مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۹ ، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۳۰- ۲۰

بررسی مقایسه ای ویژگیهای الگوی تولید آفلاتوکسین B1 در محیط رشد جدایه های آسپرژیلوسی زیرجنس سیرکومداتی شمال ایران

المیرا فرخی[۱]،دکتر آرش چایچی[۲]،دکتر سیدحامد شیرازی بهشتی ها[۳]،دکتر معصومه انوری[۴]

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی-دانشکده ی علوم پایه ی دانشگاه آزاد لاهیجان Elfar_64@yahoo.com
دکتر آرش چایچی: PHDمایکولوژی-دانشکده ی علوم پایه ی دانشگاه آزاد لاهیجان Achn_mycomune@yahoo.com
دکتر سیدحامد شیرازی بهشتی ها:PHD کلینیکال پاتولوژی-دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه آزاد کرج
دکتر معصومه انوری:PHD میکروبیولوژی-دانشگاه آزاد رشت

چکیده

طرح مسئله:آسپرژیلوسها از جمله مهمترین قارچهای توکسین زاست که در زیستگاه شمال ایران ،به وفور یافت میشود. آفلاتوکسین B1 خطرناکترین شکل آفلاتوکسین است که در دراز مدت باعث سرطان کبد می شود.لذا بر آن شدیم تا با تعیین الگوی آفلاتوکسین زایی و تعیین الگوی مقایسه ی اندازه توکسین زایی در آسپرژیلوسهای شمال ایران بپردازیم.

روش: نمونه ها از مراکز کشت و فرآوری شمال البرز وجنوب دریای خزر جمع آوری شده و سپس در بسترهای ویژه ای ایزوله وشناسایی شدند که زیرگونه های ***Wentii,Flavi,Nigri, Circumdati Candidi*** ویک سری گونه های ناشناخته ی بدست آمده برای انگیزش توکسین زایی و اندازه گیری به بسترهای دیگر کشت داده شدند.سپس از آنها عصاره تهیه شد و اندازه ی آفلاتوکسین عصاره ی وارد شده به محیط کشت به روش الایزا سنجیده شد.بعد میزان سم وارد شده به محیط کشت آنالیز شد و با نتایج سم در بیومس مقایسه شد.

یافته ها:از الایزای۵۳ نمونه میزان آفلاتوکسین اندازه گیری شده:۴۷.۲٪در۱۰-۰ ppb ،۳۰.۲٪ در ppb ۲۰-۱۰، ۲۰.۸٪ در ppb ۳۰-۲۰، ۱.۹٪ درppb ۴۰-۳۰ می باشد. از این مقدار نمونه ۴۱.۵٪ (۲۲ مورد) از هوای کشتزارها و ۵۸.۵٪(۳۱ مورد) از هوای کارخانجات چای جداسازی شده اند.بیشترین نمونه ها بین کشتزارها و کارخانجات مربوط به شرق گیلان می باشد.ولی در مجموع بیشترین نمونه ها از کارخانجات شرق گیلان و کلا بیشترین تعداد نمونه ها نیز از بخش فلاوی بدست آمده اند.در تقسیم بندی گونه ای نیز بیشترین تعداد گونه ها بعداز گونه های ناشناخته مربوط به گونه ی فلاووس است.بین میزان سم بر حسب بخش وگونه اختلاف معناداری وجود دارد.

نتیجه گیری:باتوجه به اینکه بیشتر نمونه ها(چه در بیومس و چه در محیط کشت)از کشتزارها و کارخانجات شرق گیلان بدست آمده اند این مناطق از نظر ابتلا به آفلاتوکسین *High Risk* هستند.

کلمات کلیدی:آسپرژیلوس،آفلاتوکسین،*Flavi-Circumdati*

مقدمه:

