عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لأعلاف الدواجن في محافظة بغداد والتحري عن قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج الافلاتوكسين B_1

***هادي مهدي عبود **هبة فرحان دلي **مهند محمد نوري**

*وزارة العلوم والتكنولوجيا/دائرة البحوث الزراعية ، بغداد / العراق

**الجامعة المستنصرية/كلية العلوم – قسم علوم الحياة ، بغداد / العراق

الخلاصة

أظهرت نتائج التحري عن الفطريات المرافقة لتسعة عشر عينة من أعلاف الدواجن المجموعة من مناطق مختلفة في محافظة بغداد تباين العينات من حيث أنواع الفطريات المعزولة وتكرار وجودها في العينات المدروسة والحمل الفطري الكلي للعينات. سجل الجنس *Aspergillus* أعلى نسبة مئوية للوجود وصلت 100% في العينات B_{11}، B_{13} وB_{17} هذا من ناحية ومن ناحية اخرى سجلت العينة B19 أعلى قيمة للحمل الفطري الكلي التي بلغت (1910×10^6 cfu) في حين سجلت العينة B12 أقل حمل فطري والذي بلغ (0.04×10^6 cfu). أظهرت النتائج قابلية 7 عزلات من بين 17 عزلة على انتاج الافلاتوكسين B_1 في حين كانت العزلة B_6 أكثرها قدرة على انتاج هذا النوع من السم.

الكلمات المفتاحية: سموم فطرية، فطريات، افلاتوكسين، اعلاف دواجن

Isolation and Identification of Fungi Associated with Poultry Feeds in Baghdad Governorate and Detection of Aflatoxin B_1 Production by *Aspergillus flavus* Strains

***Hadi Mahdi Aboud **Hebba Ferhan Deli **Mohand Muhammad Noori**

*Ministry of Science and Technology/ Directorate of Agricultural Research, Baghdad/Iraq

** El-Mustansria Uni./ College of Science-Biology Dept. /Baghdad/Iraq

E-mail:hadimahdiaboud@yahoo.com

Abstract

The results of detecting fungi associated with nineteen poultry feed samples from different locations in Baghdad governorate revealed that the feed samples varied in type of isolating fungi, the percentage of occurrence, the frequency of isolation and total fungal load. The genus *Aspergillus* recorded the highest percentage of occurrence (100%) in samples B_{11}, B_{13} and B_{17}. Sample B_{19} recorded the highest total fungal load (1910 x 106 cfu) while sample B_{12} recorded the lowest total fungal load (0.04 x 106 cfu). The results of toxigenic activity showed that only 7 isolates among 19 isolates had toxigenic activity, and isolate B_6 was the highest aflatoxin B_1 production in comparison with other isolates.

Key words: Mycotoxin , Aflatoxin, Fungi and Poultry Feed.

المقدمة

تغزو الفطريات المنتجات الزراعية عند توفر الظروف الملائمة من درجة الحرارة والرطوبة في الحقل وأثناء التصنيع والخزن ،وأظهرت دراسات عدة في العراق تعرض مكونات العلائق الأساسية للإصابة بالفطريات وتلوثها بالسموم الفطرية، إذ بينت دراسة مسحية إن 28 فطرا من فطريات المخازن معظمها أنواع تابعة للجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* مصاحبة للحبوب المخزونة عزلت من عينات تمثل 24 نوعا وصنفا من حبوب الحنطة والشعير والرز والذرة الصفراء المخزونة في شمال العراق ووسطه وجنوبه (Sulaiman ، 1977).

يعد تلوث الأعلاف بالسموم الفطرية أحد أهم المشاكل التي تواجه صناعة أعلاف الدواجن خصوصا في الدول النامية، بسب افتقارها للتقنيات الحديثة الخاصة بحصاد وتجفيف ونقل وخزن محاصيل الحبوب التي تعد المادة الخام لصناعة هذه الأعلاف ، مما يزيد من فرصة أصابتها بالعديد من الفطريات المنتجة للسموم (Robertواخرون،1984 و Oliveira واخرون، 2009).

فقد سجلSanchis وجماعته (1993) إصابة عينات الشعير المخزونة بالعديد من الفطريات، كان أكثرها تكرارا الفطريات*Aspergillus flavus* و *Alternaria alternate* و *Penicillium spp* ووجد أنهمن أصل 176 عزلة من الفطر *Alternaria alternate* كانت 156 عزلة منتجة للسم الفطري Tenuzonic acid ومن أصل 190 عزلة من الفطر *Asp.flavus* كانت 6 % منها منتجة للافلاتوكسينات .

ووجد شهاب (1998) أن عينات حبوب الذرة الصفراء المدروسة كانت مصابة بنسبة 100% بالفطر *Fusarium moniliforme* وأن 33 % منها كانت منتجة للسمFB_1.

