الكشف السريع لعزلات *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الافلاتوكسين باستعمال الأشعة فوق البنفسجية UV light وعلى أوساط زرعية مختلفة

*خالد عبد الرزاق حبيب** *شيماء إسماعيل كاظم**

استلام البحث 4، حزيران، 2012
قبول النشر 17، نيسان، 2013

الخلاصة:
شملت الدراسة التحري عن عزلات الفطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسم الافلاتوكسين المرافقة لحبوب الرز الأمريكي والذرة الصفراء المباعة في الأسواق المحلية من خلال الكشف السريع عنها باستعمال الأشعة فوق البنفسجية UV light وبطول موجي 365 نانوميتر وباستعمال أوساط زرعية مختلفة هي Potato Dextrose Agar (PDA) وYeast Extract Agar (YEA) وCoconut Agar (COA) وCzapek Dox Agar (CDA) .شخصت 107 عزلة فطرية في عينات الرز الأمريكي المستورد و147 عزلة فطرية في عينات الذرة الصفراء ،كان عدد الأجناس الفطرية المرافقة للحبوب 4 اجناس و7 أنواع تمثلت الأجناس الفطرية بكل من *Penicillium* ,*Neurospora* ,*Fusarium* ,*Aspergillus* .كان الجنس *Aspergillus* هو السائد في جميع عينات الرز الأمريكي إذ سجل أعلى نسبة وجود بلغت 0.47% إما ترددة فقد كان 11.75% إما عينات الذرة الصفراء فقد كان الفطر *Neurospora* هو الأكثر وجودا والأعلى ترددا إذ بلغت نسبة وجوده 1.09% وترددة27.25% .كما أظهرت النتائج بان 20 عزلة *A. flavus* من أصل 50 عزلة لها القابلية على إنتاج سموم الافلاتوكسين كما أظهرت النتائج بان أفضل وسط للكشف عن إنتاج السم هو وسط (COA) يليه وسط (PDA) ثم وسط (YEA) .إما أفضل درجة حرارة لنمو العزلة *A. flavus* وإنتاج السم فقد كانت 35م ° وأفضل مدة حضن للنمو وإنتاج السم كانت 7 أيام.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus flavus*, Rice, Aflatoxins, UV, corn

المقدمة:

يعد الرز *Oryza sativa L.* (Rice) من محاصيل الحبوب المهمة في العالم والعراق اذ يشكل الوجبة الغذائية الرئيسة لأكثر من نصف سكان العالم [1]. كما تعد الذرة *Zea maize L.* (Corn) واحدة من أهم مجاميع الحبوب في العالم التي تستعمل غذاء للإنسان والحيوان و لها منتجات صناعية عديدة مثل (نشا الذرة)[2] .

تتعرض الحبوب ومنها الرز والذرة الصفراء لنشاط العديد من الفطريات في الحقل وخلال عمليات الحصاد وفي أثناء النقل وعند الخزن قبل وبعد إجراء العمليات التصنيعية عليها، وتختلف هذه الفطريات كما ونوعا باختلاف الظروف البيئية من درجة حرارة ورطوبة [4,3] .

ويعد الفطر *Aspergillus* Micheli من الفطريات التي تسبب أضرارا كبيرة لحبوب الرز ، الحنطة ،الذرة ،فول الصويا والقطن. تكمن خطورة هذا الفطر بإنتاجه لايضات ثانوية تعرف بالافلاتوكسينات (Aflatoxins) التي تنتج من الانواع *A.parasiticus,A.flavus* و*A.nominus* [5].

ولكون هذه الافلاتوكسينات ذات سمية عالية وفعالية مسرطنة ،لذا جاءت الحاجة لتطوير العديد من الطرائق للكشف عن وجود الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في الأغذية الملوثة.

إذ إنه ليس لجميع سلالات ال *Aspergillus* القدرة على إنتاج هذه السموم ،وهذا يتطلب إجراء العديد من التقنيات للتحري والكشف عن الفعالية السمية للاعفان الملوثة للغذاء[5] .