بر اساس برخی تخمینهای رسمی مراکز معتبر جهانی (*OHO,WHO,FAO*) سالانه بیش از ۲۵ درصد کل محصولات دانه ای تولیدی جهان در معرض آلودگی قارچی قرار دارند.(۱) عموما اعتقاد بر این است که برخی از انواع گونه ها یا گروه گونه های قارچ آسپرژیلوس تنها در شرایط مناسب شناخته شده قادر به تولید آفلاتوکسین ها در این مجصولات هستند.(۲و۳و٤) از این میان گونه های قارچی ،آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس مهمترین تولیدکنندگان این سموم به شمار می روند. آفلاتوکسینها ترکیبات شیمیایی خاصی هستند که طی یک سری واکنشهای متوالی آنزیمی توسط تعدادی از گونه های قارچهای آسپرژیلوس و پنی سیلیوم هنگام رشد و نمو در شرایط مناسب روی بسیاری از مواد مختلف تولید می شوند(۲و۳و۵و٦) تاکنون ۱۸ نوع مختلف از انواع آفلاتوکسینها شناسایی شده اند ولی فقط آفلاتوکسینهای نوع B1,B2,G1,G2 بعنوان آلوده کنندگان غذا و منابع غذایی مورد شناسایی قرار گرفته اند که در میان آنها آفلاتوکسین B1دارای بالاترین میزان سمیت می باشد(۳و۷). این سموم منجر به تضعیف سیستم ایمنی خونی و ایمنی با واسطه ی سلولی انسانها می شود و آنها را نسبت به سایر عفونتها حساستر می کنند.(٤و۸)این سموم تغییرات بافتی در محیط ایجاد کرده که این تغییرات بیشتر در کبد عارض می شود و منجر به اختلالات کبدی ،سیروز و بالاخره سرطان کبد می گردد.(۷)آفلاتوکسیکوز باعث کاهش رشد،کاهش تولید،افزایش کلسیفیکاسیون استخوانها،افزایش زمان انعقاد خون و نیز اثرات سرطان زایی می شود.(۷). آفلاتوکسیکوز در انسان بطور مستقیم از راه خوردن غذاهای آلوده به سم و غیر مستقیم از طریق فرآورده های دامی آلوده مانند شیر،گوشت و تخم مرغ و محصولات تولیدی از غلات ایجاد می شود.(۹) در سال ۲۰۰٤ آفلاتوکسیکوز شدید ناشی از خوردن شیر و غذاهای آلوده به آفلاتوکسین منجر به مرگ ۱۲۵ نفر در کنیا شد(۱۰و۱۱).

مواد و روشها:از نخستین روزهای اردیبهشت ماه تا روزهای پایانی مهرماه در استانهای گیلان و مازندران با پیروی از دستور کار نمونه برداری از جایگاههای بسته و باز (بنگاه CBS) نمونه برداری انجام گردید.از آن روز که گمانی بسامان و داده هایی پذیرفتنی از پژوهشهای گذشته در گستره پژوهش و یا الگوهایی از بررسی های همانندسازی در دیگر کشورها ،در دسترس نبود تا چگونگی و اندازه ی گونه ها و گروههای قارچی هوازاد در جایگاههای نمونه برداری شناخته شده باشند. از هر ۵۰ هکتار مربع کشتزار (۱۱۰ کشتزار) و نیز از هر کارخانه ی فراوری (٦۰ کارخانه) یک " گروه" نمونه برداشت شد. ۳ تا ۵ روز پس از هر بارندگی در ساعت ۱۵-۹ در هوای آفتابی با دمای ۳±۲۵ درجه ی سانتیگراد و انگاه که گردش هوا دریافت نشود (اندازه ی باد کمتر از ۳۰ متر بر ثانیه) با گذاردن پلیت های درباز در بلندای ۱۱۰-۹۰ سانتیمتر از کف هر جایگاه نمونه برداری انجام پذیرفت. شش پلیت دارای مالت اکستراکت آگار ،یست اکستراکت آگار ، چاپک یست اکستراکت آگار ،سابورودکستروز آگار و پوتیتو دکستروزآگار همگی آمیخته باppm ۱۰۰ کلرامفنیلکل وppm ۵۰ تتراسایکلین که پیش از بهره برداری ۳ تا ۵ روز در ۲۵ درجه سانتیگراد آزموده شده بودند. برای برداشت یک " گروه نمونه " به کار برده شدند.پلیت های دارای ۲۵-۱۵ سانتیمتر مکعب از آگار (۱۲-۱۰ سانتیمتر قطر) پس از ۳۰،٦۰و ۹۰ دقیقه (٤۵۱ پلیت بازمانده در کشتزارها) و ۱۵ ،۳۰ و ٦۰ دقیقه (٤٤۱ پلیت بازمانده در کارخانه ها)برداشته شده ، پس از درگذاری و نشان گذاری ،درون

