان این قارچها تحت شرایط با حرارت بالا و افزایش زمان نگهداری، می‌تواند افزایش یابد

بر اساس مرحله آلودگی، مایکوتوکسین‌ها به مایکوتوکسین‌های مزرعه" که عمدتا توسط گونه‌هاگونه‌های فوزاریوم تولید می‌شوند و "مایکوتوکسین های انبار " که در دوره قبل از برداشت یا بلافاصله پس از برداشت در مرحله ذخیره سازی، توسط گونه‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم تولید می شوند، تقسیم می‌شود (۱۹،۲۰). رشد قارچها و تجمع مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی و خوراک دام تحت تأثیر عوامل مختلفی است که به طور کلی رطوبت نسبی و درجه حرارت به عنوان عوامل بحرانی در دوره خشک شدن و ذخیره سازی مطرح‌اند (۲۱). یافته‌های حاصل از بررسی میزان و نوع مایکوتوکسین‌های غلات وارداتی از بندرامام خمینی (ره) که عمدتاً از کشورهای آمریکای جنوبی بودند، نشان داد که آلودگی‌ها طبق استاندارد ملی ایران، تقریباً در حد قابل قبولی قرار نداشتند و نمونه‌های ذرت بیشترین میزان آلودگی به مایکوتوکسین‌ها بخصوص آفلاتوکسین‌ها را نشان دادند. یافته‌های مطالعه Mazaheri و همکاران (۲۰۱۸) نیز تاییدکرد که ذرت بیشترین حساسیت به مایکوتوکسین‌ها بخصوص آفلاتوکسین‌ها دارد. در مطالعه Amanloo و همکاران (۲۰۱۴) بر روی آلودگی برنج وارداتی و نیز Farahmandfar و همکاران (۲۰۱۸) بر روی گندم وارداتی یا آلودگی به OTA، ZEN، DON و آفلاتوکسین‌ها یافت نشد یا در حد مجاز بود (۲۲-۲۴).

یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که حداکثر غلظت مایکوتوکسین‌ها مربوط به ماه‌های شهریور و آبان است. این نتایج تأثیر مدت زمان نگهداری محموله‌های غلات در کشتی‌های وارداتی و یا مدت زمان انبارداری آنها را نشان می‌دهد که نتایج مطالعه Najafian و همکاران (۲۰۱۴) آن را تایید می‌کند (۲۵). زمانی که غلات، ماه‌های گرم تابستان، که رطوبت و دما بالاست را سپری کنند، قطعاً قارچهای موجود در آنها این فرصت را پیدا کرده که رشد کنند و تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها صورت گیرد. Ranjbar و همکاران (۱۳۸۹) در یک مطالعه نشان دادند که میزان قارچهای آسپرژیلوس و آفلاتوکسین در فصل بهار و تابستان پایین می‌آید و در فصول پاییز و زمستان به دلیل استفاده از خوارک دام انبار شده و عدم رعایت شرایط نگهداری مناسب در انبارها، میزان آلودگی شیر به آفلاتوکسین M1 افزایش می‌یابد. آنها چنین بیان داشتند که انبارداری نامناسب،علاوه بر آلودگی خوراک دام به آسپرژیلوس و متعاقب آن تولید آفلاتوکسین، باعث انتقال آن به شیرهای بسته بندی نیز می‌شود (۲۶).