هنالك طرائق مختلفة للكشف عن وجود العزلات الفطرية الملوثة للحبوب كالطريقة المباشرة التي تعتمد على فحص الحبوب بالعين المجردة ومن ثم استعمال المجهر الضوئي للكشف عن وجود الغزل الفطري للفطر *A.flavus* [6] كما يمكن استعمال الفحص المباشر بالأشعة فوق البنفسجية (UV) إذ وجد إن الحبوب عند تعرضها للإصابة بالفطر *A.flavus* تظهر تألقا اصفرا مخضرا تحت الأشعة فوق البنفسجية وقد اعتمدت هذه الطريقة بوصفها فحصا مباشرا للكشف عن الحبوب المتعرضة للإصابة بالفطر [7] .

اما طريقة الزرع المباشر للحبوب على أوساط غذائية خاصة فيمكن الكشف بوساطتها عن وجود الفطر خلال 5-7 أيام وتتأثر هذه الطريقة بعاملين هما درجة الحرارة ومدة الحضن [8] .

لذا هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن العزلات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في حبوب الرز والذرة

*كلية العلوم للبنات /جامعة بغداد

في الأسواق المحلية بطريقة مبسطة اعتمدت على استعمال أنواع من الأوساط الزرعية التي تحفز إنتاج سموم الافلاتوكسين والكشف عنها بالأشعة فوق البنفسجية باستعمال جهاز (UV monitor) وبطول موجي 365 نانوميتر،ومعرفة درجة الحرارة ومدة الحضن المثلى للنمو وإنتاج السم.

المواد وطرائق العمل :

1- تحضير الأوساط الزراعية :- حضرت الأوساط الزراعية (PDA) و(CDA) و(YEA) بحسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid) وعقمت بجهاز الموصدة تحت ضغط 15 بار/انج^2 وحرارة 121م°لمدة 15 دقيقة ، إما وسط (COA) فقد حضر بوزن 100 غرام من مسحوق جوز الهند ومجانسته مع 300 مليليتر من الماء الحار ورشح خلال قطعة من الشاش وأكمل حجم الراشح إلى 300 مليليتر ثم أضيف له مادة الاكار بنسبة 1.5% ثم عقم بجهاز الموصدة تحت ظروف التعقيم السابقة نفسها[9] . وبعد انتهاء عملية التعقيم تم تبريد الأوساط إلى 45 م° ثم أضيف المضاد الحيوي chloramphenicolلمنع نمو البكتريا [10] ثم وزعت الأوساط بأطباق بتري معقمة لتتصلب .

2-جمع العينات:-تم الحصول على عينات الرز المستورد (الأمريكي) والذرة الصفراء من الأسواق المحلية لمدينة بغداد وبكمية 2كغم لكل نموذج، وضعت جميع العينات في أكياس من البولي اثيلين واحكم غلقها ، نقلت إلى المختبر لإجراء عزل وتشخيص الفطريات وتقدير العدد الكلي لها ، ثم خزنت العينات بدرجة حرارة المختبر(25م°) .

3-عزل وتشخيص الفطريات:-اتبعت طريقة [11] أذ تم اخذ 200 حبة من كل من عينات الرز و عينات الذرة وعقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2%لمدة دقيقتين ، بعدها رفعت الحبوب وغسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم ثم جففت باستعمال ورق النشاف المعقم [12] ووزعت على اطباق بتري قياس 9 سم وبواقع 5 حبات للطبق الواحد لحبوب الذرة و10 حبات للرز ، أجريت هذه الطريقة باستعمال وسط مستخلص البطاطا (PDA) وحضنت الأطباق تحت درجة حرارة (28) م°لمدة (5-7) أيام وبعد مدة الحضانة جرى عزل الفطريات المختلفة من الأطباق بأخذ مسحة من الابواغ وتنميتها في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الزراعي (PDA) المائل وحضنت تحت درجة الحرارة والوقت السابقين نفسيهما ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4م الى حين تشخيصها .

تم تشخيص الانواع المعزولة بحسب المفاتيح التصنيفية [15,14,13] .