کیسه های پلی اتیلنی سوراخدار جای داده و به آزمایشگاه فرستاده شدند.همه ی پلیتها در دمای ۲±۲۵ درجه ی سانتیگراد و هوازی گرمخانه گذاری شدند آن گونه که یک پلیت از هر بستر کشت در تاریکی ،دیگری در روشنایی و یک جفت در دوره ی نور – تاریکی نگهداری شوند و دو پلیت بازمانده برای هر جایگزینی در یخچال (۸-٤ سانتیگراد) نگهداری گردیدند.تا ۱۵ روز در بازه های ۳،۷،۱۵ روز همواره (و نیز روزانه) همه ی پلیتها وارسی گردیدند تا همه ی پرگنه های نورسته که به چشم آمده یا با کمک استریوسکوپ دیده شدنی بودند،شناسایی و نشانه گذاری و با سوزن شیشه ای استریل برداشت و در پلیتهای از پیش آماده شده کشت گردند.در پلیتها و لوله های دارای آگار اسلنت بات از بسترهای رشد مالت اکستراکت آگار،یست اکستراکت آگار ،پوتیتودکستروز آگار ،کورن میل آگار، سابورو دکستروز آگار ،چاپک یست آگار و چاپک دوکس آگار همه نمونه های کپکی نویافته باز کشت شدند و با برنامه پیشین گرمخانه گذاری و هرگونه ویژگی های ماکرو و میکروسکوپی در بازه های ۵،۱۰،۱۵ روز پیگیری و یادداشت گردید.پلیتها و لوله هایی که هر گونه آلودگی ناگزیر داشته و یا گمان به آلودگی پنهان و نابسمانی ناهنجار در آنها می رفت و نیز پلیتهای که شمار پرگنه های رشد یافته در آنها بسیار بوده و دچار در هم رفتگی کپک ها بودند از روند کشت ها و بررسی بیرون شدند چنانکه شد جایگزین گردیدند. تا ۲۵ روز همه ی پلیتهای ماندگار و بهنجار همچنان بررسی و سنجیده و جداسازی و باز کشت کپکها چنانکه شد، انجام و یافته های نوین یادداشت گردید.سرانجام ٥٦٣ پلیت با پرگنه یگانه از کشتزارها و ۷٤۳ پلیت با پرگنه یگانه از کارخانه ها تا پایان بررسی های پرگنه های کپکی بازکشت شده دارای دیواره ی میانی ریسه ها به دست آمدند که بی هر گونه آلودگی یا آغشتگی بودند.در پایان از ۳۰۰ پرگنه آسپرژیلوسی (از ٦۰۰ جدایه کپکی زایا) شمار ۱۵۰ پرگنه برگزیده در پلیتها ی دارای چاپک دوکس آگار ، چاپک یست اکستراکت آگار (با و بدون ۲۰ درصد سوکروز) ، مالت اکستراکت آگار و چاپک دوکس آگار (با و بدون ۲۰ درصد سوکروز) برای بررسی های ریخت شناسی ماکرو و میکروسکوپی کشت گردیده ، در دمای ۲±۲۵ رشد داده شده و پس از ۳و۷ یا ١٤ و ۲۵ و گاه ۳۰ روز بررسی و همزمان اسلاید کالچر از هر نمونه بر بسترهای چاپک دوکس آگار و چاپک یست اکستراکت ۲۰٪ سوکروز برای هنجاری رشد با الگوی پیشین فراهم گشته و گرمخانه گذاری در $\dot{C}$ ۳۷ انجام گردید.

بررسی های ریخت شناسی:

برای بررسی های ریخت شناسی و عکسبرداری ماکرو و میکروسکوپی رویه و پشت پرگنه های یک هفته ای تا دو هفته ای (در آسپرژیلوس های سیاه پرگنه های دو تا چهار هفته ای) برگزیده شدند. اندازه گیری پهنای پرگنه بررسی رنگ رو و پشت پرگنه ،رنگدانه ها ،اکسترولیتها و عکسبرداری از چترها ، یاخته ها و توده های رشد یافته ، ریسه ها ، استیپ ها ، تاج کونیدی ها و میکرومتری کونیدیوفورها ، وزیکولهای کونیدیها و نیز بررسی پیدایش و میکرومتری سختینه ها یا آسکها با استریوسکوپ انجام گردید. در همه ی نمونه ها با کمک لامهای اسلاید کالچر ،تیزمان و استیکی تیپ از کونیدیوفورها (استیپ وزیکول ، تاج کونیدی ها، فیالیدها ، متولاها ، کونیدی ها و یا آسکها و آذین همگی آنها ، میکرومتری یا عکسبرداری با کمک میکروسکوپ میکروآنالایزر (Leica ®) انجام گردید.