Cano-Sancho و همکاران (۲۰۱۳) نیز چنین بیان کردند که حضور مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی بستگی به بسیاری از شرایط از جمله فصل، آب و هوا (درجه حرارت، رطوبت)، منطقه مورد نظر، روش برداشت، ذخیره‌سازی و پردازش دارد (۲۷). Lahouar و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعهٔ تأثیر درجه حرارت و زمان انکوباسیون بر روی میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید AFB1 روی دانه‌های سورگوم، چنین گزارش کردند که جدایهٔ فلاووس از سورگوم‌های تانزانیا توانایی رشد در گسترهٔ وسیعی از دما(۳۷-۱۵ درجه سلسیوس) را دارد با این حال تولید آفلاتوکسین در محدودهٔ کمتری از دما (۳۷- ۲۵ درجه سلسیوس) رخ می‌دهد (۲۸) ونیز Ghali و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که بیشترین تولید آفلاتوکسین در ۲۴ درجه سلسیوس رخ داده اما بیشترین رشد سویهٔ *فلاووس* در ۳۵- درجه سلسیوس۲۹ وجود داشته است (۱۹). در این مطالعه نیز حضور آسپرژیلوس‌ها دال بر وجود آفلاتوکسین‌ها و بلاعکس وجود آفلاتوکسین‌ها دلیل بر وجود آسپرژیلوس‌ها نبود. نقطه ضعف این مقاله این بود که انتخاب نمونه‌های برنج با روش در دسترس انجام شده‌است. هر چند مشخص گردید که نمونه‌های انتخابی تمام نقاط استان را پوشش داده‌است اما پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی از روش چهارچوب مند برای انتخاب نمونه‌ها استفاده گردد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به حضور گستردهٔ مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی و مضرات آن، بویژه AFB1 که یکی از آلاینده‌های محصولات غذایی است، کنترل آلودگی AFB1 در موادغذایی نیاز به نظارت و کنترل دارد که آن شامل؛ نظارت بر مواد خام و عرضه موادغذایی، نظارت در طول فرآوری موادغذایی، نظارت بر محصولات نهایی و نیز درهنگام ذخیره سازی است. با توجه به اهمیت غلات در رژیم غذایی جامعه ایران و نتایج این مطالعه که نشان از پتانسیل و حساسیت بالای ذرت به مایکوتوکسین‌ها است، برنامه‌ریزی جامع برای ایجاد سیستم عملیاتی مناسب به‌منظور کاهش آلودگی قارچی و اقدامات کنترل کیفی روی غلات وارداتی ضروری است. همچنین بهره گیری از سیستم های GMP و HACCP بعد و قبل از برداشت سبب کاهش مایکوتوکسین‌ها و عرضهٔ غذای سالم به مصرف کننده خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله بر خود لازم می داند که از معاون پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی خوزستان و نیز مدیریت شرکت پرهام جنوب که در این مطالعه با ما همکاری نمودند کمال تشکر و قدرانی را به عمل آورد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Pleadin J, Vulic A, Persi N, Skrivanko M, Capek B, Cvetni Z. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. Food Control. 2014; 40: 286-291 [DOI:10.1016/j.foodcont.2013.12.022]
2. Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R. and Visconti, A.(Eds.). Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade. 2008;CABI [DOI:10.1079/9781845930820.0000]
3. Alberts, J. F., Lilly, M., Rheeder, J. P., Burger, H. M., Shephard, G. S. and Gelderblom, W. C. A. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. Food Control. 2017; 73: 101-109 [DOI:10.1016/j.foodcont.2016.05.029]
4. Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablotowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A. and Weaver, M. A. Ecology of Aspergillus flavus, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. Toxin Reviews. 2009; 28(2-3): 142-153. [DOI:10.1080/15569540903081590]
5. Magnussen A, Parsi M.A. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. World J Gastroenterol. 2013; 19(10): 1508. [DOI:10.3748/wjg.v19.i10.1508] [PMID] [PMCID]
6. Jinap S, De Rijk TC, Arzandeh S, Kleijnen HC, Zomer P, Van der Weg G, Mol JG. Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods. Food Control. 2012; 26(1): 42-48. [DOI:10.1016/j.foodcont.2011.12.007]
7. Pitt, J. I.: Hocking, A. D. Fungi and food spoilage. New York: Springer; 2009; 519. P. 275-33. [DOI:10.1007/978-0-387-92207-2_8]
8. Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. and Varga, J. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus

Aspergillus. Studies in Mycology. 2014; 78: 141-173. [DOI:10.1016/j.simyco.2014.07.004] [PMID] [PMCID]

9. Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken JA, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Studies in mycology. 2007;59:129-45. [DOI:10.3114/sim.2007.59.13] [PMID] [PMCID]
10. Gupta VK (Ed). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Aspergillus system properties and applications. Elsevier; 2016.
11. Mehrabi-Koushki, M. Bavarsad, M., Farrokhinejad, R., Jamshidi, J. and Alimohammadi, A. The comparison of ITS-rDNA and tef1α genomic regions for phylogenetic study of some Trichoderma Species. Iranian Journal of Plant Protection Science.2016; 47, 61-70. [In Persian]
12. Raeder U. and Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology. 1985;1: 17-20. [DOI:10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x]
13. Nyongesa, B. W., Okoth, S. and Ayugi, V. Identification Key for Aspergillus Species Isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya. Advances in Microbiology. 2015; 5(04): 205-229 [DOI:10.4236/aim.2015.54020]
14. Riba A, Bouras N, Mokrane S, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. Food and Chemical Toxicology. 2010; 48(10): 2772-2777 [DOI:10.1016/j.fct.2010.07.005] [PMID]
15. Gao, J., Liu, Z. and Yu, J. Identification of Aspergillus section Flavi in maize in northeastern China. Mycopathologia. 2007;164(2): 91-95. [DOI:10.1007/s11046-007-9029-4] [PMID]
16. Makun, H. A., Gbodi, T. A., Akanya, O. H., Salako, E. A. and Ogbadu, G. H. Fungi and some mycotoxins contaminating rice (Oryza sativa) in Niger state, Nigeria. African Journal of Biotechnology. (2007);6(2):99-108
17. Amadi, J. E. and Adeniyi, D. O. Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. African Journal of Biotechnology. 2009; 8(7):1219-1221
18. Magnussen A, Parsi M.A. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. World J Gastroenterol. 2013; 19(10): 1508. [DOI:10.3748/wjg.v19.i10.1508] [PMID] [PMCID]
19. Hassan ZU, Al-Thani RF, Migheli Q, Jaoua S. Detection of toxigenic mycobiota and mycotoxins in cereal feed market. Food Control. 2018; 84: 389-394. [DOI:10.1016/j.foodcont.2017.08.032]
20. 20- Reiter E.V, Vouk F, Bohm J, Razzazi-Fazeli E. Aflatoxins in rice - A limited survey of products marketed in Austria. Food Control. 2010; 21(7): 988-991. [DOI:10.1016/j.foodcont.2009.12.014]
21. Ghali, R., Khlifa, K. H., Ghorbel, H., Maaroufi, K. and Hedilli, A. Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. J Sci Food Agric. 2010; 90(14): 2347-2351. [DOI:10.1002/jsfa.4069] [PMID]
22. Mazaheri M, MahmoudiMaymand M. Investigation of Aflatoxins in Imported Animal Feeds in Iran. Iranian Journal of Toxicology. 2018;12(6):33-8.
23. Amanloo S, Rezaei Kahhka MR, Ramezani AA, Mir L (2014) .The Mycotoxin contamination of the imported consumer rice and its producing fungi in Zabol . Journal of Jahrom University of Medical Sciences. 12(1): 17-25. [In Persian] [DOI:10.29252/jmj.12.1.17]
24. Farahmandfar R, Rashidaei Abandansari S, Maghsoudlou E, Asnaashari M. Determination of mycotoxin contamination in imported wheat to Mazandaran province by high performance liquid chromatography. Iranian Journal of Health and Environment. 2018;11(1):15-24.
25. Najafian M. Comparison the level of Aflatoxin in different varieties of internal and imported rice in different collection seasons and effect of cooking methods on the level of toxins. 2014; 6(4): 328-336. [In Persian]
26. Ranjbar S, Noori M, Nazari R. Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province. J Cell Tissue. 2010; 1(1): 9-18. [In Persian]
27. Cano-Sancho G, Sanchis V, Marin S, Ramos A.J. Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). Food and Chemical Toxicology. 2013; 51: 188-193. [DOI:10.1016/j.fct.2012.09.032] [PMID]
28. Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S. and Sanchis, V. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic Aspergillus flavus isolates on sorghum seeds. Revista Argentina de Microbiología. 2016; 48(1): 78-85. [DOI:10.1016/j.ram.2015.10.001] [PMID]