كما تم حساب النسبة المئوية لكل من التردد والوجود لكل الاجناس المعزولة والمشخصة وبحسب المعادلات الاتية :-[16]

التردد % = (frequency) عددالعزلات لكل جنس / عدد العزلات لكل الاجناس ×100

التواجد% = (occurrence) عدد النماذج التي تحتوي الجنس / العدد الكلي للنماذج ×100

4-الكشف عن عزلات *A. flavus* المنتجة لسموم الافلاتوكسين:-

تم الكشف عن العزلات المنتجة لسم الافلاتوكسين باستعمال جهاز (Ultra Violet monitor) اذ زرعت العزلات المشخصة على أربعة أنواع من الأوساط الزراعية هي (PDA) و (YEA) و (CAM) و (CDA) وحضنت لمدة 7 أيام بدرجة حرارة 28م°وبعد انتهاء مدة الحضانة عرضت الأطباق للأشعة فوق البنفسجية (UV. Light) وبطول موجي (365) نانوميتر إذ إن إنتاج سم الافلاتوكسين يعتمد على وجود حلقة مضيئة من ضوء ازرق لامع أو ضوء ازرق مخضر حول المستعمرة النامية عند مشاهدتها تحت الأشعة فوق البنفسجية[17] .

5-تم اختيار اكفأ العزلات المنتجة لسم الافلاتوكسين لدراسة تأثير كل من درجة الحرارة ومدة الحضن في النمو وإنتاج السم، واختير وسط ال(PDA) للقيام بهذه التجارب .

أ- درس تأثير درجات حرارة مختلفة تراوحت بين (20و25و30و35و40)م°، أذ تمت تنمية العزلة المنتجة للسم على وسط (PDA) في درجات الحرارة المختلفة ومدة حضن 7 أيام ، ثم قيست أقطار المستعمرات النامية واختبر إنتاج السم لكل معاملة وسجلت النتائج.

ب- درس تأثير اوقات حضن مختلفة تراوحت بين (2و3و4و5و6و7)أيام .إذ تمت تنمية العزلة المنتجة للسم على وسط (PDA) وبدرجة حرارة 30م°ولاوقات حضن مختلفة، ثم قيست أقطار المستعمرات النامية واختبر إنتاج السم لكل معاملة وسجلت النتائج.

النتائج والمناقشة:

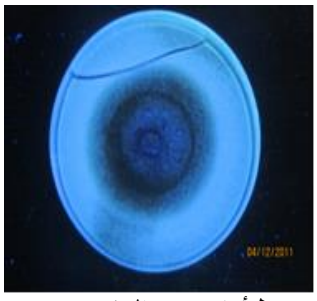
يوضح الجدول (1) أعداد الفطريات وأنواعها في عينات الرز الأمريكي والذرة الصفراء . كما يوضح النسبة المئوية لكل من التردد والوجود لهذه الفطريات .ففي عينات الرز الأمريكي كان النوع

السائد هو *A. flavus* بتردد 11.75 % ووجود 0.47 % يليه *Penicillium sp.* بتردد 8 % وتواجد 0.32 % ثم *A. fumigatus* بتردد 4% وتواجد 0.16 % ثم *A. niger* بتردد 3% ووجود 0.12 % .اما في عينات الذرة الصفراء فقد كان جنس *Neurospora* هو الأكثر وجودا 1.09 % وبتردد 27.25 % يليه *A. fumigatus* بتردد 6.75 % ووجود 0.27 % ثم *A. niger* بتردد 1% ووجود 0.04 % ثم كل من *A. flavus* و *Fusarium sp.* بتردد 0.75 % ووجود 0.03 % واخيرا *A. terrus* بتردد 0.25 % ووجود 0.01%

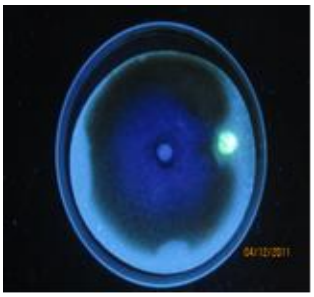
جدول (1) أعداد وأنواع الفطريات المعزولة من الرز الأمريكي والذرة الصفراء النامية على وسط (PDA) بدرجة حرارة 28م ◦ ومدة حضن (7) ايام