فراهم سازی آنتی ژن یاخته ای :برای فراهم سازی آنتی ژن از جدایه های فراهم آمده شگرد کشت در بستر مایع برای آماده سازی و انگیزش هر چه بیشتر و

فراوان تر آنتی ژنها برگزیده شد. یک لوب فول دارای ۱۰ فیالوسپور از آمیزه PBS و کونیدی های هر جدایه رشد یافته در پلیت چاپک اکستراکت آگار برداشت گردیده و به یک لوله فالکن ۵۰ میلی لیتری دارای بستر مایع چاپک دوکس براث دارای یک درصد مالت اکستراکت آگار بازکشت شد.لوله های بازکشت شده با ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳±۲۵ درجه ی سانتیگراد و در دوره ی نور تاریکی – گرمخانه گذاری شدند و روزانه بازرسی گردیدند تا از پیدایش هر گونه تشک کپکی بر روی مایع بازداری شود و در روز سوم به اندازه ای که بستر مایع همواره ۵۰ میلی لیتر باشد، بستر مایع به همراه یک درصد مالت اکستراکت آگار بازمانده به لوله ها افزوده شد.پس از ۷ روز توده ی شناور یا ته نشین در مایع که همان رشته های نوزاده و کوچک (*Germ tube*) قارچی کپکی بوده اند با کمک سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه تا ۱۵ دقیقه ته نشین و برداشت شدند.توده ی کپک رشته ای برداشت شده ۳ بار پیاپی با ۲۵ میلی لیتر PBS با کمک سانتریفیوژ (۳۰۰۰دورتا ۱۵ دقیقه) شستشو و نگهداری شدند.پس از یخ زدایی نمونه ی رشته های کپکی خیس در یخدان ، یخچال ۸-٤ و گرمخانه ۷۳ درجه ی سانتیگراد در ٦ ساعت هر توده تا ۸٤ ساغت در دسیکاتور خشک و سپس ۲ گرم از آن برداشت گردید. توده ی هر رشته ی کپکی خشک در یک لوله ی فالکن ۱۵میلی لیتری ۳ با و هر بار ۳ بار پیاپی (هر ۷ دقیقه) با ۵ میلی لیتر نیتروژن مایع آمیخته و با کمک دستگاه هم زن لوله و گویچه های شیشه ای (پرل) خرد و در هر بار ۲۵ دقیقه خردسازی توده انجام شد. پس از آنکه ۷۰-(٦۰)-۵۰ درصد خردشدگی رشته ها در میدان میکروسکوپی لام نیوبار فراهم آمده در یک لوپ فول از آمیزه ی گرد کپکی در PBS دیده می شد به هر لوله فالکن ۵ میلی لیتر از بافر نمونه گیری و ۱ میلی لیتر استن سرد افزوده و با کمک سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ تا ۱۵ دقیقه سرمانده از ته نشین درشت تر جداسازی و در لوله ی دیگری پس از نشان گذاری در سرمای ۲۰- درجه ی سانتیگراد نگهداری گردیدند. برای هماهنگ سازی اندازه ی پروتئین هر آمیزه به دست آمده از هر جدایه آسپرژیلوسی با روش برادفورد اندازه گیری انجام و نمونه های غلیظ تا اندازه ی ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر رقیق شدند. نمونه های رقیق شده با کمک ۵ برابر استن سرد و یک برابر نمونه در سرمای ۲۰- درجه ی سانتیگراد ۱ تا ۳ روز نگهداری و سپس در دور ۲۰۰۰۰ تا ۲۰دقیقه در سرمای ۲۰- درجه ی سانمتیگراد سانتریفیوژ شدند.ته نشست برداشت انجام شده و در نمونه های غلیظ ، رقیق سازی و در نمونه های رقیق ، غلیظ سازی به همین روش انجام گردید تا همه ی افشره های نمونه های آنتی ژنی دارای ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین باشند.

نتایجدر این پژوهش از نمونه های بدست آمده از کشتزارها و کارگاههای فرآوری شمال ایران (گیلان و مازندران) عصاره ی سلولی خام تهیه شد و آفلاتوکسین تولید شده در عصاره های مزبور با استفاده از روش الایزای رقابتی مستقیم و با استفاده از کیت *AgraQuant* مورد سنجش قرار گرفتند.

بررسی های آماری نتایج حاصل شده از آنالیزها:در این پژوهش حجم نمونه ۵۳ مورد انتخاب شده که یک نوع سم در دو مکان (هوای کشتزارها و کارخانه های فراوری) و در ۳ منطقه ی شمالی ایران (مازندران،شرق گیلان و غرب گیلان) صورت گرفته است.از این مقدار نمونه ٤۱.۵٪ (۲۲ مورد) از هوای کشتزارها و ۵۸.۵٪(۳۱ مورد) جداسازی شده اند.۷۷.٤٪ (٤۱ عدد) مربوط به بخش سیرکومداتی و ۲۲.٦٪ (۱۲ عدد) مربوط به جدایه های ناشناخته (*Aspergillus spIII*) *Aspergillus*

Aspergillus spIV/spV / *Aspergillus spI* / *Aspergillus af nidulans*) هستند.

