DOI: 10.22092/VJ.2020.343043.1723
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

جداسازی و شناسائی مولکولی قارچ‌های آلوده‌کننده جیره بر پایه سویا و ذرت طیور در منطقه بیرجند

• ام‌البنین معتمد رضایی
مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند
• محمدرضا میرزائی(نویسنده مسئول)
بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
• مهدی جهانی
گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
• عباسعلی رمضانی
مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۲-۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۶-۲۲
Email: reza.mirzaee.mrz@gmail.com

چکیده

به منظور تولید غذای سالم برای مصرف‌کنندگان، شناخت و کنترل عوامل آلوده‌کننده خوراک دام اجتناب‌ناپذیر است. از دو نوع خوراک طیور، تعداد ۲۱۲ نمونه جمع‌آوری شد. بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها رقت‌های متوالی تهیه گردید و از هر رقت روی محیط کشت غذائی حاوی آگار کشت داده شد. از خوراک دان‌های مرغی منطقه بیرجند خراسان جنوبی آرایه‌های قارچی *P. aurantiogriseum* ، *P. chrysogenum* و *Aspergillus flavus*، *Penicillium sp.* و *Fusarium proliferatum* جداسازی، خالص‌سازی و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی شناسائی شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته Chelex ۱۰۰ و از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر بخشی از ناحیه rDNA آرایه‌های قارچی استفاده شد. جدایه‌های *Rhizopus* بر اساس خصوصیات ریخت شناسی شناسائی شدند. بیشترین و کمترین تعداد پرگنه‌های قارچی مربوط به قارچ پنی‌سیلیوم (۱/۱۶ ±۰/۱۷) و قارچ فوزاریوم (۰/۴۱۷ ±۰/۰۷۵) بود. بر اساس یافته‌های این پژوهش، کنترل آلودگی خوراک دان به این قارچها در برنامه‌های مدیریت بهداشت غذائی با روش‌های کنترل محیط انبار و روش‌های بیولوژیک توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: شناسائی مولکولی، آلودگی قارچی، جیره ذرت و سویا

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 147-157

Isolation and molecular identification of fungal contamination of corn and soybean diets of poultry in Birjand area

By: Motamed Rezaei, O., Social Determinant of Health Research center ,Department of Occupational Health , Birjand university of medical sciences , Birjand, Iran. Mirzaei, M. R., (Corresponding Author) Plant Protection Research Department, South Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Birjand, Iran. Jahani, M., Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. Ramezani, A. A., Social Determinant of Health Research center ,Department of Epidemiology and Biostatistics , Birjand university of medical sciences , Birjand, Iran

Received: 2020-05-20 **Accepted: 2020-09-12**

Email: reza.mirzaee.mrz@gmail.com

Fungal growth on poultry feed decreases their nutritional value and constitutes health hazard. To produce healthy food for consumers, recognizing and controlling the contamination of poultry feed is necessary. A total of 212 poultry feed samples including two different feeds were collected and by using dilution plating technique, successive dilutions were prepared and each of dilutions was cultured on solid fungal media cultures. Different fungal species such as *Penicillium sp.*, *P.aurantiogriseum*, *P.chrysogenum*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* were isolated from poultry feed of Birjand area of south Khorasan province and then purified and identified based on morphological and molecular characteristics. DNA extraction were performed by modified Chelex 100 method and Polymerase chain reaction (PCR) method using amplification of internal transcribed spacer (*ITS*) region used for molecular identification of fungal taxa. *Rhizopus* isolates identified based on morphological features. The highest and lowest fungal colonies were *Penicillium*(0.617±1.16) and *Fusarium* (0.075±0.417) receptively. Based on this study, controlling the contamination of poultry feed is recommended.

Key words: Corn and soybean diets, fungul contamination, molecular identification

مقدمه

امروزه تولید نشان‌های تجاری متنوع جیره‌های غذائی پرندگان بر مبنای نوآوری و بهبود کیفیت تغذیه آنها استوار است. از طرفی آلودگی‌های میکروبی و قارچی به عنوان تهدیدی دائمی و مهم‌ترین عامل زیان اقتصادی صنعت مرغداری در جهان به شمار می‌رود (۱۶).

در این میان، وجود زهرابه‌های قارچی (میکوتوکسین‌ها) و متابولیت‌های ثانویه قارچها در خوراک طیور به دلیل بروز بیماری‌های گوناگون مانند سرطان اهمیت ویژه‌ای دارد. در بین زهرابه‌های قارچی، آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط آرایه‌های قارچی گونه‌های جنس‌های آسپرژیلوس و فوزاریوم از مهم‌ترین موارد محسوب می‌شوند (۲۰). جهت کنترل کیفی خوراک طیور، شناسائی میکروب‌های آلوده کننده ضروری است چون موجب فراهم شدن اطلاعات لازم در زمینه تولید بالقوه میکوتوکسین‌ها شده، و به عنوان شاخص کیفیت بهداشتی خوراک می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). قارچهای آلوده‌کننده مواد خام غذائی طیور در زمان قبل یا بعد از برداشت دان موجب آلودگی شده، فرآیند آلودگی به قارچهای سمی در زمان فرآوری و انبارداری نیز ادامه پیدا می‌کند (۱۰).

در بررسی میزان آلودگی دانه‌های گندم، جو، ذرت مورد استفاده دامداران در کشور کرواسی، آرایه قارچی *Aspergillus flavus* به عنوان عامل اصلی آلوده‌کننده گزارش شده است (۱۳). بر اساس پژوهش هاجنال و همکاران (۲۰۱۵)، حدود ۲۱٪ ذرت‌های برداشت شده در صربستان برای مصارف انسانی و دام از نظر آلودگی قارچی مناسب نبوده و وقوع این مشکل در فصول گرم سال بیشتر است. بنابراین جهت اجتناب از مشکلات ناشی از آلودگی های قارچی برای انسان و دام، بازدید نمونه‌های ذرت بعد از برداشت توصیه شده است (۱۲). تاکنون بین ۸۰ تا ۹۰ نوع زهرابه قارچی (میکوتوکسین) که توسط انواع مختلف قارچها ترشح می‌شوند، در طبیعت شناخته شده است. قارچهای تولیدکننده آفلاتوکسین شامل گونه‌هائی از آسپرژیلوس، فوزاریوم، کلاویسپس هستند (۶ و ۱۱). بهداشت ضعیف خوراک دام از جمله دان طیور، علاوه بر اینکه موجب بروز مشکلاتی مانند سرطان‌زائی می‌شود، باعث عدم توازن مواد غذائی خوراک نیز می‌گردد به طوری که در مواردی نمونه‌های بررسی شده تا ۹۰٪ کمبود مواد غذائی داشته‌اند (۱۰). در حال حاضر، علاوه بر وجود شناخت ارتباط بین آلودگی‌های قارچی

