DOI: 10.22092/vj.2018.116541.1400
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه‌های قارچی آسپرژیلوس تولیدکننده‌ی آفلاتوکسین

• **علی مروی**
گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران
• **مریم طبیبی (نویسنده مسئول)**
مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
• **سجاد یزدان‌ستاد**
گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان ایران
• **محمدعلی نادری**
گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر کرد، شهرکرد، ایران
• **منصور خالدی**
کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **غلامرضا پور شهبازی**
گروه انگل شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **احمد محمودی کوهی**
کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران
تاریخ دریافت: ۲۹-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۰-۱۲-۱۳۹۶
Emali: ph.d.tabibi@gmail.com

چکیده

آلودگی غذای دام و طیور با قارچ آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین و مصرف فرآورده‌های آنها توسط انسان، از مشکلات بهداشتی چرخه غذایی و تهدید کنندهٔ سلامت است. پایش و شناخت مناسبی از وجود گونه‌های قارچی مولد آفلاتوکسین در خوراک دام و طیور وجود ندارد. پژوهش حاضر به منظور بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین و تعیین هویت گونه‌ها بر پایه تکثیر ژن بتا-توبولین با روش PCR انجام گرفت. نمونه‌برداری بصورت تصادفی از دو کارخانه تهیه خوراك دام و دو کارخانه تهیه خوراك طیور و دام در شهرستان گرگان انجام گرفت. نمونه‌ها در محیط اختصاصی کشت داده شد و شناسایی قارچها با روش‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و مولکولی انجام شد. گونه‌های قارچی جنس آسپرژیلوس مولد سم با تکثیر مولکولی ژن بتا-توبولین با روش PCR و تعیین توالی آن، تعیین هویت شدند. از بین آسپرژیلوس-های جدا شده، تعداد ۴ گونهٔ فلاووس، ۲ گونهٔ ورسیکالر، ۲ گونهٔ فومیگاتوس، ۲ گونهٔ نایجر، ۱ گونهٔ پارازیتیکوس، ۱ گونهٔ اوخراسئوس و ۱ گونهٔ ترئوس شناسایی شد. به‌طور متوسط، ۲۷/۲۵ درصد خوراک دام و ۳۱/۷۰ درصد خوراک طیور آلوده به قارچ آسپرژیلوس بودند. مطالعهٔ ما حاکی از میزان بالای آلودگی خوراک دام و طیور با قارچ آسپرژیلوس است. این مسئله لزوم بررسی و پایش مداوم نهادهای بهداشتی را می‌طلبد تا از ورود این سم به چرخه غذایی انسان جلوگیری شود.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، بتا-توبولین، آسپرژیلوس، خوراک دام و طیور

Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 38-43

Contamination study of livestock and poultry feedstuff with aflatoxin-producing Aspergillus species

By: Marvi, A., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran. Tabibi, M., (Corresponding Author) Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran. Yazdansetad, S., Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. Naderi, M.A., School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran. khaledi, M., Students Research Committee, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. Pourshahbazi, GH.R., Department of Parasitology, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. and Mahmoodi-kouhi, A., Student Research Committee, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran.

Received: 2017-12-20 **Accepted: 2017-12-20**

Emali: ph.d.tabibi@gmail.com

The livestock and poultry feedstuff contamination related to the aflatoxin-producing Aspergillus species and it's relationship with human's food is the sanitary problem and health-threatening in food chain. There is not suitable screening of aflatoxin-producing Aspergillus species in livestock and poultry feedstuff. The present study was conducted to study contamination of livestock and poultry feedstuff with aflatoxin-producing Aspergillus species and identify fungal species based on beta-tubulin gene amplification by PCR. Sampling was randomly performed from two livestock and two poultry feedstuff producing corporations in Gorgan county. The feedstuff samples were cultivated on specific medium and the fungi were identified by macroscopic, microscopic and molecular tests. The aflatoxin-producing Aspergillus species were identified based on PCR amplification and sequencing of beta-tubulin gene. Aspergillus flavus (n=4), Aspergillus parasiticus (n=1), Aspergillus versicolor (n=2), Aspergillus fumigatus (n=2), Aspergillus niger (n=2), Aspergillus ochraceus (n=1), Aspergillus terreus (n=1), Aspergillus fusarium (n=1) and Aspergillus trichothecium (n=1) were founded in our study. An average of 27.25 percent of livestock feedstuff and 31.70 percent of poultry feedstuff comprised of the Aspergillus genus. Our study indicated high contamination rate of livestock and poultry feedstuff with aflatoxin producing Aspergillus. Therefore, it should be constantly checked by health institutions to prevent the entry of the toxin into humans food chain..