وسجل Shekhany (2001) الأجناس الفطرية التالية على بذور الحنطة.*Alternaria spp.* ، *Aspergillus spp.* ، *Penicillium spp.*، *Fusarium spp.* ، *Drechslera spp.*و *Rhizoctonia spp.* بنسبة وجود بلغت 27.17 % ، 21.74 %، 17.39%، 10.86%، 9.78%، 5.43% و2.17% على التوالي بينما سجلت الأجناس *Aspergillus spp.*، *Penicillium spp.*، *Fusarium spp.* ، *Alternaria spp.* و *Rhizopus spp.* على حبوب الذرة الصفراء بنسب وجود بلغت 50 % ،15 % ،12.5 %، 12.5% و10 % على التوالي. ونظرا لانعدام الرقابة على سلامة المنتجات المطروحة بالأسواق المحلية العراقية بشكل عام والأعلاف بشكل خاص ، لذا هدفت هذه الدراسة إلى التحري عن الفطريات المرافقة لأعلاف الدواجن المعروضة في الأسواق المحلية لمحافظة بغداد وتحديد نسب وتكرار تواجدها في العينات المفحوصة.

المواد وطرائق العمل

جمعت تسعة عشر عينة من أعلاف الدواجن المحلية المعروفة ومن مناطق مختلفة في محافظة بغداد خلال شهر تشرين الأول من عام 2009 ، وبواقع واحد كيلوغرام لكل عينة ووضعت في أكياس البولي اثيلين ونقلت إلى المختبر وحفظت بالثلاجة على درجة حرارة +4 ˚م لحين الاستخدام ، واستخدمت طريقة التخافيف(Dilution Method) لعزل الفطريات، إذ بعد خلط العينة بشكل جيد أخذت عينة ثانوية (10 غرام) ووضعت في دورق زجاجي حجم 250 مل مجهز بمائة مل ماء مقطر معقم، رجت العينة جيدا باستخدام جهاز الخلط المغناطيسي لمدة 5 دقائق وبذلك تم الحصول على التخفيف 10^{-1}. بعدها حضرت سلسلة من التخافيف العشرية المناسبة وصولا إلى التخفيف 10^{-6}. أضيف 1 مل من كل من التخفيف 10^{-3} و10^{-6} كلا على انفراد إلى أطباق بتري(قطر 9 سم) مجهزة بالوسط ألزرعي أكار دكستروز مستخلص البطاطا (PDA)المعامل بالمضاد الحيوي كلورامفينيكول (100 ppm)،ثلاث إطباق لكل تخفيف ، حضنت الأطباق لمدة 5 أيام بدرجة حرارة 25˚ م. حسب معدل عدد المستعمرات

الفطرية النامية لكل عينة ، والنسبة المئوية لوجود كل جنس ونوع وتكرار العزل لكل جنس ونوع والحمل الفطري لكل عينة حسب ماورد في Tseng واخرون (1995) ووفق المعادلات التالية :

$$\text{النسبة المئوية لوجود الجنس} = \frac{\text{عدد الوحدات المكونة لمستعمرة CFU للجنس}}{\text{عدد الوحدات المكونة لمستعمرة CFU بقية الأجناس في العينة المفحوصة}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية لوجود النوع} = \frac{\text{عدد الوحدات المكونة لمستعمرة CFU للنوع}}{\text{عدد الوحدات المكونة لمستعمرة CFU بقية الأنواع في العينة المفحوصة}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية لتكرار عزل الجنس} = \frac{\text{عدد عدد مرات ظهور الجنس في العينات}}{\text{عدد العينات الكلية في تلك المحافظة}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية لتكرار عزل النوع} = \frac{\text{عدد عدد مرات ظهور النوع في العينات}}{\text{عدد العينات الكلية في تلك المحافظة}} \times 100$$

الحمل الفطري للعينة = مجموع عدد الوحدات اللقاحية المكونة لمستعمرة CFU لجميع الأنواع الفطرية المعزولة من تلك العينة في 1 غم علف جاف

شخصت الفطريات اعتمادا على المفاتيح التصنيفية المعتمدة في Raper و Fennell (1965) ، Simmons(1967)، Booth (1971)، Pitt (1979)، Domsch واخرون (1980). لغرض تحديد قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج الافلاتوكسين تم تنميتها على وسطي Aflatoxin Producing Ability (APA) لمدة 7 أيام تحت درجة حرارة 28 ˚م، ووسط (CEA) Coconut Extract Agarلمدة 4 أيام تحت درجة حرارة 25 ˚م،و بواقع 15 مل من كل وسط/طبق بتري، و تعريضها إلى الأشعة فوق البنفسجية (UV) وعلى طول موجي مقداره 365 نانوميتر (Carballo و DeMiguel, 1987 ، Lemke واخرون،1989).استخدم التدرج المقترح من قبلCarballo و DeMiguel (1987)مع إجراء التحوير التالي:

– : لاتوجد بقعة متألقة (عديمة القدرة على الإنتاج).

+ : توجد بقعة متألقة مساحتها 1-6 سم^2 (ضعيفة القدرة على الإنتاج).

++ : توجد بقعة متألقة مساحتها 7-12 سم^2 (متوسطة القدرة على الإنتاج).

+++ : توجد بقعة متألقة مساحتها 13-18 سم^2 (عالية القدرة على الإنتاج).

++++ : توجد بقعة متألقة مساحتها ≥19 سم^2 (فائقة القدرة على الإنتاج).