خوراک طیور گوشتی و بروز برخی بیماری‌ها و اثرات سو دیگر مانند سوتغذیه، نقش‌های گوناگونی در ارتباط با کاربرد قارچ‌های رشته‌ای به عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی، پروبیوتیک و تولید آنزیم‌ها در برنامه تولید مرغ‌های گوشتی در دنیا مدنظر قرار می‌گیرد. بنابراین نقش عوامل قارچی همراه با جیره غذائی مرغ‌های گوشتی تنها محدود به بروز بیماری و آلودگی آن نمی‌شود بلکه به عنوان عوامل سودمند در سلامت و بهبود رشد مرغ گوشتی نیز مورد بررسی قرار می‌گیرند (۲۴). بر اساس یافته‌های پژوهش تعیین میزان آلودگی قارچی خوراک طیور در مرغداری‌های گوشتی در تربت حیدریه خراسان رضوی، چندین آرایه قارچی شامل فوزاریوم، پنی‌سیلیوم، آسپرژیلوس، پسیلومایسس و کلادوسپوریوم جداسازی و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی (مورفولوژیکی) شناسائی شده است (۲۳). این پژوهش جهت شناسائی قارچ‌های آلوده کننده خوراک ذرت و سویا طیور در مرغداری‌های گوشتی منطقه بیرجند خراسان جنوبی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از جیره بر پایه سویا و ذرت، ۵۱ مرغداری و ۲ انبار فعال دان مرغ و از هرکدام ۴ نمونه (۲ نمونه ذرت و ۲ نمونه سویا به تعداد ۲۱۲ نمونه شامل ۱۰۲ نمونه ذرت و ۱۱۰ نمونه سویا) از منطقه بیرجند خراسان جنوبی، جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری به صورت کاملا تصادفی و به وسیله سوند cm ۲۰ از قسمت میانی کیسه‌های دان مرغ انجام شد. نمونه‌ها داخل نایلون‌های استریل قرارداده شده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

شناسایی جدایه‌های قارچی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی

مقدار gr ۲۵ از نمونه جمع‌آوری شده درون ارلن جداگانه حاوی ml ۲۲۵ آب مقطر سترون ریخته و به مدت min ۲۰ روی هم زن مغناطیسی قرار داده شد. سپس در لوله‌های آزمایش رقت‌های lit ۱/۱۰ ، ۱/۱۰۰ و۱/۱۰۰۰ از این نمونه تهیه گردید. مقدار ml ۱ از هریک از رقت‌ها در یک پتری سترون ریخته و ml ۱۲ محیط آماده شده سابور دکستروز اگار به هر پتری اضافه شد. پس از منجمدشدن محیط‌ها، پتری دیش‌ها در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۳ تا ۵ روز، خصوصیات ریخت‌شناسی قارچ‌ها بررسی گردید (۵، ۹). برای خالص‌سازی قارچ‌ها از روش تک‌اسپور استفاده شد. در این روش مقداری از اندام باردهی قارچ درون لوله حاوی آب مقطر سترون ریخته و سریال‌های رقت از آن تهیه گردید. سه قطره از سوسپانسیون رقت نهایی روی محیط کشت آب آگار ریخته و از نقطه شروع تا پایان آن علامت‌گذاری شد، پس از ۸ تا ۱۶ ساعت، پتری‌ها زیر میکروسکوپ بازرسی و تک‌اسپور جوانه زده به دقت برداشته و به پتری‌های جدید حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) منتقل شد. بعد از رشد اسپور روی محیط کشت جدید با توجه به رنگ و نحوه رشد پرگنه‌های حاصل از هرکنیدی تعدادی جدایه بعنوان نماینده انتخاب و شناسایی گردید. جهت شناسایی گونه‌های قارچی با توجه به خصوصیات آن گونه (رنگ پرگنه، میزان رشد ، نوع کنیدی ،شکل کنیدی ،اندازه و...) و با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر انجام گرفت (۸، ۱۹). همچنین جهت اطمینان بیشتر و تایید شناسایی آرایه‌های قارچی از روش‌های مولکولی نیز استفاده شد. نمودارهای فراوانی قارچ‌ها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

روش مولکولی

استخراج DNA ژنومی

مقدار کمی میسیلیوم (حدود mg ۱۵۰ از هر جدایه) به هر میکروتیوب سترون منتقل، ازت مایع جهت یکنواخت‌سازی به میکروتیوب‌ها اضافه و یکنواخت‌سازی درون لوله‌ها به کمک هاون پلاستیکی انجام شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش اصلاح شده Chelex 100 resin انجام شد. مقدار µl ۱۵۰ محلول Chelex 100 resin ۵ ٪ (Bio-Rad, USA) به میکروتیوب‌های حاوی میسیلیوم اضافه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ ثانیه به آرامی ورتکس و در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز نگهداری شدند. پس از یک شبانه روز میکروتیوب‌ها به مدت min ۸ در آب در حال جوش قرار گرفتند و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند سپس برای دومین بار میکروتیوب‌ها به مدت min ۹ در آب جوش قرار گرفتند و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت min ۵ با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند و فاز تشکیل شده در قسمت بالایی لوله‌ها برداشته شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (۱۴، ۲۷).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر بخشی از ناحیه ژنی rDNA با

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده، توالی آغازگرها و ناحیه ژنی (با محصول 530bp).

