The role of carbon, nitrogen and for cuddling on the production of aflatoxin in isolates LAN's*Aspergillusparasiticus, Aspergillusflavus*

دورالكاربون والنتروجين ومدة الحضن على أنتاج الأفلأتوكسين في العزلتين المحليتين *Aspergillus parasiticus, Aspergillus flavus*

سراب فاضل حسين
جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة

الخلاصة:

اخذت كمية من حبوب الذرة الصفراء من الاسواق المحلية (الدهان) ،عزل وشخص الفطرين *Aspergillus parasiticus* و*Aspergillus flavus* ،وأجريت دراسة حول الفطرين لمعرفة تأثير بعض مصادر الكاربون والنيتروجين ومدة الحضن المختلفة مما له تأثير في زيادة او نقصان بانتاج الافلاتوكسين في العزلتين *Aspergillus parasiticus, Aspergillus flavus*،وظهر أن الفطر *Aspergillus flavus* أن أكثر مصدر كاربون سبب زيادة في انتاج الافلاتوكسين بوجود سكر اللاكتوز،وأقل انتاج بوجود نشا وسكروز وكلوكوز ولايوجد انتاج في معاملة السيطرة لفقدانها مصدر الكاربون والتي تحتاجها الفطريات في نموها الاعتيادي.وقد ظهر ان اكثر مصدر نيتروجين لأنتاج السم خلاصة الخميرة ويليه كبريتات الامونيوم واقل بوجود ببتون ونترات البوتاسيوم وانعدام الانتاج في معاملة السيطرة لفقدانها مصدر النيتروجين الضروري لنمو الفطريات.وكانت مدة الحضن 7ايام أكثر انتاج للافلاتوكسين ويليه 5 و9 و11يوم ،أما في اليوم 3 أقل انتاج.

وقد أظهر الفطر *Aspergillus parasiticus*أن أكثر مصدر كاربون سبب زياده في السم كان باستخدام سكروز ويليه لاكتوز وأقل بوجود النشأ وعدم الانتاج باستخدام كلوكوز ومعاملة السيطرة.وظهر أن اكثر مصدر نيتروجين سبب زيادة بانتاج السم باستخدام خلاصة الخميرة ويليه كبريتات الامونيوم ونترات البوتاسيوم والببتون وعدم الانتاج في معاملة السيطرة.وأكثر انتاج للسم باليوم 7 من الحضن ويليه 5و9و11يوم وعدم الانتاج في اليوم 3 من الحضن .

واستنتج ان لمصادر الكاربون والنيتروجين ومدة الحضن المختلفة لما لها من تأثير على زيادة أو نقصان في انتاج السم من الفطريات المعزولة ،وهذه النتيجة تشير إلى ايجاد استراتيجيات مبتكرة للسيطرة على تلوث الحبوب بالسموم الفطرية .

Abstract

I took the amount of yellow maize from local markets (paint), isolate and someone two fungi Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus, and conducted a study on two fungi to see the effect of some carbon sources, nitrogen, and two different cuddling, which has the effect of an increase or decrease production of aflatoxin in the isolates Aspergillus parasiticus, Aspergillus flavus , and it appeared that fungus Aspergillus flavus that more source of carbon cause an increase in the production of aflatoxin presence of lactose, and less production of the presence of starch and sucrose, glucose and there was no production in the control treatment for the loss of carbon source needed by fungi in the growth Alaotaiada.oukd appeared that more a source of nitrogen for the production of poison yeast extract followed by ammonium sulfate and less presence of peptone and potassium nitrate and a lack of production in the control treatment for the loss of nitrogen source necessary for the growth of Alaftriaat.ccant for cuddling 7 days more production of aflatoxin, followed by 5, 9 and 11 days, and on day 3 less production.

Fungus Aspergillus parasiticus has shown that the more a source of carbon cause an increase in the poison was using sucrose, followed by lactose and less presence of starch and lack of production by using glucose and treatment Alsatrh.ozar be more a source of nitrogen cause

increased production of the toxin using yeast extract, followed by ammonium sulfate and potassium nitrate and peptone and lack of production in the control treatment .ookther produce the poison day 7 of the lap, followed by 5, 9 and 11 days and the lack of production on day 3 of incubation.