حيث تم حساب مساحة البقع المتألقة بتسقيط البقع المتألقة على ورق بياني شفاف.

استخدم وسط مستخلص الخميرة – سكروز Yeast Extract Sucrose(YES)لكونه وسطا جيدا لنمو الفطريات وإنتاجها للسموم (Fente واخرون،2001)،بعد تحضير الوسط وزع في دوارق زجاجية حجم 500 مل بواقع 250 مل لكل دورق ،عقمت الدوارق في المؤصدة ،لقحت بعزلات الفطر *Asp.flavus* من مزارعها على وسطPDA بواقع قرص قطره 7 ملم وبعمر أسبوع واحد وبمعدل ثلاث مكررات لكل عزلة. حضنت الدوارق في الظلام وبدرجة حرارة 25±2˚ م لمدة أسبوعين مع الرج اليومي ثم أجريت لها عملية استخلاص للافلاتوكسين (Davis واخرون ،1966).

اتبعت طريقة Jones (1972) مع إجراء بعض التحويرات لغرض فصل السموم الفطرية (Aflatoxin) من مزارعها على وسط YESوهي:

-فصل سمومAFB_1 من الأوساط السائلة (YES) بدلا من الأوساط أو المواد الصلبة كفستق عبيد والذرة.

-استخدمت ألواحTLC جاهزة بدلا من استخدام ألواح محضرة مختبريا.

-ترك المزيج لمدة 15 دقيقة لإتمام عملية فصل الطبقتين بدلا من 30 دقيقة.

وتمت الطريقة على النحو التالي:

- رشحت المزارع لفصل الكتلة الحية للنمو الفطري عن راشح نمو المزرعة باستخدام ورق الترشيح Whatman No: 1خلال قمع بخنر.
- وضع حجم 200 مل من الراشح في قمع الفصل وأضيف له مقدار حجمه كلوروفورم مع الرج لطرد الغازات الناتجة، وكررت العملية مرتين.
- ترك المزيج لمدة 15 دقيقة لإتمام عملية فصل الطبقتين ثم مررت الطبقة السفلى المتمثلة بالكلوروفورم خلال كبريتات الصوديوم اللامائية ورشحت باستخدام ورق الترشيح Whatman No: 1.
- جفف الراشح باستخدام المجففة وحفظ بالمجمدة لحين إجراء الكشف أو استخدامه مباشرة لغرض إجراء الكشف الكيميائي عليه.

تم الكشف عن الافلاتوكسينB_1في مستخلصات مزارع عزلات الفطر *Asp.flavus*على ألواح السليكاجلSilica gel G6020×20 بعد تنشيطها في الفرن الكهربائي بدرجة 105˚ م لمدة ساعتين(Seitzو Mohr، 1977). بوجود السم القياسيAFB_1(تم الحصول عليه من مركز تلوث الغذاء/دائرة البيئة والمياه/وزارة العلوم والتكنولوجيا) واستخدم نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (10:90) حجم : حجم، (العزاوي ، 1977) .فحصت الألواح تحت الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول ألموجي 365 نانوميتر وتم مطابقة معامل الترحيل(Rf) ولون التألق مع المادة القياسية لـAFB_1.

اتبعت طريقةRomer(1973). لتأكيد وجود السمAFB_1باعتماد تغير لون التألق من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر بالمعاملة بحامض الكبريتيك المركز: ميثانول (20-80) تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 365 نانوميتر

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج العزل والتشخيص لتسعة عشر عينة أعلاف دواجن جمعت من مناطق مختلفة (من الاسواق المحلية) في محافظة بغداد ، تباين العينات من حيث أنواع الفطريات المعزولة منها والنسبة المئوية لتواجدها ضمن العينة (جدول 1)، وتكرار عزلها في العينات المفحوصة(جدول 2) ،ومعدل الحمل الفطري الكلي (جدول3). ففيما يخص الفطريات المعزولة فقد تم عزل الفطريات التالية (جدول 1):*Alternaria alternata* و *Aspergillus candidus* و*Asp.flavipes* و *Asp.flavus* و *Asp.fumigatus*و *Asp.niger* و *Cephalosporium spp.* و *Cladosporium cladosporioids* و*Fusarium moniliforme* و *Mucor sp.* و*Penicillium citrinum* و *P.chrysogenum* و *P.cyclopium* و *P.expansum*و *P.oxalicum* ومجموعة Mycelia Sterile Fungi. وقد اظهر الجنس *Aspergillus* أعلى نسبة مئوية للوجود إذ تراوح مدى وجوده من 0.70−100 % وسجلت العيناتB11وB13 وB17 أعلى نسب مئوية للوجود بلغت 100 % في حين سجلت العينةB19اقل نسبة مئوية للوجود بلغت 0.70 % (جدول 1). أما فيما يخص النوع فقد سجل الفطر *Asp.flavus*أعلى نسبة مئوية لوجود النوع على وجه الخصوص في العيناتB4 وB17إذ بلغت 88.03و85.71% على التوالي، يليه الفطر *Asp.niger*الذي سجل أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 71.42% في العينةB13.أما في ما يخص تكرار العزل فقد سجلت الأنواع *Asp.candidus Asp.flavipes* و *Asp.flavus* و*Asp.fumigatus* و *Asp.niger* وبنسبة تكرار

للعزل بلغت 19:1،19:5،19:15،19:1 و19:15% على التوالي(جدول 2). أما الجنس *Penicillium sp.* فيأتي بالمرتبة الثانية إذ سجل مدى وجود تراوح مـــا بـــين 94.37−7.69 % وســـجلت العينةB_{19} أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 94.37 % في حين سجلت العينةB_{14}اقل نسبة مئوية للوجود بلغت 7.69 %. يلي ذلك الجنس*Mucor sp.* فقد تراوح مدى وجوده من 0.23−40 %.