Primer	position	Locus	Sequence	Reference
ITS4	Reverse	۲۸S	TCCTCCGCTTATTGATATGC	وایت و همکاران (۲۸)
ITS5	Forward	۱۸S	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	وایت و همکاران (۲۸)

استفاده از آغازگرهای ITS۴ و ITS۵ (جدول ۱) به شرح ذیل انجام گرفت. واکنش PCR در ترموسایکلر بایو-رد (USA, Bio-Red, North Carolina) و بر اساس برنامه مورد نظر آغازگرها در حجم ۲۵ µl (شامل ۵ µl از DNA الگو ، ۲,۵ µl بافر x ۱۰، ۰,۲ µl Taq پلیمراز، dNTP ۲ µl، ۱ µl از هر آغازگر، 50mMol Mgcl 2 (با ۳۰ چرخه دمایی در دماي واسرشت‌سازي اوليه ۹۴ درجه سانتی‌گراد براي min ۳، دماي واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد براي s ۴۵، دماي اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت s ۴۵، دماي بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت min ۲، دماي بسط نهايي ۷۲ سانتی‌گراد به مدت min ۵) انجام شد.

بررسی کیفیت تکثیر قطعه DNA با الکتروفورز ژل آگارز

مقدار ۵ µl از محصول PCR با ۲ µl محلول بارگزاری و در داخل هر چاهک ژل آگارز ۱٪ قرار داده شد. الکتروفورز به مدت min ۳۰ و با ولتاژ v ۶۰ ولت به کمک جریان الکتریسیته مستقیم انجام شد. باندهای ظاهر شده روی ژل توسط دستگاه ترانس الومیناتور مشاهده و به طریق دیجیتال عکس‌برداری شد. برای ساخت ژل و همچنین تانک الکتروفورز از بافر TAE (۱X) استفاده شد.

توالی‌یابی و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه‌ها

نمونه‌هایی که قطعه مورد نظر در آن تکثیر شد (شکل ۳)، با استفاده از کیت تخلیص PCR (شرکت بایونیر، کره جنوبی) خالص‌سازی و به روش اتوماتیک سنگر با دستگاه ABI 3730 XL (در شرکت بایونیر کره جنوبی) توالی‌یابی گردید. اطلاعات حاصل از هر توالی به وسیله نرم‌افزار Bioedit ویرایش شدند. بعد از تبدیل کردن توالی‌ها به فرمت FASTA، شباهت توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI با استفاده از ابزار BLAST تعیین شد. جهت بررسی رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های گونه‌های پنی‌سیلیوم، توالی‌های با بیش‌ترین تشابه از GenBank جهت هم ردیفی و برآورد روابط فیلوژنتیک استخراج شدند. هم ردیف کردن توالی‌ها و ترسیم درخت تبارزائی با نرم‌افزار Mega 6 با استفاده از الگوریتم اتصال مجاور (NJ) انجام گردید (۲۵). جهت اطمینان از گروه‌بندی ایجاد شده درخت تبارزائی، شاخص بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار محاسبه شد.

نتایج

تعداد ۹۷ نمونه (۴۵/۸ ٪) فاقد آلودگی قارچی و تعداد ۱۱۵ نمونه (۵۴/۲ ٪) دارای آلودگی قارچی بودند (جدول۲) از ۱۱۵ نمونه دارای آلودگی بیشترین فراوانی آلودگی به ترتیب مربوط به قارچهای پنسیلیوم (۳۳٪)، رایزوپوس (۲۱,۲٪)، آسپرژیلوس (۱۸,۹٪) و

جدول ۲- توزیع فراوانی آلودگی قارچی نمونه های مورد مطالعه بر حسب نوع دان.

نوع دان	مثبت		منفی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سویا	۵۲	۵۱	۵۰	۴۹
ذرت	۶۳	۵۷/۳	۴۷	۴۲/۷
جمع	۱۱۵	۵۴/۲	۹۷	۴۵/۸

x۲=۰/۸۴۴ df=۱ P=۰/ ۳۵۸

جدول ۳- توزیع فراوانی آلودگی قارچی نمونه های مورد مطالعه بر حسب نوع قارچ.

نوع قارچ	مثبت		منفی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
پنی سیلیوم	۷۰	۳۳	۱۴۲	۶۷
رایزوپوس	۴۵	۲۱/۲	۱۶۷	۷۸/۸
آسپرژیلوس	۴۰	۱۸/۹	۱۷۲	۸۱/۱
فوزاریوم	۱۱	۵/۲	۲۰۱	۹۴/۸

فوزاریوم (۵,۲٪) بود (جدول۳). میانگین آلودگی و تعداد پراکندگی قارچی در نمونه‌های مورد مطالعه ۱/۷۷ ±۱/۳۳ بود و بیشترین و کمترین تعداد پرگنه‌های قارچی مربوط به قارچ پنسیلیوم (۱/۱۶ ±۰/۶۱۷) و قارچ فوزاریوم (۰/۴۱۷ ±۰/۰۷۵) بود (شکل ۱). اختلاف معنی‌داری بین میانگین آلودگی و تعداد پرگنه‌های قارچی بر حسب نوع نمونه (سویا ۴۶٪ – ذرت ۵۰٪) مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