Keywords: aflatoxin, beta-tubulin, aspergillus, livestock and poultry feedstuff

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویهٔ قارچی هستند که توسط انواع گوناگون قارچ‌ها تولید شده و با آلوده کردن مواد غذایی موجب مخاطرات غذایی انسان و حیوان می‌گردند (۱). آفلاتوکسین‌ها گروهی از این متابولیت‌های ثانویه هستند که توسط قارچ‌هایی همچون *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* تولید می‌گردند و باعث آلودگی انواع محصولات غذایی، با ارزش اقتصادی بالا همچون ذرت، بادام زمینی، گندم، سبزیجات و گیاهان دارویی می‌گردند (۲). از انواع آفلاتوکسین‌ها می‌توان آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 را نام برد که در محصولات غذای یافت می‌گردند. آفلاتوکسین M_1 و M_2 به‌ترتیب متابولیت‌های هیدروکسیله شدهٔ افلاتوکسین B_1 و B_2 هستند که B_1 آن شایع‌ترین و سمی‌ترین نوع آفلاتوکسین است که از طرف آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان به‌عنوان یک ماده کارسینوژن شناخته شده است (۳). آفلاتوکسین‌ها به‌طور خاص کبد را مورد هدف قرار می‌دهند. علائم اولیه مسمومیت کبدی ناشی از آفلاتوکسین‌ها شامل تب، بی‌اشتهایی، درد شکم، استفراغ، هپاتیت و موارد نادری از مسمومیت‌های حاد هستند (۴). نتایج مطالعه‌ای نشان داد آفلاتوکسین B_1 موجب آپوپتوز بیش از حد لنفوسیت‌های طحالی می-گردد که این عمل را با کاهش دادن آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش گلوتاتیون ردوکتاز انجام داده و نتیجهٔ آن کاهش ذخایر گلوتاتیون بوده و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد (۵). آفلاتوکسین‌ها همچنین می-توانند باعث بیماری‌های شدید و مرگ‌های ناگهانی در حیوانات گردند (۶). ماکیان حیوانات بسیار حساسی نسبت به آفلاتوکسین‌ها هستند و مصرف آفلاتوکسین حتی به مقدارکم باعث کاهش رشد، کاهش بهره‌وری و افزایش مرگ و میر می‌گردد (۷). باقیمانده مایکوتوکسین‌ها بویژه آفلاتوکسین‌ها در فرآورده‌های طیور می‌تواند تهدیدی برای انسان‌ها از طریق سرطان‌زایی، تراتوژنیک بودن، سرکوب سیستم ایمنی تلقی گردد (۸). آفلاتوکسین‌ها همچنین می‌توانند باعث کاهش شیر دام‌ها، بی‌کیفیتی تخم مرغ‌ها، مرگ جنینی، کاهش عملکرد تولید مثلی، ایجاد تومور، سرکوب سیستم ایمنی و آسیب‌های شدید کبدی مثل نکروز حتی با وجود مقادیر کم این سموم گردند. اتحادیه

اروپا و Codex Alimentarius حداکثر میزان مجاز برای آفلاتوکسین در مواد غذایی را ۰٫۰۵ ppb در نظر گرفته است در حالی که ایالات متحده آن را ۰٫۰۵ ppb در نظر می‌گیرد (۹).

اصلی‌ترین راه مواجه‌شدن انسان با آفلاتوکسین از طریق مواد غذایی همچون محصولات کشاورزی و تولیدات دامی است، هرچند که راه‌های دیگری مانند تماس پوستی و استنشاق نیز در آلودگی انسان نقش دارند (۱۰). همچنین اصلی‌ترین راه آلودگی دام‌ها، خوراک آلوده است (۱۱). مطالعات مختلف انجام شده در رابطه با حذف و کاهش آفلاتوکسین‌ها با روش‌های میکروبی و شیمیایی و فیزیکی نشان داده‌اند که این روش‌ها نه تنها در مقیاس وسیع قابل انجام و مقرون به صرفه نیستند بلکه روش مطمئنی نیز برای سلامت غذای دام‌ها نیز نمی‌باشند (۱۲). به‌نظر می‌رسد هنوز نیز بررسی پیوستهٔ جیرهٔ غذایی دام و طیور بهترین روش جلوگیری از ورود این سم قارچی به درون زنجیره غذایی انسان باشد. با توجه به این مهم، عدم وجود آمار دقیق و قابل اطمینان از نوع قارچ‌های آلوده‌کنندهٔ خوراک دام و طیور در شهرستان گرگان، پژوهش حاضر به منظور بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین و تعیین هویت گونه‌ها بر پایه تکثیر ژن بتا-توبولین با روش PCR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