جدول (1) النسب المئوية لوجود الفطريات (الأجناس والأنواع التابعة لها) المعزولة من أعلاف الدواجن في محافظة بغداد

رقم العينة	الفطريات	النسبة المئوية للوجود%	
		الجنس	النوع
B_1	*Cephalosporium sp Aspergillus flavus* *Cladosporium cladosporioids Mucor sp.*	33.33 16.67 41.67 8.33	33.33 16.67 41.67 8.33
B_2	*Aspergillus sp.* *Asp.flavipes* *Asp.flavus* *Asp.niger* *Cladosporium cladosporioids*	43.75 56.25	 6.25 12.5 25 56.25
B_3	*Aspergillus flavus* *Mucor sp.* *Penicillium citrinum*	40 40 20	40 40 20
B_4	*Aspergillus sp* *Asp.flavus* *Asp.flavipes* *Asp.niger* *Mucor sp.*	99.15 0.85	 0.85 88.03 10.26 0.85
B_5	*Aspergillus sp.* *Asp.flavus* *Mucor sp* *Asp.niger* *Penicillium citrinum*	41.72 1.99 56.29	 35.10 6.62 1.99 56.29
B_6	*Cephalosporium sp.* *Cladosporium cladosporioids* *Mucor sp.*	5.56 72.22 22.22	5.56 72.22 22.22
B_7	*Aspergillus sp.* *Asp.flavus* *Asp.niger* *Cladosporium cladosporioids*	28.57 71.43	 21.43 7.14 71.43
B_8	*Aspergillus sp.* *Asp.fumigatus* *Asp.flavipes* *Asp.niger* *Cladosporium cladosporioids* *Mucor sp.*	62.22 28.89 8.89	 2.22 42.22 17.78 28.8 8.89

رقم العينة	الفطريات	النسبة المئوية للوجود%	
		الجنس	النوع
B_9	*Aspergillus sp.*	55.88	
	Asp.flavus		41.18
	Asp.niger		14.70
	Cephalosporium sp.	2.94	2.94
	Cladosporium cladosporioids	14.71	14.71
	Mucor sp.	5.88	5.88
	Penicillium oxalicum	20.59	20.59
B_{10}	*Aspergillus niger*	23.53	23.53
	Cladosporium cladosporioids	9.80	9.80
	Fusarium moniliforme	13.73	13.73
	Penicillium sp.	52.94	
	P.citrinum		2.94
	P.expansum		50.0
B_{11}	*Aspergillus sp*	100	
	Asp.flavus		4.17
	Asp.flavipes		39.58
	Asp.niger		56.25
B_{12}	*Aspergillus sp.*	75	
	Asp.flavus		50
	Asp.niger		25
	Mucor sp.	25	25
B_{13}	*Aspergillus sp.*	100	
	Asp.flavipes		14.29
	Asp.flavus		14.29
	Asp.niger		71.42
B_{14}	*Aspergillus sp*	84.61	
	Asp.flavus		7.69
	Asp.candidus		15.38
	Asp.niger		61.54
	Mucor sp.	7.69	7.69
	Penicillium cyclopium	7.69	7.69
B_{15}	*Aspergillus niger*	25.53	25.53
	Mucor sp.	21.28	21.28
	Penicillium sp.	53.19	
	P. cyclopium		44.68
	P. expansum		8.51
B_{16}	*Aspergillus sp.*	94.55	
	Asp.flavus		51.82
	Asp.niger		42.73
	Mucor sp.	5.45	5.45
B_{17}	*Aspergillus sp.*	100	
	Asp.flavus		85.71
	Asp.niger		14.29
B_{18}	*Alternaria alternata*	25	25
	Aspergillus flavus	62.5	62.5
	Penicillium citrinum	12.5	12.5
B_{19}	*Aspergillus sp*	0.70	
	Asp.niger		0.47
	Asp.flavus		0.23
	Cladosporium cladosporioids	0.23	0.23
	Mucor sp	0.23	0.23
	Mycelia sterile fungi	4.46	4.46
	Penicillium chrysogenum	94.37	94.37

جدول (2) نسب تكرار العزل للفطريات (الأجناس والأنواع التابعة لها) المعزولة من أعلاف الدواجن في محافظة بغداد