It was concluded that the sources of carbon, nitrogen, and two different cuddling because of their effect on the increase or decrease in the production of the poison of fungi isolated, and this result suggests finding innovative strategies to control the contamination of grain mycotoxins.

المقدمة:

تعتبر الفطريات من الكائنات المتلفة للعديد من المحاصيل الزراعية و المواد الغذائية خلال مدة الخزن مما يجعلها غير صالحة للاستهلاك البشري عن طريق تغيير قيمتها الغذائية وفي بعض الأحيان إنتاجها للسموم الفطرية،ومن أمثلة هذه السموم سم الافلاAflatoxin المنتج بشكل نواتج ايضية ثانوية بواسطة بعض الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus*و*Penicillium* [1]. ويعد من أهم السموم الفطرية والذي يظهر في المواد الغذائية ومن أهم أنواعه سم الافلا :B_1وB_2 وG_1 وG_2.كما وقد ثبت أنه مادة مسرطنة وسامة للثدييات مما يسبب تلف في الحامض النووي [2] ، وله القابلية على تسبب الطفرة [3].فقد ذكر[4] أن الفطرين *Aspergillus flavus*و*A.p arasiticus*يعتبران الملوثين الرئيسيين للمنتجات الزراعية،والفطرالأول هوالسائد في التربة ولهذين الفطرين تأثيرات سلبية خاصة إذا كانت لهما القدرة على إنتاج الإفلاتوكسنيات.في حين وجد [5] الفطريات في بذور السمسم وإمكانية الحد من وجود الافلاتوكسينات في الحلاوة الطحينية المصنعة من تلك البذورمن خلال الإشعاع والمضافات الكيميائية.

ونظراً للتأثير الكبير للسموم الفطرية في صحة الإنسان فقد توجه العديد من العلماء إلى التخلص من السمية من الأغذية كادمصاص الافلاتوكسنيات على الفحم المنشط والبنتونايت(Bentonite) للحد من سمية هذه السموم[6] .عموما فان التركيب الحيوي للسموم الفطرية في الفطريات تسيطر عليها مصادر النيتروجين والكاربون [7]. دراسات عديده وجدت ان مصادر النيتروجين يمكن ان يكون لها تأثير مهم على انتاج السموم الفطرية بما في ذلك Kojic acid [8] ،aflatoxins [9] ،gibberellins[10]،citrinin [11] و Ochratoxin [12] .

المواد وطرائق العمل:

عزل وتشخيص الفطريات

اخذت كمية من حبوب الذرة الصفراء غمرت هذه العينات في محلول KoH بتركيز10% ولمدة 1-2 دقيقة لتنقية السطح الخارجي للحبوب من التلوث،وبعدإخراج الحبوب وضعت على اوراق ترشيح للتخلص من المحلول الزائد،وغسلت الحبوب بالماءالمقطرالمعقم [13]،وضعت الحبوب على سطح الوسط الزرعي وبمعدل خمسة حبوب وبثلاث مكررات للعينة. ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 مْ لمدة 5 أيام وبعد انتهاء مدة الحضن تم تنقية عزلة الفطر بأخذ قرص من كل طبق وزرعه في طبق يحوي على وسط أكار الدكستروز البطاطا (PDA) وكررت العملية عدة مرات إلى حين الحصول على عزلات للفطر بصورة نقية تماماً وتم تشخيص الفطر بالاعتماد على الصفات التصنيفية التي ذكرتها المصادر [15,14].