مطالعهٔ حاضر از نوع توصیفی- مقطعی است که جامعهٔ آماری آن، تمام محصولات کارخانه‌های تولید خوراک دام و طیور در شهرستان گرگان بود. پس از اخذ مجوز و هماهنگی‌های لازم، نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی در فصول تابستان و پاییز از کارخانه‌های خوراک دام و طیور شهرستان گرگان و بصورت سه نوبت در هر فصل برای هر کارخانه انجام گرفت. در مجموع ۲۴ نمونهٔ خوراک آماده با وزن تقریبی ۱۵۰۰ گرم اخذ گردید. ابتدا مشخصات هر یک از نمونه‌های خوراک دام و همچنین خوراک طیور به‌همراه تاریخ نمونه‌گیری، ثبت گردید. به‌منظور بررسی آلودگی نمونه‌ها به قارچ‌های مختلف از سه روش کشت خوراک جامد بصورت‌های گندزدایی شده، غیر گندزدایی شده و کشت سوسپانسیون برای هرنمونه استفاده شد (۷).

جداسازی و شناسایی قارچ‌ها

جهت جداسازی قارچ‌ها، ابتدا مقدار ۱ گرم از هر نمونهٔ خوراک جمع‌آوری شده در ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل بحالت سوسپانسیون درآمد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. لازم به ذکر است که از محیط مالت اکسترکت آگار نیز به جهت افزایش کونیدی‌های قارچ متعاقب کشت در محیط سابورو دکستروز آگار نیز استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های موفولوژیکی و ماکروسکوپی مطابق روش‌های استاندارد شناسایی شدند. کلنی‌های قارچی با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو رنگ‌آمیزی شده و

جدول ۱- مشخصات پرایمر مورد استفاده برای تکثیر ژن بتا-توبولین

نام ژن	توالی (۵'-۳')	طول قطعه (bp)
Beta-tubulin	F: TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG R: GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	۵۳۷

جدول ۲- برنامه سیکل PCR جهت تکثیر ژن بتا-توبولین

مراحل	دما (درجه سانتی گراد)	زمان	چرخه
۱-واسرشته اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
۲-واسرشته شدن ثانویه	۹۵	۱ دقیقه	۳۵
۳-اتصال	۶۴	۳۵ دقیقه	
۴-گسترش	۷۲	۱ دقیقه	
۵-گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

از نظر میکروسکوپی ساختار میسلیوم، وزیکول، فیالاید، کونیدی و کونیدیوفور آنها مورد بررسی قرار گرفت. کلنی‌های قارچی با بیشترین شباهت به آسپرژیلوس جداسازی و خالص سازی گردید. به جهت اطمینان از خلوص کلنی‌ها از روش کشت بر روی لام (Slide culture technique) نیز استفاده گردید. کلنی‌های مذکور تا انجام آزمایش‌های تکمیلی مولکولی در یخچال نگهداری گردید (۷).

استخراج DNA

کشت مایع قارچ با تلقیح یک آنس از کشت‌های تازه آسپرژیلوس به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط سابورو دکسترز براث آماده گردید و در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. پس از طی زمان انکوباسیون میسلیوم‌های قارچ جمع‌آوری و با بافر تریس EDTA شستشو داده شد. سپس استخراج DNA از میسلیوم قارچ با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای (glass beads) و فنل و کلروفرم صورت گرفت. DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید (۱۳).

تشخیص مولکولی از طریق PCR

آزمایش PCR به‌منظور تکثیر قطعه‌ای از ژن بتاتوبولین (Beta tubulin) انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) در این مطالعه بر اساس مطالعه دونالدسون و گلاس انتخاب شد (۱۳). یک مخلوط واکنش PCR به‌حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR ۱ برابر (۱X) حاوی تریس HCL ۱۰ میلی مولار و کلرید پتاسیم ۵۰ میلی مولار، $MgCl_2$ دو میلی مولار، dNTP ۰/۲ میلی مولار، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد و ریورس و ۲ واحد از آنزیم Taq DNA پلیمراز آماده گردید (۱۴). برنامه سیکل PCR جهت تکثیر ژن Beta tubulin در جدول ۲ آمده است. محصول PCR به منظور تعیین گونه بر اساس تفاوت‌های نوکلئوتیدی تعیین توالی گردید (۱۵).