المصدر Source	نوع الفطر Fungs spp.	عدد العزلات No.of Isolates	التردد Frequency %	التواجد Occurrence %
الرز الأمريكي Rice	*A. flavus*	47	%11.75	%0.47
	A. fumigatus	16	%4	%0.16
	A. niger	12	%3	%0.12
مجموع العزلات 107 عزلة	*Penicillium sp.*	32	%8	%0.32
الذرة الصفراء Corn	*A. terrus*	1	%0.25	%0.01
	A. flavus	3	%0.75	%0.03
	A. fumigatus	27	%6.75	%0.27
	A. niger	4	%1	%0.04
	Fusarium sp.	3	%0.75	%0.03
مجموع العزلات 147عزلة	*Neurospora sp.*	109	%27.25	%1.09

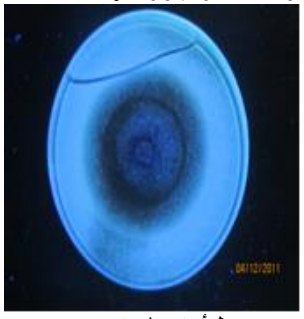
كما أظهرت النتائج إن 20 عزلة فقط من أصل 50 عزلة من عزلات *A. flavus* كانت منتجة لسم الافلاتوكسين اما البقية فلم تكن منتجة للسم وذلك من خلال تعريض الأطباق الحاوية على المستعمرات الفطرية النقية لجميع عزلات *A. flavus* المختلفة إلى الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 365 نانوميتر فالعزلات المنتجة للسم أظهرت حلقة مضيئة من ضوء ازرق لامع ، إما المستعمرات غير المنتجة للسم فلم تظهر أي تألق.كما أظهرت النتائج بان أفضل وسط زرعي يستعمل للكشف عن إنتاج السم هو وسط أكار جوز الهند(COA) ثم يليه الوسط(PDA) ثم وسط(YEA) إما الوسط (CDA) فلم يكن جيدا للكشف عن السم وكما موضح في الصور الاتية.



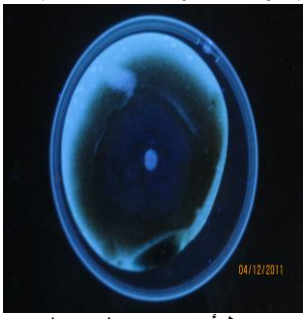
أ-وسط أكار جوز الهند



ب-وسط اكار مستخلص البطاطا



ج-وسط أكار الجابكس



د-وسط أكار مستخلص الخميرة

شكل (1) شدة التألق للعزلة *A. flavus* المنتجة للافلاتوكسين تحت الأشعة فوق البنفسجية النامية على أوساط مختلفة بدرجة حرارة 28م ◦ ومدة حضن (7) ايام

كما تشير النتائج إلى إن أفضل درجة حرارة لنمو الفطر *A. flavus* وإنتاج سم الافلاتوكسين هي 35م°،جدول (2). إما أفضل مدة حضن للنمو وإنتاج سم الافلاتوكسين من العزلة *A. flavus* فهي 7 أيام جدول (3) .

جدول (2) تأثير درجات الحرارة المختلفة في شدة التألق وشدة النمو للعزلة *A. flavus* النامية على وسط(PDA) ومدة حضن (7) ايام

درجة الحرارة م°	شدة النمو	شدة التالق
20	ضعيف(+)	لايوجد(-)
25	جيد(++)	جيد(++)
30	جيد(++)	جيد(++)
35	جيد جدا(+++)	جيد جدا(+++)
40	ضعيف(+)	لايوجد(-)

جدول (3) تأثير اوقات الحضانة المختلفة في شدة التألق وشدة النمو للعزلة *A.flavus* النامية على وسط(PDA) بدرجة حرارة 28م °

مدة الحضن	شدة النمو	شدة التالق
2	ضعيف جدا(-)	لايوجد(-)
3	ضعيف جدا(-)	لايوجد(-)
4	جيد(+)	لايوجد(-)
5	جيد(+)	جيد(++)
6	جيد جدا(+++)	جيد(++)
7	جيد جدا(+++)	جيد جدا(+++)

إن هذه النتائج جاءت موافقة للعديد من نتائج الدراسات السابقة إذ أشار كل من [20,19,18] في دراستهم الى ان نصف سلالات الفطر *A.flavus* و *A.parasiticus* تقريبا لها القدرة على إنتاج سموم الافلاتوكسين تحت ظروف مثالية ومتشابهة كما أشار [21] في دراسته إلى وجود سم الافلاتوكسين من نوع (B1,B2,G1,G2) وسم الاوكراتوكسين (A) وسم الزيرالينون (A) في 121 عينة غذاء مصنوعة من حبوب الذرة في البرازيل و وجد أن أعلى نسبة تردد ووجود لسم (AFB1)كانت في عينات الشامية .