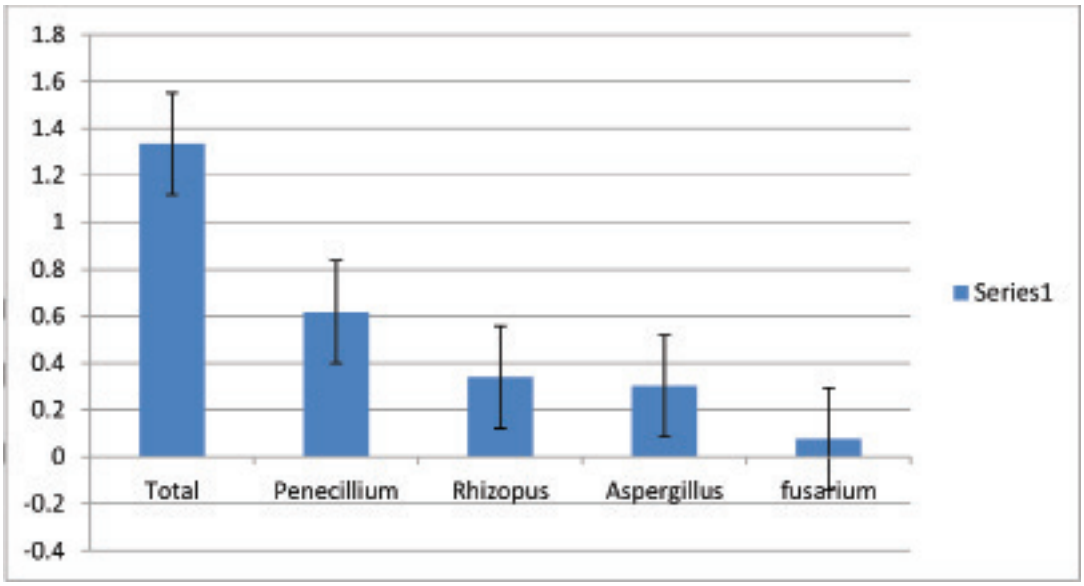
شناسایی جدایه‌های *Penicillium* بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و مولکولی

در این بررسی از میان جدایه‌های جنس *Penicillium* spp. سه جدایه به عنوان نماینده انتخاب و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی گردید. بر اساس صفات مورد بررسی (جدول۴) گونه‌های *P. aurantiogriseum* ، *P.chrysogenum* و *Penicillium* sp. شناسایی شد (شکل‌های ۴-۵). با توجه به تنوع گونه‌ای و عدم شباهت کامل جدایه PG 3 با شماره دسترسی نزدیک‌ترین آرایه‌های بانک ژن درخت تبارزائی تمامی جدایه‌های متعلق به این جنس در مطالعه حاضر ترسیم شد. آنالیز بلاست توالی ناحیه *ITS* جدایه P1 شباهت بالای ۹۹ ٪ به گونه *P. aurantiogrise* به شماره دسترسی Aj 005488 در ژن بانک نشان داد. تجزیه فیلوژنتیکی قرار گیری این جدایه را در کنار گونه *P. aurantiogrise* تایید کرد. آنالیز بلاست توالی ناحیه *ITS* جدایه P2 شباهت بالای ۹۹

جدول ۴- برخی خصوصیات مورفولوژیک جدایه های *Penicillium* spp.

نام جدایه	نام گونه	ساختار فیالید	اندازه کنیدی	اندازه فیالید	شکل کنیدی	طول سلول پایه	شکل فیالید	قطر *کلنی
P1	*P. aurantiogriseum*	Biverticillate	۳-۴ ×۲-۳	۶-۱۱ ×۲-۳	زنجیره ای و گرد	۱۰۰-۱۵۰	آمپولی فرم	۳۰-۲۵
P2	*P.chrysogenum*	Biverticillate	۳-۴	۶-۱۰×۲-۴	گرد	۱۲۰-۲۵۰	آمپولی فرم	۳۷-۲۵
PG3	*Penicillium* sp	Biverticillate	۲-۳	۳-۴×۲-۳	زنجیره ای	۱۱۰-۸۰	آمپولی فرم	۲۶-۲۰

• اندازه گیری قطر کلنی در دمای ۲۵ درجه و بعد از ۷ روز انجام گرفته است.



شکل ۱- میانگین آلودگی و تعداد پراکندگی قارچی جدا شده از نمونه های خوراک ذرت و سویا مرغداری های منطقه بیرجند.

٪ به گونه *P.chrysogenum* به شماره دسترسی LT558876 (جدول۵) در ژن بانک نشان داد. تجزیه فیلوژنتیکی قرارگیری این جدایه را در کنار گونه *P.chrysogenum* تایید کرد (شکل ۲). بلاست توالی ناحیه ITS جدایه PG۳ نشان داد این جدایه ۹۸ ٪ به گونه *Penicillium* sp. به شماره MK461563 در ژن بانک نشان داد. تجزیه فیلوژنتیکی این جدایه نیز قرارگیری این جدایه را در کلاد گونه *Penicillium* sp. تایید کرد. بر اساس آنالیز بلاست توالی ناحیه rDNA، جدایه R۱ حدود ۹۹,۸۲ ٪ تشابه با گونه *Aspergillus flavus* به شماره دسترسی MN238861 در بانک ژن نشان داد. بر اساس آنالیز بلاست توالی ناحیه rDNA، جدایه X حدود ۹۹,۸٪ تشابه با گونه *Fusarium proliferatum* به شماره دسترسی EU821468 در بانک ژن نشان داد که تاییدکننده شناسائی آرایه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی است.

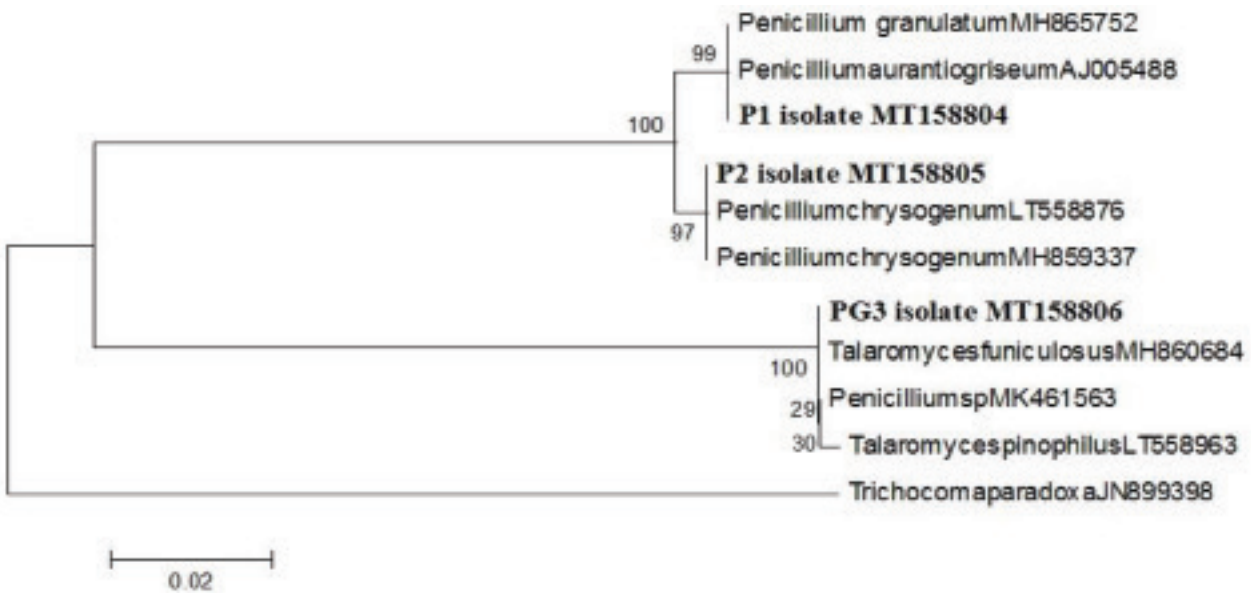
با توجه به شباهت بالای شماره دسترسی جدایه‌های دو آرایه فوق با شماره‌های نزدیک‌ترین آرایه‌های موجود در بانک ژن به این گونه‌ها، عملیات بلاست با شماره دسترسی جدایه‌های معتبر (چاپ شده در نشریات معتبر) انجام شد.