تعیین توالی

تعیین توالی با دستگاه ABI و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. کروماتوگرام به دست آمده از دستگاه با روش‌های بیوانفورماتیک بررسی گردید و توالی‌های به‌دست آمده در مقایسه با اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی برای تعیین گونه آسپرژیلوس مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده توسط روش‌های آماری توصیفی و استباطی، من-ویتی و تی- مستقل و توسط نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از نمونه‌های خوراک دام و طیور جمع‌آوری شده از کارخانه‌های خوراک دام و طیور در طول ۶ ماه (تابستان و پاییز)، گونه‌های آسپرژیلوس جداسازی گردید. از کارخانه‌های خوراک طیور ۱ و ۲ به‌ترتیب ۲۵ و ۴۹ مورد قارچ آسپرژیلوس به‌دست آمد که فراوانی آن، به ترتیب ۳۰/۱ درصد و ۳۳/۳ درصد است. همچنین در کارخانه ۱، ۵۸ مورد و در کارخانه ۲، ۹۸ مورد آلودگی به قارچ‌های دیگر مشاهده گردید. در طی ۶ ماه نمونه‌برداری به

جدول ۳- میزان آلودگی به قارچهای مولد آفلاتوکسین در ۲ کارخانه خوراک طیور با استفاده از آزمون من-ویتنی

سطح معنی داری	آزمون من-ویتنی	میانگین رتبه	تعداد	کارخانه	گونه قارچی
۰,۰۱۷	۱۷۷	۲۹,۱۲	۲۴	طیور ۲	آسپرژیلوس
		۱۹,۸۸	۲۴	طیور ۱	
			۴۸	کل	

جدول۴- میزان آلودگی به قارچهای مولد آفلاتوکسین در ۲ کارخانه خوراک دام با استفاده از آزمون من-ویتنی

سطح معنی داری	آزمون من-ویتنی	میانگین رتبه	تعداد	کارخانه	گونه قارچی
۰,۷۱۶	۲۷۲,۵	۲۵,۱۵	۲۴	دام ۱	آسپرژیلوس
		۲۳,۸۵	۲۴	دام ۲	
			۴۸	کل	

ترتیب در کارخانه‌های ۱ و ۲ تولید خوراک دام به میزان ۱۹ و ۲۰ مورد آلودگی به قارچ آسپرژیلوس مشاهده گردیده است که میزان درصد آن از تمام قارچ‌های موجود دیگر به ترتیب ۲۹/۲ و ۲۵/۳ درصد بود. آلودگی به قارچ های دیگر در کارخانه ۱، ۴۶ مورد (۷۰,۸ درصد) و در کارخانه ۲، ۵۹ مورد (۷۴,۷ درصد) گزارش گردید. طبق آزمون آماری من- ویتنی که برای مقایسه میزان آلودگی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در ۲ کارخانه خوراک طیور مورد استفاده قرار گرفت اختلاف معنی‌داری بین کارخانه طیور ۱ و ۲ در خصوص قارچ‌های آسپرژیلوس مشاهده گردید. از دو کارخانه خوراک دام در خصوص مقایسه میزان آلودگی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. مقایسه میزان آلودگی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در مخلوط خوراک کارخانه‌های طیور و دام، اختلاف معنی‌داری را در خصوص آلودگی بین خوراک دام و طیور نشان نداد. آزمون تی مستقل نیز نشان داد اختلاف معنی‌داری در فصول تابستان و پاییز در میزان آلودگی بین قارچ‌های مولد آفلاتوکسین وجود ندارد. بررسی آماری میزان آلودگی نمونه‌های خوراک طیور، نمونه‌های خوراک طیور دام، مخلوط خوراک کارخانه های طیور و دام، مخلوط

جدول ۵- میزان آلودگی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در مخلوط خوراک کارخانه های طیور و دام با استفاده از آزمون تی مستقل