نسبة تكرار العزل %		الفطريات	التسلسل
النوع	الجنس		
19:1	19:1	*Alternaria alternate*	1-
	19:18	*Aspergillus sp.*	2-
19:1		*Asp.candidus*	
19:5		*Asp.flavipes*	
19:15		*Asp.flavus*	
19:1		*Asp.fumigatus*	
19:15		*Asp.niger*	
19:3	19:3	*.Cephalosporium sp*	
19:8	19:8	*Cladosporium cladosporioids*	
19:1	19:1	*Fusarium moniliforme*	
19:12	19:12	*Mucor sp.*	3-
19:1	19:1	Mycelia Sterile Fungi	4-
19:8	19:8	*.Penicillium sp*	5-
19:4			
19:1		*P. citrinum*	6-
19:2		*P.chrysogenum*	7-
19:2		*P. cyclopium*	8-
19:1		*P. expansum*	
		P.oxalicum	

جدول (3) الحمل الفطري للعينات المدروسة على أساس العدد الكلي للوحدات المكونة للمستعمرة

رقم العينة	Cfu x 10^6 / gm
B_1	0.12
B_2	30
B_3	10
B_4	50
B_5	660
B_6	50
B_7	50
B_8	100
B_9	50
B_{10}	100
B_{11}	50
B_{12}	0.04
B_{13}	0.07
B_{14}	0.13
B_{15}	50
B_{16}	10
B_{17}	20
B_{18}	0.08
B_{19}	1910

وسجلت العينةB_3 أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 40 % بينما سجلت العينةB_{19} اقل نسبة مئوية للوجود بلغت o.23 %.

أما فيما يخص الحمل الفطري فقد أظهرت نتائج الحمل الفطري للعينات التي تمت دراستها (جدول 3) تباين الحمل الفطري للعينات، فقد سجلت العينة رقم 19 أعلى حمل فطري بلغ 1910×10^6وحدة مكونة

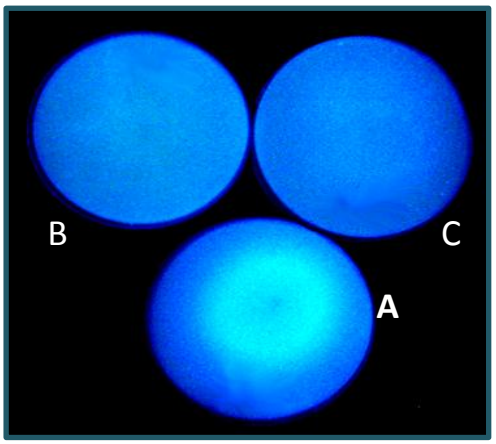
للمستعمرة / غم علف جاف، تليها في ذلك العينة رقم 5 اذ بلغ الحمل الفطري 660×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف، تلتها العينتان رقم 8 و10 اذ سجلت حمل فطري بلغ 100×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف. في حين سجلت العينات ذات الارقام 4 ،6 ،7 ،9 ،11 و15 حمل فطري بلغ 50×10^6 وحدة مكونة

للمستعمرة / غم علف جاف ، وسجلت العينات ذات الارقام 2 ،17 ،3 ،16 ،14 ،1 ،18 و 13 حمل فطري بلغ 30×10^6، 20×10^6، 10×10^6 ، 10×10^6، 0.13×10^6، 0.12×10^6، 0.08×10^6 و 0.07×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف،في حين سجلت العينة رقم 12 اقل حمل فطري بلغ 0.04×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة/غم علف جاف.

أظهرت نتائج الكشف عن الفطريات الموجودة في عينات ألأعلاف قيد الدراسة احتواءها على مدى واسع من الفطريات يتراوح من تلك التي تهاجم المحاصيل بالمراحل الأخيرة من النمو في الحقل مثل أنواع الفطريات*.Alternaria sp* و *.Fusarium sp* إلى تلك التي تهاجم المحصول عند الخزن مثل أنواع الفطر *.Aspergillus sp*و *.Mucor sp* و *.Penicillium sp*. وعلى أي حال فأن أكثر الفطريات تواجدا هي فطريات الخزن وقد يعود سبب ذلك إلى ظروف الخزن السيئة إذ لوحظ إن أماكن جمع العينات كانت غير جيدة الإضاءة ورطبة ورديئة التهوية وهذه الظروف ملائمة لنمو الفطريات وانتشارها (الجرموندي، 2001)، فضلا عن قدرة هذه الفطريات التنافسية العالية نتيجة لامتلاكها أنظمة إنزيمية واسعة تمكنها من استغلال مدى واسع من المواد الغذائية (الهيتي ،1992و الجنابي،1998و الوائلي، 2005) وسرعة عالية على النمو وإنتاج الوحدات التكاثرية (Beneke و Rogers، 1996 والجصاني ،2007) والتضاد مع بقية الفطريات لنشاطها العالي في إنتاج المضادات الحياتية والسموم الفطرية (Bennettو Klich ،2003) ، إذ سجل Robert واخرون (1984) قدرة جنسي*Aspergillus sp.* و *Penicillium sp.* على إنتاج سموم وإنزيمات تساعد هذه الفطريات على السيادة على بقية الفطريات الأخرى. أن أنواع الفطر *Aspergillus sp.* المعزولة وخصوصا الفطر *Asp.flavus* حاليا موضوع لدراسة أخرى للتحري عن قابليته على إنتاج سموم الافلاتوكسين.