بحث

گونه‌های آرایه‌های *Penicillium*spp. به طور معمول به صورت کپک آبی و سبز رنگ و روی بذور ذرت تولید ظاهر می‌شوند، طوری که چندین گونه از *Penicillium sp.* ذرت را در انبار آلوده می‌کند، اما *Penicillium oxalicum* گونه اصلی است که به دلیل ایجاد پوسیدگی ترش در مزرعه شناخته می‌شود. گونه‌های مانند *P. aurantiogriseum* و *P.viridicatum* در شرایط رطوبتی پایین و در بذور انبار شده ذرت می‌تواند بقا یابد. گونه‌های *Penicillium* در آب و هوای سرد

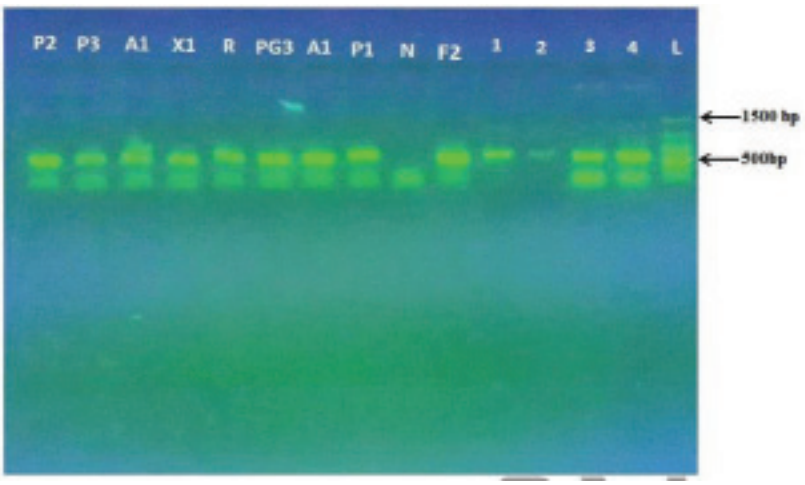
جدول ۵ - خصوصیات مولکولی جدایه های ***Penicillium spp.***

نام جدایه	نام گونه	شماره دسترسی در ژن بانک	ناحیه ژنی
P1	*P. aurantiogriseum*	MT158804	ITS
P2	*P.chrysogenum*	MT158805	ITS
PG3	*Penicillium* sp.	MT158806	ITS



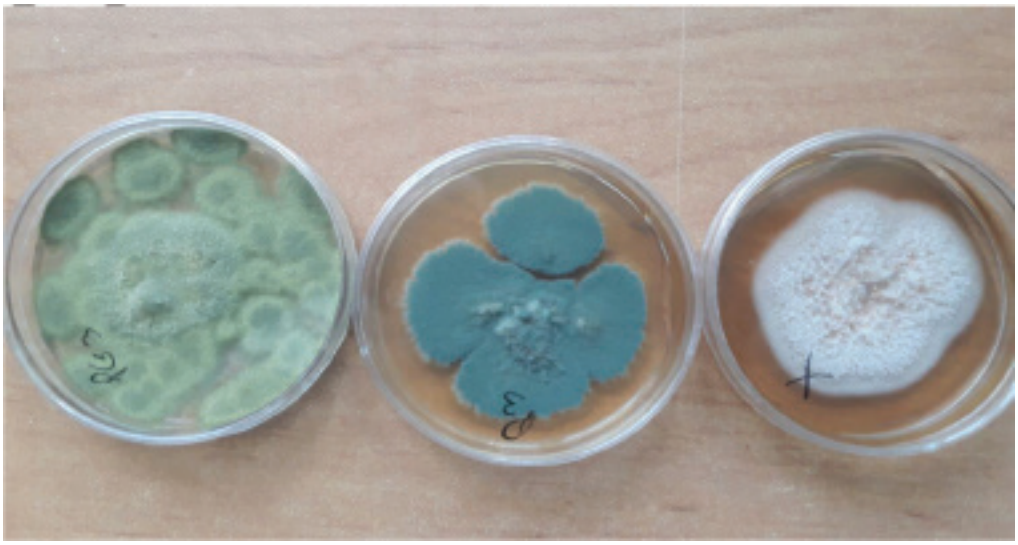
شکل ۲- درخت تبارزائی ترسیم شده بر اساس توالی ژن *ITS* جدایه های ***Penicillium*** **spp. بر اساس رویه Neighbor Joining ((NJ).**