سطح معنی داری	آزمون تی	انحراف معیار	میانگین	تعداد	گروه
۰,۰۰۸	۲,۷۶۶	۱,۸۶۳	۳,۰۸	۲۴	کارخانه‌های طیور
		۱,۷۸۹	۱,۶۲	۲۴	کارخانه‌های دام

جدول ۶- میزان آلودگی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در مخلوط خوراک هر دو کارخانه طیور در دو فصل تابستان و پاییز با استفاده از آزمون تی مستقل

سطح معنی داری	آزمون تی	انحراف معیار	میانگین	تعداد	فصل
۰,۶۰۸	-۲,۴۰۹	۱,۷۶۵	۲,۲۵	۱۲	تابستان
			۳,۹۲	۱۲	پاییز

جدول ۷- میزان آلودگی به قارچهای مولد آفلاتوکسین در مخلوط خوراک هر دو کارخانه دام در دو فصل تابستان و پاییز با استفاده از آزمون تی مستقل

سطح معنی داری	آزمون تی	انحراف معیار	میانگین	تعداد	فصل
۰,۰۸۷	-۱,۷۹۲	۱,۲۷۹	۱,۰۰	۱۲	تابستان
			۲,۲۵	۱۲	پاییز

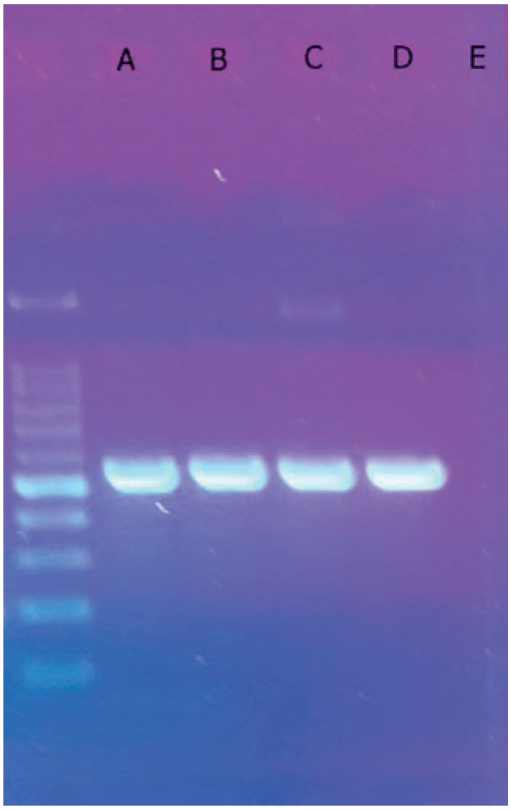
جدول ۸- میزان آلودگی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در مخلوط خوراک همه کارخانه های دام و طیور در دو فصل تابستان و پاییز با استفاده از آزمون تی مستقل

سطح معنی داری	آزمون تی	انحراف معیار	میانگین	تعداد	فصل
۰,۰۰۸	-۲,۷۶۶	۱,۶۳۷	۱,۶۲	۲۴	تابستان
			۳,۰۸	۲۴	پاییز

خوراک هر دو کارخانه طیور در دو فصل تابستان و پاییز، مخلوط خوراک هر دو کارخانه دام در دو فصل تابستان و پاییز و مخلوط خوراک همه کارخانه‌های دام و طیور در دو فصل تابستان به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین به ترتیب در جداول ۳ تا ۸ آمده است.

تکثیر و تعیین توالی ژن بتا توبولین

تکثیر ژن بتا توبولین در حضور کنترل مثبت و منفی با پرایمرهای اختصاصی به درستی انجام گرفت و باند در محدوده‌ی ۵۳۷ جفت بازی را نشان داد. محصول تکثیر یافته در ژل آگارز ۲ درصد و در بافر ۱X TBE (تریس، بوریک اسید، EDTA) الکتروفورز گردید. سپس توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور در زیر نور UV بررسی شد (شکل ۱). تعیین توالی قطعات تکثیر یافته ژن بتا توبولین توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Korea) انجام گرفت و با نرم افزار کروماس (Chromas ۲,۶,۴) و با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژنی بررسی و بلاست شد. از بین آسپرژیلوس‌های جدا شده، تعداد ۴ گونه آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*)، ۲ گونه آسپرژیلوس ورسیکالر (*Aspergillus versicolor*)، ۲ گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*)، ۲ گونه آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*)، ۱ گونه آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*Aspergillus parasiticus*)، ۱ گونه آسپرژیلوس اوخراسئوس (*Aspergillus ochraseous*) و ۱ گونه آسپرژیلوس ترئوس (*Aspergillus terreus*) شناسایی شد.