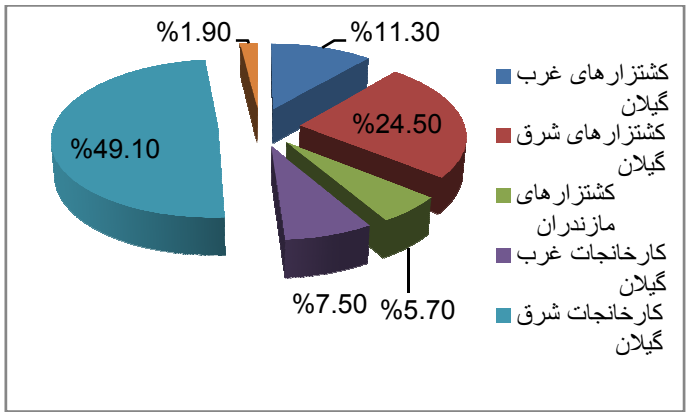
جدول۳-٤. جدول متقاطع بین تعداد نمونه ها و محدوده ی مقدار توکسین

محدوده ی تولید توکسین / کیت		کمتر از ۰ (ppb)	بین ۰ تا ۱۰ (ppb)	بین ۱۰ تا ۲۰ (ppb)	بین ۲۰ تا ۳۰ (ppb)	بین ۳۰تا ٤۰ (ppb)	بین ٤۰تا ۵۰ (ppb)	جمع کل
کیت AgraQuent	تعداد نمونه ها	۰	۲۵	۱٦	۱۱	۱	۰	۵۳
	درصد کل	٪۰.۰۰	٪٤۷.۲	٪۳۰.۲	٪۲۰.۸	٪۱.۹	٪۰.۰۰	٪۱۰۰

بیشترین نمونه ها بین کشتزارها مربوط به شرق گیلان و در مورد کارخانجات هم مربوط به شرق گیلان می باشد.ولی در مجموع بیشترین نمونه ها از کارخانجات شرق گیلان بدست آمده اند.(جدول۳-۵ونمودار۳-٤)

جدول ۳-۵. جدول متقاطع بین تعداد نمونه ها و مکانهای جغرافیایی

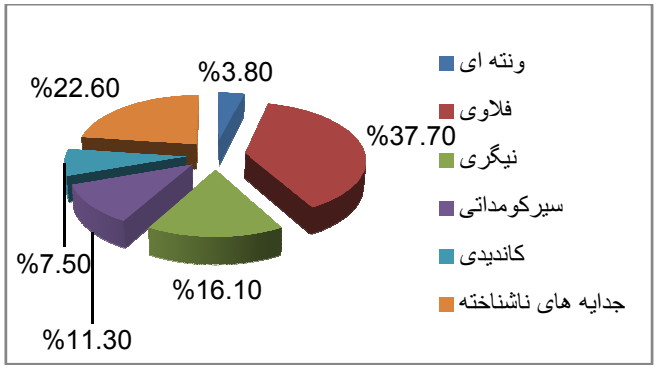
مکانهای جغرافیایی / کیت		کشتزارهای غرب گیلان	کشتزارهای شرق گیلان	کشتزارهای مازندران	کارخانجات غرب گیلان	کارخانجات شرق گیلان	کارخانجات مازندران	جمع کل
کیت AgraQuant	تعداد نمونه ها	٦	۱۳	۳	٤	۲٦	۱	۵۳
	درصد کل	٪۱۱.۳	٪۲٤.۵	٪۵.۷	٪۷.۵	٪٤۹.۱	٪۱.۹	٪۱۰۰



نمودار ۳-٤. نمودار ترکیبی بین تعداد نمونه ها و مکانهای جغرافیایی

جدول ۳-۷. جدول متقاطع بین تعداد نمونه ها و بخشهای زیرجنسهای مورد بررسی

بخشهای زیرجنسها / کیت		بخش ونتی ای	بخش فلاوی	بخش نیگری	بخش سیرکومداتی	بخش کاندیدی	جدایه های ناشناخته	جمع کل
کیت AgraQuent	تعداد نمونه ها	۲	۲۰	۹	٦	٤	۱۲	٥۳
	درصد کل	٪۳.۸	٪۳۷.۷	٪۱٦.۱	٪۱۱.۳	٪۷.٥	٪۲۲.٦	٪۱۰۰