از *Aspergillus* شایع‌ترند. برخی از گونه‌های پنی‌سیلیوم می‌توانند در رطوبت دانه ۱۶ تا ۱۷ ٪ رشد کنند. بیشتر گونه‌های پنی‌سیلیوم با مشکلات مایکوتوکسین موجود در ذرت همراه نیست، اما *Penicillium verrucosum* و *P. viridicatum* می‌توانند اوکرواتوکسین، اسید سیکلوپیازونیک، اسید پنیسیل و اسید سیتریکین تولید کنند. وجود میکوتوکسین‌ها در سال‌های اخیر به عنوان خطر بالقوه برای بهداشت دانه ذرت مورد توجه ویژه قرار گرفته است (۲۱). از نمونه‌های خوراک مخلوط طیور در اسلواکی روی محیط کشت‌های مختلف، گونه‌های متنوعی از جنس‌های قارچی *Penicillium*، *Ulocladium*، *Trichoderma*، *Ulocladium* و *Stachybotrys* جداسازی و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی شناسائی شده‌اند که بیشترین تنوع گونه‌ای مربوط به جنس پنی‌سیلیوم بوده است و بیشترین فراوانی در بین کل گونه‌ها مربوط به *P. aurantiogriseum* (۳۷٪) بوده و گونه *P. chrysogenum* نیز دارای فراوانی ۲۴٪ بوده است (۱۷). بر اساس نتایج پژوهش حاضر نیز بیشترین فراوانی مربوط به جدایه‌های جنس پنی سیلیوم بوده است. جداسازی دیگر قارچ‌ها که متفاوت از پژوهش‌های انجام شده در داخل یا برخی پژوهش‌های خارج از کشور است، احتمالا به دلیل استفاده از محیط کشت‌های انتخابی باشد. گونه‌هایی از جنس آسپرژیلوس از خوراک دام قابل جداسازی هستند که در این بین حدود ۵۰٪ جدایه‌های اسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین هستند (۲۶). جداسازي قارچ اسپرژیلوس فلاووس از آجیل در بنگلادش، ذرت و پنبه دانه در آمریکا، غلات در نیجریه، گندم و ذرت در چین گزارش شده است (۱، ۲، ۷). در حالی که دو گونه فوزاریوم شامل *F. prolifratum* و *F. verticillioides* غالب آلودگی‌های کپکی خوراک ذرت و سویای بدون استفاده در انبارهای مرغداری‌های خرم‌آباد را تشکیل داده‌اند، فراوانی گونه‌های آسپرژیلوس شامل *A. flavus* و *A. niger* جداسازی شده از جیره غذائی آلوده به قارچ در خوراک طیور این منطقه ۷٪ گزارش شده است. گرچه بیشترین درصد فراوانی قارچ‌های آلوده کننده خوراک طیور در حال استفاده مربوط به جدایه‌های *Rhizomucor*، *Absidia* و سپس فوزاریوم بوده است (۳). در مطالعه حاضر فراوانی گونه *A. flavus* در مرغداری‌های منطقه بیرجند حدود ۱۹٪ ارزیابی شده است. بالاترین درصد فراوانی دو گونه آسپرژیلوس آلوده‌کننده خوراک طیور منطقه خرم‌آباد مربوط به دان مخلوط بوده است، در حالی که خوراک ذرت بدون آلودگی و خوراک سویا تنها شامل یک جدایه بوده است. بنابراین احتمالا نوع دان یکی از دلایل تفاوت میزان فراوانی جدایه‌های آسپرژیلوس مطالعه حاضر با پژوهش درویش نیا و همکاران (۳) می‌تواند باشد. جداسازی میزان فراوانی جدایه‌های آسپرژیلوس در انبارهای خوراک طیور گوشتی صربستان ۵۴٪ گزارش شده است. شرایط رطوبتی مساعد برای قارچ، تهویه نامناسب و عدم رعایت اصول انبارداری و خشک کردن دان در مراحل مختلف تولید به عنوان عامل مهم افزایش میزان فراوانی این گونه‌ها ذکر شده است (۳). بر اساس مطالعه درویش نیا و همکاران (۳)، دو گونه فوزاریوم *F.*



شکل ۳- نتایج واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر بخشی از ژن rDNA نمونه های قارچی ذرت و سویای مرغداری های بیرجند روی ژل آگارز رنگ آمیزی شده با Bio-safe stain (با طول bp۵۳۰). ستون *P2: Penicillium chrysogenum*، ستون *P3: Penicillium* sp. ، ستون X۱: *F.proliferatum*، ستون: *A. flavus* R، ستون PG3: *P. sp.* ، ستون A1: *P. aurantiogriseum*، ستون N: کنترل منفی (بدون DNA الگو)، ستون F2 : کنترل مثبت (فوزاریوم بیماری زای پنبه)، ستون L: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. (ستون های ۱ تا ۴، خارج از مطالعه).

prolifratum و *F. verticillioides* موجب تلفات ماکیان می‌شود. بنابراین نحوه نگهداری و ماندگاری خوراک طیور بسته به نوع آن می‌تواند در بروز گونه‌های فوزاریوم نقش داشته باشد و از دلایل تفاوت در میزان فراوانی *F. prolifratum* با نتایج مطالعه حاضر در منطقه بیرجند باشد. در حالی که نتایج مطالعه درویش نیا و همکاران در خرم آباد با نتایج پژوهش تعیین میزان آلودگی قارچی خوراک طیور در مرغداری‌های گوشتی تربت حیدریه (۲۶) که جدایه‌های جنس فوزاریوم را شایع‌ترین آرایه قارچی خوراک طیور گزارش نموده اند، تطابق دارد. آرایه‌های متعلق به جنس‌های پنی‌سیلیوم، کلادوسپوریوم، پیسیلومایسس، آسپرژیلوس و مخمرها نیز به ترتیب جایگاه‌های بعدی را از نظر درصد فراوانی در خوراک طیور بررسی شده منطقه تربت حیدریه داشته‌اند. نویسندگان این مقاله نیز روش‌های نامناسب نگهداری خوراک طیور را عامل مهمی در فراوانی قارچ‌های مولد زهرابه قارچی می‌دانند، البته فصل نمونه‌برداری از خوراک طیور در تغییرات



شکل ۴- پرگنه آرایه های قارچی نمونه های دان مرغ مرغداری های بیرجند. از چپ: *P.chrysogenum*، *F. proliferatum* ، *P. sp.* روی محیط 1/2PDA.

شکل ۵- پرگنه آرایه قارچی *P. aurantiogriseum* جدا شده از جیره غذائی مرغداری های بیرجند.