شکل ۱- تکثیر توالی ژن بتا توبولین در محدودهٔ ۵۳۷ جفت باز (ستون A تا D: ژن بتا توبولین تکثیر شده، ستون E: کنترل منفی، مارکر ژنی: ۱۰۰ جفت بازی)

بحث و نتیجه‌گیری

آسپرژیلوس‌ها قارچ‌هایی با تنوع گونه‌ای فراوان هستند که در افراد دچار نقص سیستم ایمنی بیماری‌هایی همچون کراتیت قارچی، برونکوپولمونوری آلرژیک، آسم، سینوزیت‌های نازال و انواع عفونت‌ها را ایجاد می‌کنند (۱۷و۱۶). آسپرژیلوس‌ها از شایع‌ترین قارچ‌های محیطی است و اسپورهای این قارچ به فراوانی در آب، خاک، همهٔ سطوح و مواد غذایی مانند میوه‌ها، نان-ها، دانه‌های غلات یافت می‌شود (۱۸). نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان آلودگی خوراک طیور به قارچ آسپرژیلوس نسبت به خوراک دام‌ها بیشتر بوده و این میزان برای خوراک طیور تا ۳۳ درصد و برای خوراک دام‌ها تا ۲۹ درصد گزارش گردید. مطالعهٔ دونهام و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در تگزاس نشان داد تقریبا ۳۳ درصد کیسه‌های خوراک حیوانات که عمدتا از نوع ذرت است آلوده به آفلاتوکسین هستند (۱۹). باتیلانی و همکاران در مطالعهٔ خود نشان دادند تغییرات آب و هوایی مهمترین علت افزایش آلودگی ذرت‌ها به آفلاتوکسین است. آنها بیان کردند آلودگی به آفلاتوکسین در ۱۰۰ سال آینده به عنوان عامل مهمی در آلودگی محصولات غذایی مطرح خواهد بود (۲۰). هاجنال و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ در صربستان نشان دادند که ۲۱ درصد ذرت‌های کشت شده در این کشور برای مصرف انسانی مناسب نیستند و این موضوع در فصول گرم سال بیشتر خود نمایی می‌کند (۲۱). یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی ما نشان داد میزان آلودگی خوراک دام و طیور در پاییز بیشتر از تابستان است که علل احتمالی آن نگه داشتن مواد اولیه در تابستان (فصل برداشت) در انبار و دپو کردن آن در شرایط محیطی نامطلوب و فروش آن در فصل پاییز به کارخانه‌های خوراک دام و طیور باشد.

سالا و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعهٔ ۷۸ نمونه خوراک دام در کشورهای تایلند و ویتنام آلودگی ۹۴ درصد نمونه را به گونهٔ آسپرژیبوس فلاووس و آسپرژیبوس پارازیتیکوس گزارش کردند. علت احتمالی گزارش این میزان آلودگی نسبت به مطالعهٔ حاضر می‌تواند شرایط جغرافیایی و آب و هوای این مناطق باشد. در مطالعه‌ی سالا و همکاران گونه‌های غالب آلوده کننده از نوع آسپرژیبوس فلاووس بوده که با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۲۲). در مطالعه حاضر بیشترین گونهٔ جداسازی شده از محصولات و جیره‌های غذایی از نوع آسپرژیلوس فلاووس بود که از این جهت با مطالعهٔ هالت و همکاران مطابقت دارد. هالت و همکاران در بررسی میزان آلودگی دانه‌های گندم، جو، ذرت مورد استفاده دامداران در کشور کرواسی، آسپرژیلوس فلاووس را به عنوان عامل اصلی آلوده کننده معرفی کردند (۲۳). کاردوسو و همکارانش نشان دادند استفاده از رژیم غذایی آلوده به آفلاتوکسین در جوجه‌های گوشتی در ۲۴ ساعت اول باعث آسیب‌های ژنتیکی در آنها می‌گردد و در صورت ادامه رژیم می‌تواند منجر به کاهش نسبت اریتروسیت‌های پلی‌کروماتیک به نوروکروماتیک و همچنین کاهش وزن جوجه‌ها گردد (۲۴). هوساین و