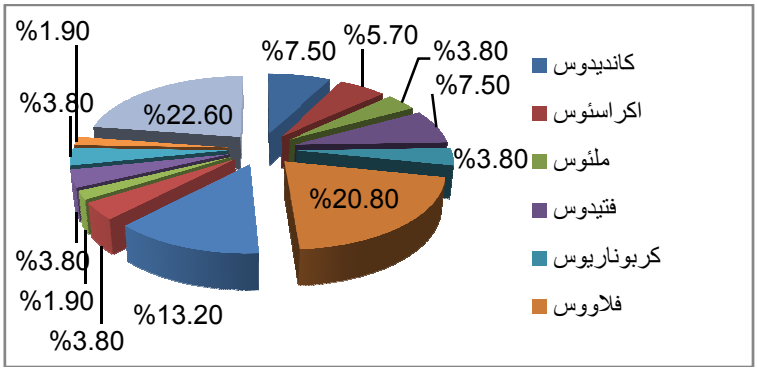


نمودار ۳-٦ . نمودار ترکیبی تعداد نمونه ها و بخشهای زیرجنسهای مورد بررسی

از کل نمونه ها بیشترین درصد گونه ای پس از جدایه های ناشناخته مربوط به اسپرژیلوس فلاووس است.(جدول...)

جدول۳-۸. جدول متقاطع بین تعداد نمونه ها و گونه های مختلف

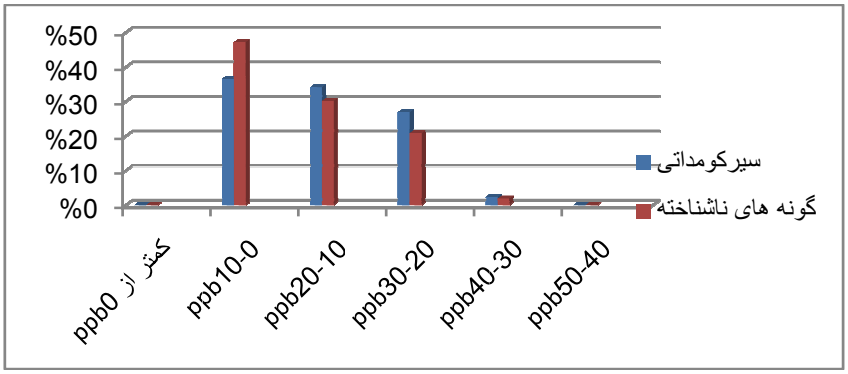
گونه / کیت		کیت AgraQuent
آسپرژیلوس کاندیدوس	تعداد نمونه ها	٤
	درصد کل	٪۷.۵
آسپرژیلوس اکراسئوس	تعداد نمونه ها	۳
	درصد کل	٪۵.۷
آسپرژیلوس ملئوس	تعداد نمونه ها	۲
	درصد کل	٪۳.۸
آسپرژیلوس فتیدوس	تعداد نمونه ها	٤
	درصد کل	٪۷.۵
آسپرژیلوس کربوناریوس	تعداد نمونه ها	۲
	درصد کل	٪۳.۸
آسپرژیلوس فلاووس	تعداد نمونه ها	۱۱
	درصد کل	٪۲۰.۸
آسپرژیلوس سوژه	تعداد نمونه ها	۷
	درصد کل	٪۱۳.۲۰
آسپرژیلوس نایجر	تعداد نمونه ها	۲
	درصد کل	٪۳.۸
آسپرژیلوس آواموری	تعداد نمونه ها	۱
	درصد کل	٪۱.۹
آسپرژیلوس پارازیتیکوس	تعداد نمونه ها	۲
	درصد کل	٪۳.۸
آسپرژیلوس ونتی ای	تعداد نمونه ها	۲
	درصد کل	٪۳.۸
آسپرژیلوس اوستیانوس	تعداد نمونه ها	۱
	درصد کل	٪۱.۹
جدایه های ناشناخته	تعداد نمونه ها	۱۲
	درصد کل	٪۲۲.٦
جمع کل	تعداد نمونه ها	۵۳
	درصد کل	٪۱۰۰



نمودار ۳-۷. نمودار ترکیبی بین تعداد نمونه ها و گونه های مختلف زیرجنس سیرکومداتی در همه ی محدوده ها بیشتر از زیرجنس ناشناخته توکسین تولید کرده است.

جدول۳-۱۰. جدول متقاطع بین محدوده ی تولید توکسین و زیرجنسهای سیرکومداتی و گونه های ناشناخته