دراسة تأثير مصادر الكاربون على انتاج الافلاتوكسين من الفطر*Aspergillus flavus* :

استخدم في هذه الدراسة وسط ريتشارد الصلب المكون من (KNO3 10.0g , K2HPO4 5.0g, Mg So 4.7 H2O 2.5g, FeCl3 0.02g, Sucrise 30.0g , Agar 15.0g) في 1 لتر ماء مقطر معقم لدراسة تأثير مصادر الكاربون على انتاج الافلاتوكسين حيث ثبت مصدر النيتروجين وهو نترات البوتاسيوم وغير مصدرالكاربون (سكروز، كلكوز، لاكتوز، نشأ) مع معاملة سيطرة بدون مصدر كاربون Control، وللكشف عن سم الأفلاتوكسين استخدم محلول الامونيا بتركيز (25 %) وذلك بإضافة 0.2 مل من هذا المحلول في منتصف غطاء الطبق وقلبت الأطباق [16]، وحضنت بدرجة حرارة 27 ±2 مْ تمت مراقبة الأطباق لملاحظة تغير لون قواعد المستعمرات فإذا تغيرت قاعدة المستعمرة إلى اللون الأحمر الوردي أوالأصفرالبرتقالي دل ذلك على أن الفطر قادرعلى إنتاج الافلاتوكسين وبعكسه فان الفطرغيرقادرعلى إنتاج الأفلاتوكسين.

دراسة تأثير مصادر النتروجين على انتاج الافلاتوكسين من الفطر*Aspergillus flavus* :

ثبت مصدر الكاربون وهو لاكتوز وغير مصدر النيتروجين(نترات البوتاسيوم، خلاصة الخميرة،الببتون،كبريتات الامونيوم) مع معاملة سيطرة بدون مصدر نيتروجين Control .

دراسة مدة الحضن في انتاج الافلاتوكسينمن الفطر *Aspergillus flavus* :

استخدمت مدة حضن مختلفة تبدأ من (11,9,7,5,3) لمعرفة تأثير مدة الحضن في انتاج الافلاتوكسين واستخدم وسط PDA. بعدها باستخدام الثاقب الفليني Cork borer بقطر 1ملم نقل لقاح من المزرعة النقية على الاوساط وحضنت في الحاضنة وفي درجة حرارة 27±2 مْ .

دراسة تأثير مصادر الكاربون على انتاج الافلاتوكسين من الفطر *Aspergillus parasiticus* :

استخدم في هذه الدراسة وسط ريتشارد الصلب المكون من (KNO3 10.0g, K2HPO4 5.0g, MgSo 4.7 H2O 2.5g, FeCl3 0.02g, Sucrise 30.0g, Agar 15.0g) في 1 لتر ماء مقطر معقم لدراسة تأثير مصادر الكربون على انتاج الافلاتوكسين حيث ثبت مصدر النيتروجين وهو نترات البوتاسيوم وغير مصدرالكاربون(سكروز،كلكوز،لاكتوز،نشأ) مع معاملة سيطرة بدون مصدر كاربون Control، وللكشف عن سم الأفلاتوكسين استخدم محلول الامونيا بتركيز (25 %)وذلك بإضافة 0.2مل من هذا المحلول في منتصف غطاء الطبق وقلبت الأطباق [16]، وحضنت بدرجة حرارة 27 ±2 مْ تمت مراقبة الأطباق لملاحظة تغيرلون قواعدالمستعمرات فإذاتغيرت قاعدة المستعمرة إلى اللون الأحمر الوردي أوالأصفرالبرتقالي دل ذلك على أن الفطرقادرعلى إنتاج الافلاتوكسين وبعكسه فان الفطرغيرقادرعلى إنتاج الأفلاتوكسين.

دراسة تأثير مصادر النتروجين على انتاج الافلاتوكسين من الفطر *Aspergillus parasiticus* :