همکاران در مطالعهٔ خود نشان دادند آلودگی مزمن جوجه‌های گوشتی به آفلاتوکسین در طی ۲۸ روز تغذیه با خوراک آلوده باعث افزایش ALT و AST سرم آنها گردید، این در حالی است که باعث کاهش قابل ملاحظهٔ پروتئین تام و آلبومین سرم آنها گردید (۲۵). پژوهش میاحی و همکاران نیز بر روی مرغ‌های کشتار شده در اهواز نشان داد ۳۷/۵ درصد از جگرها، ۲۲/۵ درصد از عضلات سینه و ران مرغ‌های کشتار شده آلوده به سم آفلاتوکسین است (۲۶). مطالعهٔ ما همچنین نشان داد میزان آلودگی خوراک طیور نسبت به خوراک دام‌ها بیشتر است. با توجه به این که طیور نسبت به دام‌ها به آفلاتوکسین حساسیت بیشتری دارند، لذا آلودگی بیشتر خوراک طیور لزوم توجه بیشتر به این حیوانات را به عنوان بخشی از چرخهٔ غذایی انسان نشان می‌دهد. از طرفی نباید از آلودگی خوراک دام‌ها نیز غافل گردید که در پژوهش ما تا ۲۹ درصد آلودگی به گونه‌های آسپرژیلوس وجود داشت. دشتی و همکاران در یک مطالعه در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۷ نشان دادند ۸۰ درصد پنیرهای موجود در بازار کویت آلوده به سم آفلاتوکسین هستند، این میزان از کل نمونه‌های اخذ شده اعم از شیر و سایر لبنیات ۷۹٫۸ درصد گزارش گردید (۲۷). گیزاچو و همکارانش نیز در پژوهشی در سال ۲۰۱۵ در آدیس آبابا در اتیوپی نشان دادند میزان آلودگی غذای دام‌ها به آفلاتوکسین بین ۲۹۰-۳۹۷ µg/kg و در نمونه‌ای دیگر از غذای دام بین ۹-۳۱ µg/kg است (۲۸). جعفری و همکارانش در مطالعهٔ خود نشان دادند ۶ درصد از شیر مادران مورد مطالعه در شهرستان شهرکرد آلوده به آفلاتوکسین هستند که حدود ۳ درصد آنها میزان بیشتر از حد مجاز دارند (۲۹).

نتیجه‌گیری

راه اصلی جلوگیری از ورود آفلاتوکسین به چرخه غذایی انسان پایش جیرهٔ غذایی دام و طیور است. لذا، لزوم بررسی مکرر و مداوم خوراک دام‌ها و طیور با روش‌های آزمایشگاهی بیش از پیش احساس می‌گردد. همچنین شرایط آب و هوایی و جغرافیایی مناطق مختلف لزوم دقت بیشتر در رابطه با آلودگی‌های قارچی را از طرف متولیان امر بهداشت می‌طلبد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همه افرادی که در این پژوهش مشارکت داشتند کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

1. Mamo, F.T., G.N Selvaraj, Y. Wang, Y. Liu. 2017. Recent Developments in the Screening of Atoxigenic *Aspergillus flavus* towards Aflatoxin Biocontrol. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 5: 20-30.

2. Gummadidala, P..M., Y.P. Chen, K.R. Beauchesne, K.P. Miller, C. Mitra, N. Banaszek, et al. 2016. Aflatoxin-Exposure of Vibrio gazogenes as a Novel System for the Generation of Aflatoxin Synthesis Inhibitors. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-9.

3. Gong, Y.Y., S. Watson and M.N. Routledge. 2016. Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies. *Food Safety* 4: 14-27.

4. Kumar, P., D.K. Mahato, M. Kamle, T.K. Mohanta, S.G. Kang. 2017. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety. *Human Health and Their Management* 7: 1-10.

5. Gao, Y.N., J.Q. Wang, S.L. Li, Z.D. Zhang, N. Zheng. 2016. Aflatoxin M1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology* 96: 79-89.

6. Atherstone, C., D. Grace, J.F. Lindahl, E.K. Kang'ethe, F. Nelson. 2016. Assessing the impact of aflatoxin consumption on animal health and productivity. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 16: 10949-10966.

7. Ibrahim, M.J., J. Kabir, C.N. Kwanashie, M.T. Salawudeen. 2017. Identification of Aspergillus species in feed fed to caged birds using morphological characteristics in Zaria, Nigeria. *Microbiology Research International* 5: 16-24.