محدوده ی تولید توکسین / زیرجنس		کمتر از ۰ ppb	۰-۱۰ ppb	۱۰-۲۰ ppb	۲۰-۳۰ ppb	۳۰-۴۰ ppb	۴۰-۵۰ ppb	جمع کل
زیرجنس سیرکومداتی	تعداد نمونه ها	۰	۱۵	۱۴	۱۱	۱	۰	۴۱
	درصد کل	٪۰	٪۳۶.۶	٪۳۴.۱	٪۲۶.۹	٪۲.۴	٪۰	٪۱۰۰
گونه های ناشناخته	تعداد نمونه ها	۰	۱۰	۲	۰	۰	۰	۱۲
	درصد کل	٪۰	٪۷۶.۹	٪۱۵.۴	٪۰	۰٪	٪۰	٪۱۰۰
جمع کل	تعداد نمونه ها	۰	۲۵	۱۶	۱۱	۱	۰	۵۳
	درصد کل	٪۰	٪۴۷.۲	٪۳۰.۲	٪۲۰.۸	٪۱.۹	٪۰	٪۱۰۰



نمودار ۳-۹.نمودار ترکیبی بین محدوده ی تولید توکسین و زیرجنسها

بحث

در بین ایزوله های جداسازی شده، اکثر ایزوله ها مربوط به بخش فلاوی بودند. و گونه ی آسپژیلوس فلاووس پس از جدایه های ناشناخته بیشترین درصد را در بین ایزوله ها به خود اختصاص داده اند.بعد از آن آسپرژیلوس سوژه بمیزان بیشتری در نمونه ها یافت شدند. و این نشاندهنده ی این است که شاید این بخشها و گونه ها نسبت به دیگر بخشها و گونه ها نقش بیشتری در تولید سم در محیط کشت داشته باشند.(جدول ۳-۸ و ۳-۷)بیشترین میزان تولید سم طبق نتایج جدول ۳-۱ مربوط به آسپرژیلوس کاندیدوس (۳۱.۸۱۰ppb) می باشد و کمترین میزان نیز پس از آسپرژیلوس فلاووس (۳.٦٦٨ppb)مربوط بهAspergillus spIII می باشد.با مقایسه ی نتایج مهدیکار(۱۳۸۹) که میزان سم این گونه ها و بخشها را در بیومس بررسی کردند این نتیجه گرفته می شود که میزان سم بخش فلاوی هم در محیط کشت مانند بیومس از سایرین بیشتر است و در میان گونه ها پس از جدایه های ناشناخته گونه ی فلاووس بیشترین سهم را در میزان سم ورودی به محیط کشت دارند که تقریبا با نتایج بیومس مطابقت دارد.(۱۲) هم چنین بیشترین میزان تولید سم مربوط به آسپرژیلوس ونتی ای (۲۵.۳۲۸ppb) و کمترین میزان نیزمربوط به آسپرژیلوس اوستیانوس (۰.٤٥١ ppb) می باشد.(۱۲)توزیع نمونه ها در ۲ مکان کشتزار و کارخانه تقریباً برابر می باشند. در بین کشتزارها،از کشتزارهای شرق گیلان و از کارخانجات، کارخانجات شرق گیلان گونه های بیشتری جداسازی شدند. البته بیشتر نمونه ها از کارخانجات شرق گیلان بدست آمده اند و این نشاندهنده ی این است که خطر تولید سم توسط آسپرژیلوس های منتشر در مناطق تحت بررسی بسیار بالا می باشد. (جدول۳-٦)در حالیکه مهدیکار(۱۳۸۹) هم همین نتیجه را بدست آوردند.(۱۲)بیشتر ایزوله ها در محدوده ی ۱۰-۰ppb تولید توکسین کرده اند و تعداد ایزوله های جداسازی شده به ترتیب از کارخانجات شرق گیلان و کشتزارهای شرق گیلان که در این محدوده تولید توکسین کرده اند از سایر مناطق بیشتر است و آسپرژیلوس فلاووس پس از جدایه های ناشناخته بیشتر در این محدوده تولید توکسین کرده اند.این نشان می دهد که میزان سم تولیدی توسط فلاووس پس از گونه های ناشناخته از همه بیشتر است و اینکه نه تنها بیشتر نمونه ها از گونه ی فلاووس تولید سم کرده اند که بیشتر موراد سم تولیدی در محدوده یppb ۱۰-۰ (بیشترین محدوده ی توکسین زایی) نیز مربوط به گونه ی فلاووس (پس از جدایه های