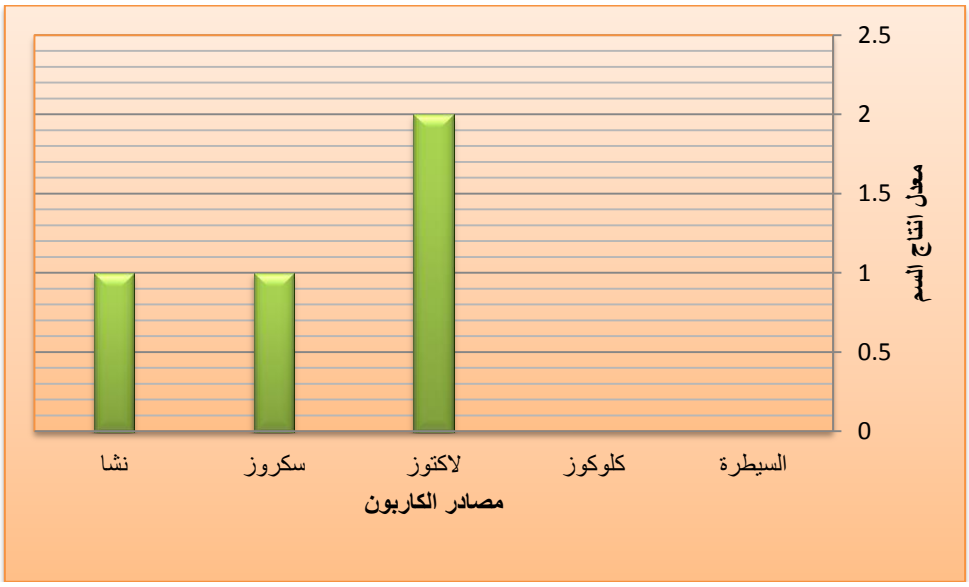
ثبت مصدر الكاربون وهو سكروز وغير مصدر النيتروجين(نترات البوتاسيوم، خلاصة الخميرة،الببتون،كبريتات الامونيوم) مع معاملة سيطرة بدون مصدر نيتروجين Control .

دراسة مدة الحضن في انتاج الافلاتوكسين من الفطر *Aspergillus parasiticus* :

استخدمت مدة حضن مختلفة تبدأ من (11,9,7,5,3) لمعرفة تأثير مدة الحضن في انتاج الافلاتوكسين واستخدم وسط PDA. بعدها باستخدام الثاقب الفليني Cork borer بقطر 1ملم نقل لقاح من المزرعة النقية على الاوساط وحضنت في الحاضنة وفي درجة حرارة 27±2 مْ .

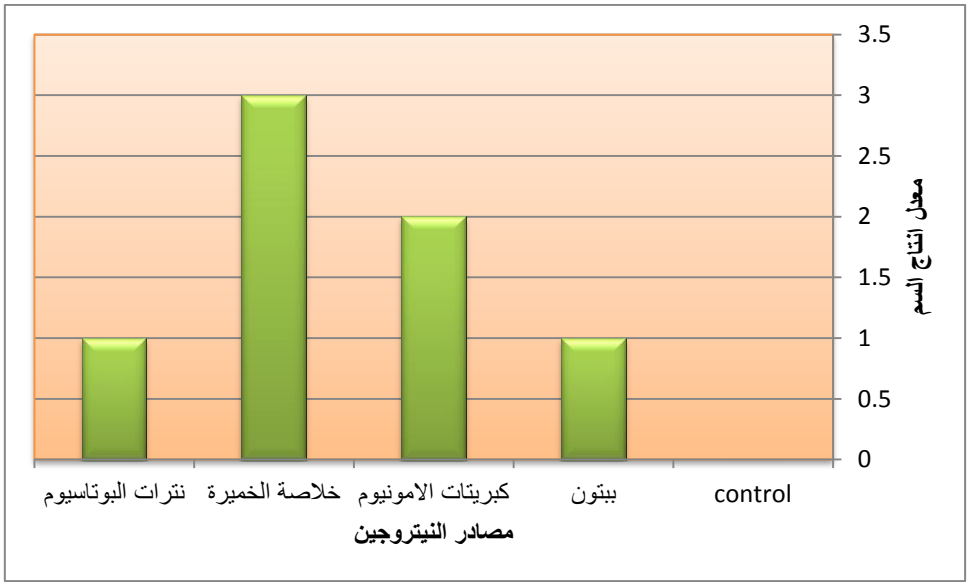
النتائج والمناقشة Results and Discussion:

ظهرالفطر *Aspergillus flavus* زيادة انتاج الافلاتوكسين بوجود سكر اللاكتوز ويليه النشأ وسكروز وكلكوز أما السيطرة فلا يوجد انتاج كما في الشكل رقم(1).وهذه النتيجة لاتتفق مع [17] حيث ان زيادة الانتاج بوجود السكروز، ومع [18] أكثر انتاج بوجود الفركتوز ويلية السكروز والكلكوز للفطر *Aspergillus carbonarius*. أن اضافة السكر الى مزارع الفطر *Aspergillus flavus* له تأثير كبير على تركيب الحيوي للأفلاتوكسين. جدول رقم(1).



شكل رقم(1) يوضح افضل مصدر كاربون في انتاج الافلاتوكسين للفطر *Aspergillus flavus* .

أما أكثر مصدر نيتروجين زيادة في الانتاج بوجود خلاصة الخميرة ويليه كبريتات الامونيوم،واقل انتاج بوجود نترات البوتاسيوم والببتون،وعدم الانتاج بمعاملة السيطرة كما في الشكل رقم (2) تتفق النتيجة مع ماتوصل اليه [18] . مصادر النيتروجين العضوية (ببتون وخلاصة الخميرة) توفرالفيتامينات ،المغذيات الدقيقة والمركبات المتوسطة المطلوبة لنمو الاعفان، وقد تكون بمثابة التحفيز والتشجيع للنمو الامثل وانتاج OTA.ومع ذلك التحلل من كبريتات الامونيوم واليوريا يؤدي الى تأثير كبير على تركيز أيون الهيدروجين في وسط النمو.والتي قد تؤثر سلبا على الأنشطة الفطرية [19-20] وفي سياق أخر طبيعة مصادر النيتروجين تؤدي الى صناعة السموم الفطرية وبالتالي زيادة انتاج السموم الفطرية [21] . جدول رقم(1) .



الشكل (2) يوضح أفضل مصدر نيتروجين في انتاج الافلاتوكسين للفطر *Aspergillus flavus* .

وظهر أن أكثر مدة حضن في انتاج الافلاتوكسين كان يوم 7 ويليه 5 و9 و11يوم اما في اليوم 3 أقل انتاج كمافي الشكل رقم (3) . تتفق هذه النتيجة مع ما وجده [22] أن أكثر مدة حضن هي اليوم 7 من الحضن.جدول رقم(1)

شكل (3) يوضح أفضل مدة حضن في انتاج الآفلاتوكسين للفطر *Aspergillus flavus* .

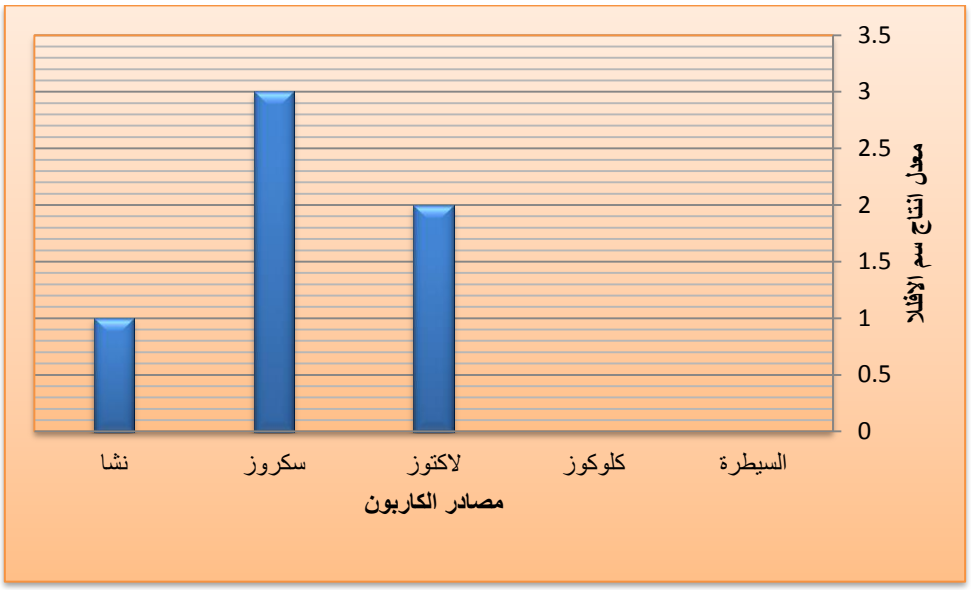
جدول (1) مصادر الكاربون والنيتروجين ومدة الحضن في انتاج الأفلاتوكسين للفطر *Aspergillus flavus* .