8. Sineque, A.R., C.L. Macuamule and F.R. Dos Anjos. 2017. Aflatoxin B1 Contamination in Chicken Livers and Gizzards from Industrial and Small Abattoirs, Measured by ELISA Technique in Maputo, Mozambique. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 1-10.

9. Makun, H.A., M. Mwanza, H. Iheanacho, D.O. Apeh, S. Abdulrahim, S.H. Jamiu, et al. 2017. Comparative Study of Aflatoxin M1 in Livestock Livers from Minna, Nigeria. *Journal of Liver* 6: 1-5.

10. Ferri, F., C. Brera, B.D. Santis, G. Fedrizzi, T. Bacci, L. Bedogni, et al. 2017. Survey on Urinary Levels of Aflatoxins in Professionally Exposed Workers. *Toxins* 9: 1-13.

11. Bondy, G.S. and J.J. Pestka. 2008. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 3:109-143.

12. Maktabi, S., M.R. Haji Hajikolaie, M. Ghorbanpour, M. Kazemi Varnamkhasti. 2014. Investigation into Aflatoxin B1 in Feedstuffs of Traditional Dairy Husbandry in Ahvaz Area. *Journal of Veterinary Microbiology* 10: 45-54. (In Farsi).

13. Glass, N.L. and G.C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.

14. Summerbell, R.C., F. Staib, R. Dales, N. Nolard, J. Kane, H. Zwanenburg, et al. 1992. Ecologe of fungi in human dewellings. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 30:279-285.

15. Diaz, G., J. Summers and S. Leeson. 1995. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. UK, Guelph by University books.

16. Diba K, Mirhendi H, Kordbacheh P, Rezaie S. Development

of RFLP-PCR method for the identification of medically important Aspergillus species using single restriction enzyme MwoI. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014 Jun;45(2):503-7.

17. Patterson TF, Thompson III GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Jun 29;63(4):e1-60.

18. Bouakline A, Lacroix C, Roux N, Gangneux JP,Derouin F. Fungal contamination of food in hematology units. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4272-3.

19. Dunham, N.R., S.T. Peper, C.D. Downing, R.J. Kendall. 2017. Aflatoxin contamination in corn sold for wildlife feed in texas. *Ecotoxicology* 26:516-520.

20. Battilani, P., P. Toscano, H.J. Fels-Klerx, A. Moretti, M.C. Leggieri, C. Brera, et al. 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports* 6: 24328.

21. Hajnal, E.J., J. Kos, J. Krulj, S. Krstović, I. Jajić, L. Pezo. 2017. Aflatoxins contamination of maize in Serbia: The impact of weather conditions in 2015. Food Additives & Contaminants: Part A 34:1999-2010.

22. Sala A. Updated profile of aflatoxin and aspergillus section flavi contamination in ric and its byproducts from the Philippines *J Toxicol* 2005; 22: 429-39.

23. Halt M. Aspergillus flavous and aflatoxin B1 in flour production. *Europ J Epidem* 1994; 10: 555-58.

24. Cardoso, V.D., A.B. Vermelho, C.A.R. de Lima, J.M. de Oliveira, M.E.F. de Lima, L.H.P. da Silva, et al. 2016. Antigenotoxic Effect of Piperine in Broiler Chickens Intoxicated with Aflatoxin B1. *Toxins* 8: 1-14.

25. Hussain, Z., H. Rehman, S. Manzoor, S.H. Tahir, M. Mukhtar. 2016. Determination of liver and muscle aflatoxin B1 residues and select serumchemistry variables during chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Veterinary Clinical Pathology* 45: 330-334.

26. Mayahi, M., A. Zand Mogadam, A. Fazlara, H. Jafari. 2008. A survey on the aflatoxin B1 and M1 level in liver, leg and breast muscles of broiler chicks slaughtered in Ahvaz poultry slaughter house. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 15: 132-137. (in Farsi).

27. Dashti, B., S. Al-Hamli, H. Alomirah, S. Al-Zenki, A.B. Abbas, W. Sawaya. 2009. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* 20: 686-690.

28. Gizachew, D., B. Szonyi, A. Tegegne, J. Hanson, D. Grace. 2016. Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control* 59: 773-779.

29. Jafari, T., A. Fallah, S. Kheiri, A. Fadaei, S.A. Amini. 2017. Aflatoxin M1 in human breast milk in Shahrekord, Iran and association with dietary factors. Food Additives & Contaminants: Part B 5: 1-16.