يعد استعمال الاشعة فوق البنفسجية (UV) طريقة سهلة وسريعة لتشخيص الاعفان المنتجة للافلاتوكسينات اذ اشارت هذه النتائج الى العلاقة بين امتصاص الاشعة فوق البنفسجية من مستعمرات الفطر *A. flavus* و انتاج الافلاتوكسينات، وهي ايضا طريقة امنة للتحري عن الاعفان السامة دون الحاجة الى رفع غطاء الطبق .وبوساطة هذه الطريقة تظهر السلالات المنتجة للافلاتوكسينات بلون رمادي الى اسود تحت الاشعة فوق البنفسجية، في حين تبدو السلالات غير المنتجة للسموم بلون ابيض .ابحاث سابقة اشارت الى ان نوع الافلاتوكسين المنتج الذي يتم الكشف عنه بطريقة امتصاص الاشعة فوق البنفسجية هو aflatoxins B1 وaflatoxins G1 بشكل رئيس[17] .

يمكن استعمال هذه الطريقة للكشف عن السموم على المستعمرات الصغيرة ايضا التي تتكون بعد يوم ونصف على وسط جوز الهند فضلا عن امكانية فحص عدة مستعمرات متكونة في طبق واحد [22] .أشارت الدراسات السابقة[25,24,23] الى ان أفضل وسط زرعي للكشف عن إنتاج سموم الافلاتوكسين هو وسط أكار جوز الهند (COA) ووصفته بأنه طريقة سريعة للكشف عن السموم فضلا عن النمو السريع للفطر على هذا الوسط وذلك يعود الى حساسية الفطر *Aspergillus* إلى مكونات الوسط الزراعي الذي ينمو عليه،اذ اظهرت السلالات المنتجة للافلاتوكسينات التي حصلنا عليها في بحثنا هذا تألقا ازرقا واضحا على وسط (COA).

و إن أفضل درجة حرارة لنمو الفطر*A.flavus* هي 35 م°وان أفضل مدة حضن هي 7 أيام وهذه النتيجة جاءت موافقة لدراسة [9] الذي اكد افضلية هذه الدرجة35 م° ، اذ ان درجة الحرارة 20م° تؤثر في شدة التألق اما درجة الحرارة 40م°فقد ادت الى خفض انتاج الافلاتوكسين في حين كانت درجات الحرارة 25-35 م° هي المفضلة لانتاج الافلاتوكسين .

المصادر :

1-International Rice Research Institute.(IRRI). 1993 .Rice human nutrition.148pp.

2-Sauer, B.D. and J. Tuite, 1986. Condition that effect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin stored maize . aflatoxin in maize Aprceeding of workshop, EL-Batan ,D F.Mexico,April,7-11:pp.41-50.

3-Silva, J.B., Pozzi, C.R. Mallozzi, M.A.B. E.M. Ortega,B.Correa and da Silva .2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum.J.Agri.and food Chem.,48 (9):4352-4356.

4-Tancinova, D., Kacaniova M. and S. Javorekova. 2001. Natural occurrence of fungi in feeding wheat after harvest and during storage in the agricultural farm facilities. Biologia ,56(3): 247-250.

5-Rashid, M., Khalil,S. Ayub, N. Ahmed W. and A.Khan. 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics . Pak .J .Bot.,40(5):2177-2192.

6-Mycock ,J. Rukenberg ,F.H. and Berjak ,P. 1990. Infection of maize seedlings of *Aspergillus flavus* seed.Sci.technol.18:693-695.

7- Wicklow ,D.Tawd Hesseltive ,C.W. 1979. Fluorescence produced by *Aspergillus flavus* in association with other fungi in autoclaved corn kernels .ohyto .69: 589-592.

8-Yang, Z.Y., Shim, A. Wonbo, A. Kim, Hum, J. Park, A. Seon-ja,Kang, Sunjo, Nam, A. Baik-Sang and Chunga Duck-Hwea. 2004. Detection of aflatoxin producing moulds in Korean fermented foods and grains by multiplex PCR.J.food protect.,67(11): 2622-2626.