وفي جميع الحالات فأن تواجد هذا المدى من الفطريات المتهمة بإنتاجها لأنواع مختلفة من السموم الفطرية يعطي مؤشر بضرورة الاهتمام بسلامة الأعلاف(Bennettواخرون ،2003).

تم الكشف عن قابلية عزلات الفطر *Asp.flavus* على إنتاج الافلاتوكسين بدلالة تكوينها هالة متألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) بطول موجي 365نانوميتر عند تنميتها على وسطAPA ووسطCEA، إذ أظهرت السلالات المنتجة للافلاتوكسينات هالة متألقة حول المستعمرات النامية وبذلك يعد هذا فحص موجبا لقابلية السلالات على إنتاج الافلاتوكسين. أما المستعمرات الفطرية غير المنتجة للافلاتوكسينات فلم يلاحظ أي تألق عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية(UV)عند طول موجي 365 نانوميتر، حيث أظهرت نتائج فحص 17 عزلة للفطر *Asp.flavus* تم عزلها من أعلاف الدواجن قابلية 7 عزلات على إنتاج هالة متألقة حول المستعمرات النامية (صورة1)، (جدول 4). وأظهرت نتائج قياس مستوى إنتاج الافلاتوكسين (وفق التدرج الموصوف سابقا أعلاه) المبني على أساس مساحة البقعة المتألقة تحتUV بطول موجي 365 نانوميتر وعلى وسط CEA ، إن أعلى العزلات المنتجة للافلاتوكسين كانت عزلة B_6إذ أظهرت قدرة فائقة على الإنتاج (++++) تليها العزلاتB_7 ، B_8 و B_{22}التي سجلت قدرة عالية (+++) إما العزلةB_2فكانت متوسطة القدرة (++)، في حين سجلت العزلتينB_5 و B_9 قدرتضعيفة(+)على الإنتاج.



صورة (1) عزلة B_6 للفطر *Asp.flavus* المنتجة للافلاتوكسين تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 365 نانوميتر والمنماة على وسط CEA

A: **عزلة B_1 للفطر *Asp.flavus* غير منتجة للافلاتوكسين**

B: **وسط CEA غير ملقح**

C: **عزلة B_6 للفطر *Asp.flavus* المنتجة للافلاتوكسين.**

تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Carballo و DeMiguel (1987). أظهرت العزلات مستوى متباين من التألق تحت الأشعة فوق البنفسجية بعد 7 أيام من تلقيحها على وسط APA وتتفق أيضا مع ما توصل إليه Dianese و Lin (1976) و الجرموندي (2001) حيث تألقت العزلة المنتجة للافلاتوكسين وبمستويات متباينة تحت الأشعة فوق البنفسجية بعد 32 ساعة من تلقيحها على وسط CEA.

اعتمادا على نتائج اختبار القدرة على إنتاج الافلاتوكسين تم انتخاب أربع عزلات من الفطر *Asp.flavus* (أظهرت قابلية مختلفة على إنتاج الافلاتوكسين تحت ظروف الطبيعية) ، عزلة غير منتجة (−) كمعاملة للسيطرة B_1، عزلة ضعيفة القدرة على الإنتاج (+) B_5 ، عزلة متوسطة القدرة على الإنتاج (++) B_2 ، عزلة فائقة القدرة على الإنتاج (++++) B_6 ،على إنتاج الافلاتوكسين تحت ظروف المختبر وعلى الوسط الغذائي YES. أظهرت النتائج من خلال الكشف على ألواح الكروماتوكرافي الرقيقة (TLC) لمستخلصات المزارع المنتخبة أعلاه إن نوع السم المنتج هو الافلاتوكسين B_1 بدلالة معامل الترحيل وبوجود السم القياسي، وأظهرت النتائج تباين العزلات في قابليتها على إنتاج سم الافلاتوكسين B_1 (صورة 2) بدلالة التباين في درجة تألق البقع على ألواح الكروماتوغرافي الرقيقة ، فقد أظهرت تألق ازرق واضح جدا مقارنة بالسم القياسي عند تعريض اللوح إلى الأشعة فوق البنفسجية (UV) وبطول موجي 365 نانوميتر. وقد يعود التباين في درجة التألق إلى اختلاف كمية السم المنتج من قبل هذه السلالات، إذ تراوحت بين تألق ضعيف (B_5) و تألق متوسط (B_2) وتألق فائق (B_6). وهذا يعود إلى التباين الوراثي لهذه السلالات الذي ينعكس على كمية ونوعية السم المنتج بفعل تباين المسارات الايضية للفطريات المختبرة (Jones،1972).إن هذه النتائج تؤكد دقة

جدول (4) قابلية 17 عزلة للفطر *Asp.flavus* على إنتاج الافلاتوكسين B

رمز العزلة	شدة التألق تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) مقارنة بالسم القياسي*
B_1	−
B_2	+ +
B_3	−
B_4	−
B_5	+
B_6	+ + + +
B_7	+ + +
B_8	+ + +
B_9	+
B_{17}	−
B_{18}	−
B_{19}	−
B_{20}	−
B_{21}	−
B_{22}	+ + +
B_{23}	−
B_{24}	−