ناشناخته) است.(جدول۳-۱۰)در حالیکه در نتایج مهدیکار (۱۳۸۹)هم بیشتر ایزوله ها در محدوده ی ppb ۱۰-۰ تولید توکسین کرده اند و تعداد ایزوله های جداسازی شده به ترتیب از کارخانجات شرق گیلان و کشتزارهای شرق گیلان که در این محدوده تولید توکسین کرده اند از سایر مناطق بیشتر است و آسپرژیلوس نایجر بیشتر در این محدوده تولید توکسین کرده است.(۱۲)تولید سم در محدوده یppb ۲۰-۱۰ مقام دوم را دارد. تولید توکسین در اکثر بخشها در این محدوده وجود دارد به جز بخش سیرکومداتی (گونه های اوستیانوس،ملئوس و اکراسئوس و گونه ی پارازیتیکوس از بخش ونته ای).توکسین بیشتر توسط ایزوله های جداسازی شده از کارخانجات شرق گیلان و سپس کشتزارهای شرق گیلان تولید شده اند.(جدول۳-۱۰)در حالیکه در نتایج مهدیکار (۱۳۸۹)محدوده ی ppb۴۰-۳۰ در مقام دوم قرار دارد.تولید توکسین در اکثر بخشها در این محدوده وجود داشته است به جز بخش نایجر و کاندیدوس. توکسین بیشتر توسط ایزوله های جدا شده از کارخانجات شرق گیلان و سپس کشتزار شرق گیلان تولید شده است.آسپرژیلوس فلاووس بیشتر از سایر گونه ها در این محدوده ید توکسین تولید کرده است.(۱۲)بعد از دو محدوده ی ذکر شده بیشترین میزان تولید توکسین در محدوده یppb ۳۰-۲۰ می باشد که بیشتر این نمونه ها نیز از کارخانجات شرق گیلان و سپس کشتزارهای شرق گیلان بدست آمده اند. آسپرژیلوس اکراسئوس بیشتر از سایرین در این محدوده تولید توکسین کرده است.سپس یک گونه در محدوده یppb ۴۰-۳۰ توکسین تولید کرده است که گونه ی آسپرژیلوس کاندیدوس میباشد که از کارخانجات غرب گیلان بدست آمده است.(جدول۳-۱۰)درحالیکه در نتایج مهدیکار (۱۳۸۹) بعد از دو محدوده ذکر شده بیشتر گونه های آسپرژیلوسی از کشتزارهای شرق گیلان و در محدوده یppb ۵۰-۴۰ توکسین تولید کرده اند که آسپرژیلوس فلاووس بیشتر از سایر گونه ها در این محدوده سم تولید کرده اند.سپس گونه ها در محدوده ی ppb۳۰-۲۰ توکسین تولید کرده است که بیشتر در کشتزارهای شرق گیلان و بین گونه های آسپرژیلوس پارازیتیکوس است.تولید توکسین بیشتر در محدوده یppb ۲۰-۱۰ بیشتر در گونه های آسپرژیلوس فلاووس و گونه هایی که از کارخانجات شرق گیلان بدست آمده دیده شده است.(۱۲)

فهرست مراجع:

1. Myahy A.Isolated Aspergillus and aflatoxin determination in fish meal,corn.soybean vkngalh.journal of nectar Chamran University ,No.17,1386;pp.95-105.

2. . Inetrnational crops research Institute for the semi aried tropics,aflatoxins in food.www.aflatoxin.info.asp.2004.

3. Lanyasunya TP,Wamae LW,Musa HH,Olowofeso O,Lokwaleput IK.The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on smallholder ,Journal of nutrition ,4,3 2005;162-169

4. Schweitzer SH,Quist CR,Grimes GL,Foster DL,Aflatoxin Levels in corn available as wild turkey feed in Georgia.Journal of Wildlife Disease,37,3.2001;657-659.

5. Plasencia JAflatoxin in maize :A Mexican perspective . Journal of Toxicology,23.2004;155-177.

6.Alborzi,s.,Pourabbas,Rashidi,M.,&Astaneh,B.(2006).Aflatoxin M1contamination in pasteurized milk in shiraz(south of Iran). Food control,17(7),582-584

7. Johri,T,S.Exogenous toxicants.Central Avian Research Institute,2005.
8.Smela ME,CurierS.S.The chemistry and biology of aflatoxin B1,carcinogenesis .Journal of Wildlife Diseases,22,2001;535-545.
9.Bhat,RV.,Vasanthi S.(2003).Mycotoxins food safty risk in developing countries,Food.Agriculture and Environment,1-2.
10. Thorpe W,Muriuki HG,Omore A,steal S. Dairy development in Kenya ;The past ,The present and the future .Paper presented at the annual symposium of The animal Production Society of Kenya ,Nairobi, 2000;22-23.
11. Kenya Ministry of Health (KMOH) ,Outbreak of aflatoxin poisoning in Eastern and central provinces,Kenia,Nairobi,2005;1-5.
۱۲ .مهدیکار،سولماز(۱۳۸۹).بررسی مقایسه ای الگوی گوناگونی آفلاتوکسین زایی در اسپرژیلوس های زیرجنس سیرکومداتی بوم زاد شمال ایران.پایان نامه ی کارشناسی ارشد.دانشکده ی علوم پایه ی دانشگاه آزاد لاهیجان.