فراوانی آرایه‌های قارچی منطقه تربت حیدریه نقش داشته است. قارچ *Fusarium proliferatum* درون بذور ذرت بدون علایم قارچی منتشر می‌شود و میکوتوکسین‌های تولیدی آن در بذر، وارد چرخه غذائی طیور می‌شود. این زهرابه‌ها عوارضی سوئی نظیر کاهش رشد، اسهال، سمیت قلبی، کاهش ایمنی بدن، تغییر شکل پاها و افزایش مرگ و میر در طیور دارد. کاربرد نوعی فرمولاسیون محلول از باکتری *Lactobacillus acidophilus* در آبخوری جوجه‌های گوشتی به عنوان روش پیشگیری‌کننده برای سمیت زهرابه *F. proliferatum* توصیه شده است (۲۹). این گونه بالاترین فراوانی در بین سایر گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده از خوراک طیور در اسلواکی در دامنه زمانی سپتامبر ۲۰۰۱ تا آوریل ۲۰۰۲ را داشته است. تمامی گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده بیمارگر بالقوه ذرت و غلات به شمار می‌روند که در ذرت موجب بروز بیماری‌های پوسیدگی ساقه و بلال می‌شوند. شرایط محیطی مانند دما و بارندگی و نحوه انبارداری خوراک طیور از مهم‌ترین عوامل وقوع هر کدام از این گونه‌ها می‌تواند باشد (۱۸). در حالی که گونه *F. subglutinans* بالاترین فراوانی را در نمونه‌های ذرت را در بخش‌های جنوبی اسلواکی داشته است که دلیل آن تداوم بارندگی و دمای خنک‌تر در مزرعه بوده است (۲۲). بنابراین شرایط محیطی در زمان برداشت محصول نیز به عنوان عامل مهمی در تعیین سلامت خوراک طیور باید مدنظر قرار گیرد. کاربرد پرتودرمانی با اشعه گاما به طور معنی‌داری موجب کاهش رشد این گونه قارچی در جیره مرکب طیور شده، به نحوی که خطر در معرض قرار گرفتن دام و انسان را به میکوتوکسین کاهش داده است. اگرچه روش‌های انبارداری جهت نگه‌داری خوراک تا زمان مصرف نیز توصیه شده است (۴). در مقایسه با نتایج پژوهش‌های دیگر، بالاترین فراوانی قارچ‌های جداشده از خوراک طیور در آرژانتین متعلق به آرایه قارچی پنی‌سیلیوم بوده که با نتایج این مطالعه منطبق است ولی با نتایج بررسی قارچ‌های جداشده از خوراک طیور در نیجریه که بالاترین فراوانی مربوط به گونه‌های آسپرژیلوس است، تفاوت دارد. تفاوت فراوانی آرایه‌های قارچی در مطالعات گوناگون می‌تواند در نوع خوراک، شرایط نگهداری و شرایط حمل و نقل باشد (۲۶). بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی گونه *Rhizopus oryzae* از خوراک طیور مرغداری‌های گوشتی منطقه بیرجند جداسازی گردید. قارچ *R. oryzae* به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در جیره غذائی مرغ‌های گوشتی قابل استفاده است (۲۴). جایگزینی جیره غذائی تخمیر شده بر پایه دانه انبه با جداسازی از این آرایه قارچی بجای دان ذرت، باعث تامین انرژی و نیازهای رشدی جوجه‌های گوشتی شده، تاثیر سو در رشد و پارامترهای خونی نداشته، بلکه موجب بهبود مقادیر پروتئین و عناصر غذائی جیره تخمیر شده می‌شود. بنابراین به عنوان نوعی فرمولاسیون در جیره غذائی مرغداری‌ها توصیه شده است به طوری که انتظار می‌رود موجب کاهش هزینه‌ها و سلامت غذا گردد (۱۵). گرچه احتمالا تنوع زیستی آنتاگونیست‌های موجود در انواع خوراک و نوع محیط‌های کشت به کار رفته در پژوهش‌های انجام شده جهت جداسازی قارچ‌ها نیز می‌تواند در تنوع قارچ‌های جداسازی شده موثر بوده و توجیه‌کننده بخشی از عدم هم‌خوانی نتایج در زمینه تغییرات نوع و درصد فراوانی آرایه‌های قارچی باشد. با توجه به این که در برخی مرغداری‌ها احتمال دارد فاصله دوره‌های جوجه‌ریزی زیاد باشد و در نتیجه تغذیه طیور از خوراک با دوره ماندگاری بالا انجام شود، لذا پیشنهاد می‌شود پژوهش دیگری در ارتباط با جداسازی و شناسائی قارچ‌های مولد زهرابه‌های قارچی آلوده‌کننده خوراک طیور مانده در ارتباط با نرخ وقوع بیماری‌هایی چون لنگش جوجه‌ها، که در نتیجه کاهش سیستم ایمنی طیور و متعاقبا کاهش سطح ویتامین دی رخ می‌دهد، نیز این مرغداری‌ها از ابتدای چرخه تولید انجام شود. با توجه یکسان نبودن شرایط محیطی انبارها در منطقه، کاربرد چند نوبت جیره مختلف در یک فصل جوجه‌ریزی، تفاوت در نتایج پژوهش در زمینه تنوع و درصد قارچ‌های جداسازی شده قابل انتظار است که خود از مشکلات اجرای این نوع مطالعات می‌باشد. بنابراین شرایط انبارداری مرغداری‌ها باید بر اساس دستورالعمل استاندارد یکسان با تاکید بر کاهش زمان انبارداری صورت گیرد. از طرفی با استفاده از محیط کشت‌های انتخابی یا نیمه انتخابی باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست جداسازی و در مراحل بعد تاثیر آنها روی قارچ‌های آلوده‌کننده دان مرغ بررسی شود. همچنین از جدایه‌های قارچ *Rhizopus oryzae* به صورت فرمولاسیون بومی سازی شده در جیره طیور در راستای کاهش هزینه‌های تولید و سلامت غذائی استفاده و در مراحل بعدی انبوه‌سازی شود.