مصادر الكاربون	انتاج الأفلاتوكسين	مصادر النيتروجين	انتاج الأفلاتوكسين	مدة الحضن بالأيام	انتاج الأفلاتوكسين
لاكتوز	++	خلاصة الخميرة	+++	3	+
نشأ	+	كبريتات الامونيوم	++	5	++
سكروز	+	نترات البوتاسيوم	+	7	+++
كلوكوز	+	ببتون	+	9	++
السيطرة	_	السيطرة	_	11	++

+:يعني انتاج سم الافلا.

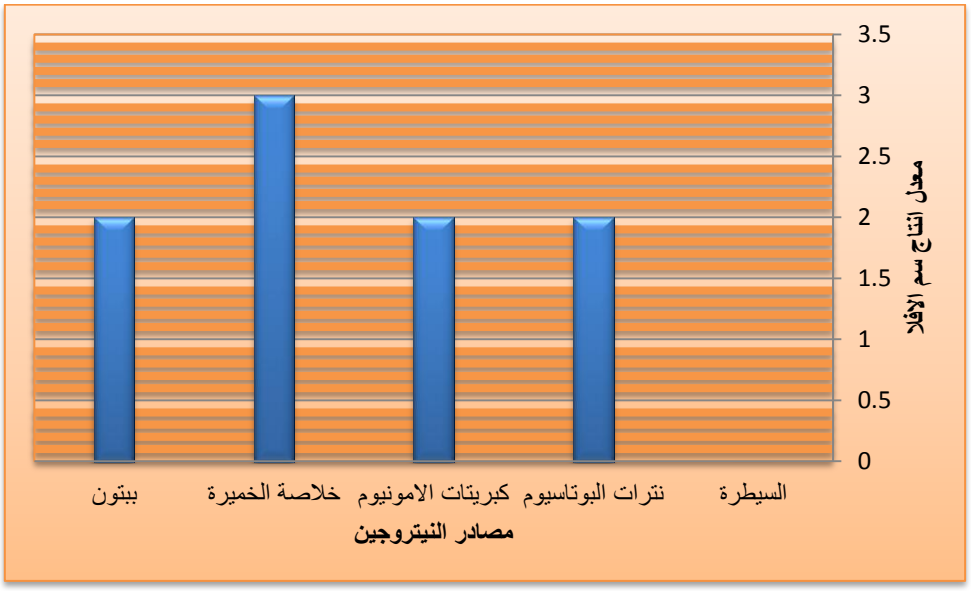
-:عدم انتاج سم الافلا.

ظهر الفطر *Aspergillus parasiticus* أن أكثر مصدر كاربون سبب زياده في الانتاج بوجود سكروز ويليه لاكتوز وأقل انتاج بوجود النشأ وعدم الانتاج بوجود كلوكوز ومعاملة السيطرةكما في الشكل رقم (4).تتفق النتيجة مع [16] حيث ان زيادة الانتاج بوجود السكروز،و [23]ان السكروز الاكثر ملائمة لنمو أقصى للرشاشيات. جدول رقم(2) .