9-Saito, M.and Machida, S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus* by ammonia vapor . Mycoscience 40 :205-208.

10-Kumar, S.,M. Shekhar, KA.Ali, and Sharma. P. 2007. A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain .Ind. phytopathol.1:31-34.

11-Shetty, S.A.and H.S.Shetty. 1988. Development and evalution of method for detection of seed borne fungi in rice . Seed sci .and technol. 16:693-698.

12-Pitt,J .I.,A.D. Hocking, K.A., Samson and King A.D. 1992. Recommended methods for mycological examination of foods. In:Modren methods in food mycology. (Samson, A.D.,A.D. Hocking ,J.I.Pitt and A.D.King ,Eds.) pp.365-368. Elsevier, Amsterdam.

13- Raper,K.B.and Fennell, D.I. 1965: The genus *Aspergillus*. 685pp. Williams & Wilkins comp. Baltimore. USA.

14-Ellis,M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. 605pp. Common wealth mycological Institue. kew, surreg, England.

15-Ramirez, C. 1982. Manual and atlas of the Penicillia .874pp.Elsevier biomedical press. Oxford.

16- Pitt,J.I.and Hocking ,A.D.,1997. Fungi and Food spoilage .Blackie academic & Professional, London .U.K.

17-Yabe,K ., Ando, Y. Itoand, M. Terakado. N. 1987. Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography. Appl. Environ.Microbiol.53(2):230-234.

18-Quinn, P.J.,Sorter,J.R.,Markey ,B.K.and Carter,J.R. 1994. Clinical veterinary Microbiology, Mosby Europe. Year book limited.

19-Okazaki,H.and Saito,M. 1992. population levels of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus* in field soils in two areas of Kyushu Ann. phytopath. Soc. Japan., 58:208-213.

20- يحيى ، عبد الغني ابراهيم ،محمد، غنيمة صادق، والجرموندي، تارة شاكر. 2010. الكشف عن التلوث بالفطريات وسم افلا B1 في فستق الحقل المحمص بأستعمال تقنية الاليزا. المجلة العراقية للتقانات الحياتية. 9 (3):534.-547

21-Sekiyama, B. L., Ribeiro, A.B. Machins P.A. and M.M. Junior. 2005. Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in maize-based food products .Brazilian J. of Microbiol. 36:289-294.

22-Paul, A. Lemke, Norman D. Davis, and Gregory W.Creech. 1989. Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species. Appl. Environ. Microbiol. 55(7):1808-1810.

23-Lin, M .T.,and Dianese ,J.C. 1976. Acoconut agar medium for rapid

Environ. Microbiol. 53(7):1593-1595.

25-Yazdani ,D.,M.A. Zainal Abidin, Y.H. Tan, and Kamaruzaman.S. 2010.Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates. African J.of Biotechnolog. 9 (45):7654-7659.

detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phyto.66:1466-1469.

24-Davis ,N. D., lyer, S.K. and Diener. U.L. 1987. Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium .Appl.

Rapid Detection of *Aspergillus flavus* isolates producing aflatoxin using UV light on different culture media

Khalid A. Habeb* ***Shaymaa I. Kadhim****

*University of Baghdad / College of Science for women

Abstract:

This study included the isolation and identification *of Aspergillus flavus* isolates associated with imported American rice grains and local corn grains which collected from local markets, using UV light with 365 nm wave length and different media (PDA, YEA, COA, and CDA).

One hundred and seven fungal isolates were identified in rice and 147 isolates in corn.4 genera and 7 species were associated with grains, the genera were *Aspergillus ,Fusarium ,Neurospora ,Penicillium* . *Aspergillus* was dominant with occurrence of 0.47% and frequency of 11.75% in rice grains whereas in corn grains the genus *Neurospora* was dominant with

occurrence of 1.09% and frequency 27.25% ,results revealed that 20 isolates out of 50 *A. flavus* isolates were able to produce aflatoxin .results also indicated that the best medium for toxin production was (COA) followed by (PDA and YEA), whereas the suitable temperature and incubation period for toxin production was 35◦c and 7 days.