*حسبت درجة التألق حسب التدرج الوارد ألتالي:

− : عديمة القدرة على الإنتاج

+ : ضعيفة القدرة على الإنتاج

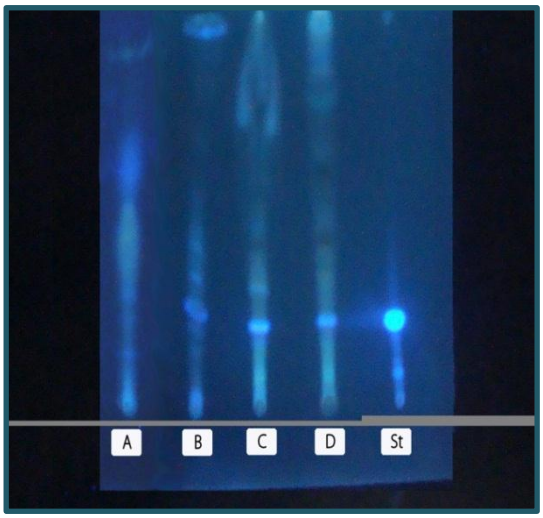
++ : متوسطة القدرة على الإنتاج

+++ : عالية القدرة على الإنتاج

++++ : فائقة القدرة على الإنتاج

نتائج الاختبار السابق وكفاءة التدرج الوارد أعلاه في الكشف النوعي وشبه الكمي عن قابلية العزلات على أنتاج سم الافلاتوكسين.

تتفق هذه النتائج مع ما ذكره قحطان (2002) من أن سلالات الفطر *Asp.flavus* تتباين في قدرتها على إنتاج سموم الافلاتوكسين ، فقد لا تنتج بعض السلالات سموم الافلاتوكسين أو انها تنتج سموم الافلاتوكسين B_1 فقط ، في حين إن سلالات أخرى يمكن أن تنتج أكثر من نوع واحد من السموم ،ويتوقف ذلك على التركيب الوراثي للسلالة وهذا ما يتفق أيضا مع ما ذكره Lee و Hagler (1991) و Frakhonry و Woloshuk (1999) في إن سلالة الفطر تحدد القابلية على إنتاج السم كماً ونوعاً.



صورة (2) قابلية عزلات الفطر *Asp.flavus* على نتاج سموم الافلاتوكسين B_1

A: عزلة غير منتجة (–) كمعامل للسيطرة B_1

B: عزلة ضعيفة القدرة على الإنتاج (+) B_5

C: عزلة فائقة القدرة على الإنتاج (++++) B_6

D: عزلة متوسطة القدرة على الإنتاج (++) B_2

St: سم الافلاتوكسين القياسي

أظهرت نتائج معاملة الافلاتوكسين على ألواح TLC بمحلول حامض الكبريتيك المركز: ميثانول (80:20) تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 365 نانوميتر، إن الافلاتوكسين المنتج من قبل السلالات المنتخبة هو من نوع افلاتوكسين B_1 بالمقارنة مع السم القياسي. إذ أدت المعاملة بالمحلول إلى تحول لون التألق من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر مما يكشف عن وجود سموم الافلاتوكسين B_1 بالمقارنة مع السم القياسي .

يعزى وجود الافلاتوكسين B_1 إلى كون هذه السلالات المنتخبة (والتي لها القابلية الوراثية على إنتاج هذا السم) ذات انتشار جغرافي واسع، فقد ذكر العزاوي(1977) إن الفطر *Asp.flavus* سجل نسبة تواجد بلغت 41.3 % من بين 705 عزلة فطرية في 9 أنواع من العلائق وان هذه العلائق ملوثة بسم أفلاتوكسين B_1 بتراكيز تراوحت بين 0.2-160 مكغم / كغم ،وكان التركيز الأعلى لهذا السم في علائق الدواجن. كما ذكر الوائلي (2005) إن 10 عزلات من مجموع 19 عزلة للفطر *Asp.flavus* المعزولة من حبوب الحنطة والذرة والشلب لها القابلية في إنتاج الافلاتوكسين B_1.

المصادر

الجرموندي ، تارة شاكر فيض الله .(2001). التحري عن التلوث الفطري في فستق الحقل المحمص واستخدام الطرائق المناعية في الكشف عنه. رسالة ماجستير.كلية الزراعة. جامعة بغداد.

الجصاني ،يسرى محمد باقر محسن .(2007). تأثير خلايا وراشح بعض عزلات بكتريا *Lactobacillus* في نمو بعض عزلات عفن *Aspergillus flavus* وسمومها أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الجنابي ،سندس جميل .(1998). تأثير بعض المواد الحافظة للأغذية في نمو الفطر *Aspergillus flavus* Link exFries وإنتاجها للافلاتوكسين في الطحين. رسالة ماجستير. تربية ابن الهيثم. جامعة بغداد.

العزاوي ،بتول زينل .(1977). دراسة مدى تلوث العلائق الحيوانية بالأفلاتوكسين والفطريات المنتجة له والمعزولة منها. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

الهيتي ،أياد عبد الواحد .(1992). السموم الفطرية. المفهوم العام. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد.