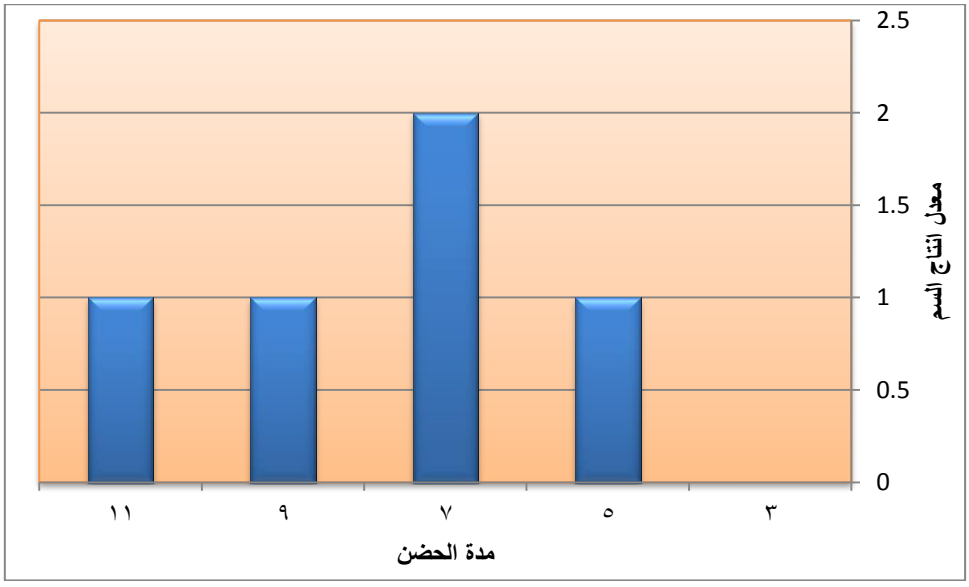
شكل رقم(4) يوضح افضل مصدر كاربون في انتاج الافلاتوكسين للفطر *Aspergillus parasiticus* .

أما أكثر مصدر نيتروجين كان باستخدام خلاصة الخميرة ويليه كبريتات الامونيوم ونترات البوتاسيوم وببتون وعدم الانتاج بمعاملة السيطرةكما في الشكل رقم (5) تتفق هذه النتيجة [13] و[23] اكثر انتاج بوجود خلاصة الخميرة ويليها نترات الامونيوم. جدول رقم(2)



الشكل (5) يوضح أفضل مصدر نيتروجين في انتاج الافلاتوكسين للفطر *Aspergillus parasiticus* .

وظهر أن أكثر مدة حضن في اليوم 7 من الحضن في انتاج الافلاتوكسين ويليه 5و9 و11 وعدم الانتاج في يوم3من الحضن كما في الشكل رقم (6) . تتفق هذه النتيجة مع [22] زيادة الانتاج السم في اليوم 7 من الحضن،ولاتتفق النتيجة مع [23]حيث أكثر زيادة في الانتاج في اليوم الثامن ويلية اليوم العاشرة من الحضن.جدول رقم(2)



شكل (6) يوضح أفضل مدة حضن في انتاج الآفلاتوكسين للفطر *Aspergillus parasiticus* .

جدول (2)مصادر الكاربون والنيتروجين ومدة الحضن في انتاج الأفلاتوكسين للفطر Aspergillus parasiticus .

مصادر الكاربون	انتاج الفلاتوكسين	مصادر النيتروجين	انتاج الفلاتوكسين	مدة الحضن بالأيام	انتاج الفلاتوكسين
سكروز	+++	خلاصة الخميرة	+++	3	-
لاكتوز	++	كبلايتات الامونيوم	++	5	++
نشأ	+	نترات البوتاسيوم	++	7	+++
كلوكوز	-	ببتون	++	9	++
السيطرة	-	السيطرة	-	11	++

+:يعني انتاج سم الافلا.

-:عدم انتاج سم الافلا.