نتیجه‌گیری کلی

شناخت و کنترل عوامل میکروبی آلوده‌کننده خوراک طیور در سلامت مصرف‌کنندگان فرآورده‌های آن امری ضروری است. بر اساس نتایج این پژوهش چندین آرایه متنوع قارچی از خوراک طیور مرغداری‌های بیرجند جداسازی و شناسائی شد. بنابراین بر اساس شناسائی این آرایه‌ها، فرآیندهای لازم در خصوص کنترل آلودگی‌ها شامل روش‌های بیولوژیکی و کنترل شرایط محیط منطبق بر نیازهای دمائی و رشدی آرایه‌ها در مراحل انبارداری خوراک باید اعمال گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح پژوهشی با کد پژوهشی ۴۱۲۹ و کد اخلاق Ir.bums.REC. 1395.184 بوده که با پشتیبانی مالی و اداری معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بیرجند انجام شده است که مولفین تشکر و سپاسگزاری از آن‌ها را وظیفه اخلاقی و علمی خود می‌دانند. از زحمات آقای مهندس هادی محمودی محقق مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی جهت همکاری در مراحل اجرای پروژه قدردانی می‌گردد. از داوران محترم که با ارائه نقطه نظرات دقیق و ارزشمند خود به بهبود ساختار و نکات فنی مقاله کمک شایانی نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Abbas H.K., R.M. Zablotowicz, M.A. Wearver, B.W. Horn, W. Xie and W.T. Shier .2004. Comparison of cultural and analyti-

cal methods for determination of production by Mississipi Delta *Aspergillus* isolates. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 193-199.

2. Cotty PJ. 1994. Influence of field application of an aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84: 1270-1277.

3. Darvishnia R., M. Darvishnia and M.H. Gharouni. 2019. Investigating the toxicity of fungi isolated from livestock feed and poultry in Khorramabad county. *Biological Journal of Microorganism* 31: 51-69. (in Persian).

4. Deepthi B.V., A. P. Gnanaprakash and M.Y. Sreenivasa. Effect of c-irradiation on fumonisin producing *Fusarium* associated with animal and poultry feed mixtures. *Biotech* 7: 2-8.

5. Ezekwueche S.N., C.U. Umedum, C.C. Uba and I.S. Anagor. 2018. Fungi Isolated from Poultry Droppings Express Antagonism against Clinical Bacteria Isolates. *Microbiology Research Journal International* 26:1-8.

6. Fadaeifard F., M. Raiisy, H. Koorangi, E. Rahimi and R. Pirzadeh. 2013. Determination of Ochratoxin A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed in Chaharmahal Va Bakhtiary province by ELISA assay. *Food Hygiene* 2: 71-79. (in Persian).

7. Fakruddin M., A. Chowdhury, M.N. Hossain and M.M. Ahmed. 2015. Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. *Springerplus* 4:159.

8. Frisvad J.C. and R.A. Samson. 2005. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*, a guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins, *Studies in Mycology*. 49: 1–173.

9. Ghaemmaghami S.S., M. Modirsaneii, A.R. Khosravi and M. Razzaghi-Abyaneh M. 2016. Study on mycoflora of poultry feed ingredients and finished feed in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 8:47-54.

10. Greco M.V., M.L. Franchi, S.L. Rico Golba, A.G. Pardo and G.N.Pose. 2014. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. *Scientific World Journal* 2014: 1-9.

11. Greeff-Laubscher M.R., I. Beukes, G. J. Marais and K. Jacobs. 2020. Mycotoxin production by three different toxigenic fungi genera on formulated abalone feed and the effect of an aquatic environment on fumonisins. *Mycology* 11: 105-11.

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

13. Halt M. 1994. *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 in flour production. *European Journal of Epidemiology* 11: 555–558.

14. Hirata T. and S. Takamatsu. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37: 265– 270.

15. Ibrahim A.d., A. Mahmuda, A.A. Farouq, M.J. Muazu, R.M. Aliyu, I.M. Saadat and A.A. Aliero. 2018. Effects of Replacing Maize with *Rhizopus Oryzae* Fermented Mangifera Indica Seed Kernels on Broilers Chicken Growth Performance. *Nutrition and Food Science International Journal*. 4: 103-109.

16. Iram S., S.K. Fareed, M. Chaudhary, M.N. Igbal, R. Ghani, T.A. Khan and T. Abbas. 2019. Identification of *Aspergillus flavus* and aflatoxin in home mix layer poultry feed in relation to seasons in Karachi, Pakistan. *Tropical Animal Health and Production* 51: 1321–1327.

17. Labuda R., D. Tancinova and K. Hudec. 2003. Identification and enumeration of Fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10: 61-66.

18. Labuda R and D. Tancinova. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13: 193-200.

19. Leslie J.F. and B.A. Summerell. 2006. The Fusarium laboratory manual, Third Edition, Blackwell Publishing Professional, Ames.

20. Magnoli C.E. and C.A. da Rocha Rosa. 2013. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 57:405-411.

21. Munkvold G.P., A. Silvina, I. Taschl and C. Gruber-Dorninger. 2019. Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management In: Corn: Chemistry and Technology, Third Edition, Pages 235-287.

22. Piecková E. and Z. Jesenská. 2001. *Fusarium moniliforme*, *Fusarium subglutinans* and *Aspergillus flavus* in maize products in Slovakia. *Czech Mycology* 53: 229-235.

23. Salehan Z., S. Eidi, M. Mohsenzadeh and M. Azizzadeh. 2018. Determination of fungal contamination of poultry feed and its ingredients in broiler farms in Torbat-Heydarieh, Khorasan Razavi province, Iran. *Journal of Veterinary Research* 72: 447-456.

24. Sugiharto S. 2019. A review of filamentous fungi in broiler production. *Annals of Agricultural Sciences*. 64: 1-8.

25. Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and Kumar, S.

2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725-2729.

26. Variane A.C.F., F.C. Santos, F.F. Castro, I.P. Barbosa-Tessmann, G.T. Santos and M.S. Santos Pozza. 2018. The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in dairy cattle feed in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 49 919–928.

27. Walsh P.S., DA. Metzger and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506–13.

28. White T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Inc.

29. Wu W. 1997. Counteracting *Fusarium proliferatum* toxicity in broiler chicks by supplementing drinking water with Poultry Aid Plus®. *Poultry Science* 76: 463–468.