الوائلي ،هديل وائل .(2005). تأثيرات الزيت الطيار للقشور الصفراء لثمار الكريب *Citrus paradise* و أوراق حشيشه الليمون *Cymbopogon citrates* وإنتاجه للأفلاتوكسين B_1. رسالة ماجستير. تربية ابن الهيثم. جامعة بغداد.

شهاب ،احمد عباس .(1998). تلوث حاصل الذرة الصفراء بالسم (فيومينسين B1) المنتج من قبل الفطر *Fusarium moniliforme*.رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

قحطان ،فتحي عبدة عبد الله .(2002). الكشف عن سموم أفلا B_1 و B_2وسم أوكرا A في الذرة الصفراء وبعض منتجاتها. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

Beneke, E. and Rogers, A. ,(1996) Medical Mycology and Human Mycoses.Star ublishingco.Belmont.CA.

Bennett, J.W., and Klich, M.,(2003) Mycotoxin .Clin. Microbiol .Rev .16(3),497-516.

Bennett, J.W., Christensen, S.B., and Benni, A. ,(2003) New Erspectives on Aflatoxin Biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol.29,53-92.

Booth, C. ,(1971) The Genus Fusarium. Kew. Surrey. England: Common Wealth Mycological Institute.

Carballo ,M. and DeMiguel ,J.a. ,(1987) Rapid Detection of Aflatoxin- Producing Strains of the *Aspergillus flavus* Group Isolated from Mixed Feed and Cereal Grain in Spain. J.Sci.Food Agric.40,11-15.

Davis, N.D. and Diener, U.L. and Eldridage, D.W. ,(1966) Production of Aflatoxin B_1 and $G_1$by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium. Appl. Microbiol.14,378.

Dianese, J.C., and Lin, M.T. ,(1976) Acoconut Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. Phytopathology.66, 1416-1418.

Domsch, K.H.; Gams, W. and Anderson, T-H. ,(1980) Compendium of Soil Fungi. Vol.1.Academic Press.

Fente ,C.A.; Jaimez Ordaz ,J.; Vazques ,B.I.; Franco ,C.M. and Cepeda , A. ,(2001) New Additive for Culture Media for Rapid Identification of Aflatoxin Production *Aspergillus* Strains. Appl. Environ. Microbial. 67(10),4858-4862.

Frakhonry, A.M. and Woloshuk, C.P. ,(1999) Amylase Gene of *Aspergillus flavus*: Involvement in Aflatoxin Bbiosynthesis in Maize Kernels. Phytopathology.89 (10),908-914.

Jones, B.D. ,(1972) Method of Aflatoxin Analysis. G. 70. Tropical Products Institute.

Lee ,Y.J. and Hagler ,W.M. ,(1991) Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid Production by *A. flavus* Isolated from Contaminated Maiza. J.of Food Scin.:an Afficial-Publication of Institute of Food Technologists, USA.56,871-872.

Lemke, P.A.; Davis, N.D.; Lyer, S.K. and Creech,G.W. ,(1989). Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolnies of *Aspergillus* Species. Appl. Environ. Microbiol. 55,1808-1810.

Oliveira, C.A.F.; Gonçalves, N.B.; Rosim, R.E. and Fernandes, A.M. ,(2009) Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region

Shekhany ,K.A.M.,(2001) Study on Toxicity and Detoxification of Zearalenone. Ph.D. Thesis. College of Science Sulaimani University . 133.

Simmons, E.G. ,(1967) Typification of *Alternaria*, *Strephyllium* and *Ulocladium*. Mycologia.59,67-92.

Sulaiman, E. D. ,(1977) Comprehensives Survey of Fungi Associated with in Iraq with a Note on Pathogenicity and Control. M. Sc. Thesis, College of Agriculture and Foresty, Mosul, Iraq.

Seitz, L.M. and Mohr, H.W. ,(1977) New Method for Quantification of Aflatoxinin Corn. Cerela Chem. 54,179-183.

Tseng, T.C.; Tu, J.C., and Tzean, S.S. Mycoflora and Mycotoxins,(1995) Mycoflora and mycotoxins in Dry Bean (*Phaseolus vulgaris*) Produced in Taiwan and in Ontario, Canada. Bot.Bull.Acad.Sin.36,229-234.

of São Paulo. Brazil. Int. J.Mol. Sci.10,174-183.

Pitt, J.I. ,(1979) The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States, *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London and NewYork. Academic Press.

Raper, K.B. and Fennell, D.I. ,(1965) The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore.686

Robert, A.S.; Ellen, S.H. and Connie, A.N. ,(1984) Introduction to Food Borne Fungi Contamination. 2Ed.Drukkerij.J.Van Gestol and Zn. Publishers.1,205.

Romer, T.R. ,(1973) Determination of Aflatoxin in Mixed Feeds. J.of the AOAC.56-75

Sanchis ,V.; Sanclemente ,A. and Usall ,J.V. ,(1993) Incidence of Mycotoxigenic *Alternaria alternaria* and *Aspergillus flavus* in Barkey. J.Food Protect.56(3),246-248.