المصادر:

1. Magan N, Olsen M.(2004) .*Mycotoxins in food: detection and control.*: Woodhead Publishing.
2. Kamp HG, Eisenbrand G, Schlatter J, Wurth K, Janzowski C.(2005) .Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*. 206(3):413–25 .
3. Palma N, Cinelli S, Sapora O, Wilson SH, Dogliotti E.(2007) .Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 20(7):1031–7.
4. Gourama; H., and Bullerman, B. (1995). *Aspergillusflavus*and *A.Parasiticus*:Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. J. Food Protec .58:1395-1404.
5. Aziz; S. Y. and Abdl_Ghaffar, E. A. (2001). Aflatoxins in inoculated raw sesame seeds and its processed sesame halva. Egypt. J. Agric. Res. 79(1):
6. Aziz; S, Y., Tsai,W. Y. and Bullerman, L. B. (1996). AdsorbanceofMycotoxins on activated charcoal Bentonite and fuller's earth. Egypt J. Agric. Research.74(1): 173-184.
7. Mühlencoert. E., I. Mayer, M.W. Zapf, R.F. Vogel, L. Niessen .(2004) . Production of ochratoxin A by Aspergillusochraceus, Eur. J. Plant Pathol. 110: 651–659.
8. M. Rosfarizan, A.B.(2000) .Ariff, Kinetics of kojic acid fermentation by Aspergillusflavus using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25: 20–24.
9. Ehrlich .K.C., P.J. Cotty, .(2002) .Variability in nitrogen regulation ofaflatoxin production by Aspergillusflavus strains, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 : 174–178.
10. Mihlan.M., V. Homann, T.W. Liu, B. Tudzynski, (2003) .AREA directly mediates nitrogen regulation of 7achida7lins biosynthesis in Gibberellafujikuroi, but its activity is not affected by NMR, Mol. Microbiol. 47 :975–991.
11. Wang .J.J., C.L. Lee, T.M. Pan.(2003) . Improvement of monacolin K, γ-aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of Monascuspurpureus NTU 601, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30 : 669–676.
12. Geisen.R..(2004) . Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin A biosynthesis genes in Penicilliumnordicum, Mol. Nutr. Food Res. 48 : 532–540.
13. صالح طلال حسين،وأخرون.(2009). تشخيصأنواع الأسبرجلسفيبذور الذرة والرزوالحنطة في ميسان واختبارقدرتها على إفرازالأفلاتوكسين على أوساط مختلفة. مجلة ميسان للدراسات الأكاديميةالمجلدالثامن العددالخامس عشر.
14. Moubasher , A.H. (1993) . Soil fungi in Qatar & other arab countries . Dep . of . Bota.2nded .
15. Pitt , J.I. and Hoching , A.D. (1997) . Fungi & food Spoilage . Blackie academic and professional . 2nded . London . Newyork . Tokyo . Melbourne .
16. Saito, M., and 7achida, S. (1999). Arapid identification method foraflatoxin-producing strains of *Aspergillusflavus*and *A. parasiticus*082-by.ammoniavapor.*mycoscience*. 40: 205.

7. Muhlencoert E. and Geiger E..(2004). Ochratoxin A production byeines. *Aspergillusochraceus*. UniversitätMünchenzurErlangung des akademischen GradesDoktors der Naturwissenschaften.
18.Hashem.a,Abdall.f,Alobeed.r,Algarawi.a and Alwathnani.h (2015). Effect of Carbon, Nitrogen Sources and Water Activity on Growth and Ochratoxin Production of *Aspergillus carbonarius*(Bainier) Thom . Jundishapur J Microbiol. 2015 February; 8(2): e17569.
19.Kapetanakou AE, Ampavi A, Yanniotis S, Drosinos EH, Skandamis PN.(2011). Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiol*;**28**(4):727–35.
20.Brzonkalik K, Hümmer D, Syldatk C, Neumann A(2012). *Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by Alternaria alternata in submerged cultivation.*: AMB Express.
21. Kohut G, Adam AL, Fazekas B, Hornok L. N-(2009) .starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in Fusariumproliferatum. *Int J Food Microbiol.*130(1):65–9.
22. Melon. J.E. and P.J. Cotty.(1998).Effects of Oilseed Storage Proteins on Aflatoxin Production by *Aspergillusflavus*. JAOCS, Vol. 75, no. 9
23. Medina A, Mateo EM, Valle-Algarra FM, Mateo F, Mateo R, Jimenez M. (2008) .Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of Aspergillus spp. isolated from grapes. *Int J Food Microbiol.* 122(1-2):93–9.