مجلة الزراعة العراقية البحثية (عدد خاص) مجلد16 عدد6 2011

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

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

الملخص

أظهرت نتائج التحري عن الفطريات المرافقة لسبع عينات من أعلاف الدواجن من مناطق مختلفة في محافظة ديالى ، تباين العينات من حيث أنواع الفطريات المعزولة وتكرار وجودها في العينات المدروسة والحمل الفطري الكلي للعينات ، اذ سجلت الأنواع التالية: ***Alternaria alternata*** و ***Aspergillus flavus*** و ***A.niger*** و ***Cladosporium cladosporioids*** و ***Fusarium oxysporum*** و ***Gonatobotrys simplex*** و ***Mucor sp*** و ***Penicillium cyclopium*** و ***P. expansum*** و ***P.griesofulvum*** و ***P.oxalicum*** و ***Ulocladium sp.*** و مجموعة **Mycelia sterile fungi**.

سجل الجنس ***Penicillium*** أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت **88.65%** في العينة Di_4 وسجل النوع ***P.griesofulvum*** أعلى نسبة مئوية للوجود في العينة Di_4 بلغت **88.65%** يلي ذلك الجنس ***Aspergillus*** الذي سجل أعلى نسبة توجد في العينة Di_3 بلغت **58.14%**. سجلت العينة رقم 4 أعلى قيمة للحمل الفطري الكلي بلغت **(460×10^6 cfu)** في حين سجلت العينة رقم 6 أقل حملاً فطرياً بلغ **(10×10^6 cfu)**.

أظهرت نتائج قابلية 5 عزلات من الفطر ***Aspergillus flavus*** على أنتاج الافلاتوكسين أن 3 عزلات فقط أظهرت قابلية على أنتاج الافلاتوكسين B_1 ، وتفوقت العزلة Di_1 في القابلية على الإنتاج إذ سجلت قابلية عالية في الإنتاج .

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 الأساس للإصابة بالفطريات وتلوثها بالسموم الفطرية، إذ بينت دراسة مسحية إن 28 فطراً من فطريات المخازن معظمها أنواع تابعة للجنسين***Aspergillus*** و***Penicillium*** مصاحبة للحبوب المخزونة عزلت من عينات تمثل 24 نوعاً وصنفاً من حبوب الحنطة والشعير والرز والذرة الصفراء المخزونة في شمال العراق ووسطه وجنوبه (29).

يعد تلوث الأعلاف بالسموم الفطرية أحد أهم المشاكل التي تواجه صناعة أعلاف الدواجن خصوصا في الدول النامية، بسبب افتقارها للتقانات 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 (26، 23).

فقد سجل الزوال (5) وجود الأنواع والأجناس الفطرية التالية في الذرة الصفراء وهي: ***Aspergillus flavus*** ، ***A.Parasiticus*** ، ***A.niger*** ، ***A.ochraceus*** ، ***Fusarium sp.*** و ***penicillium sp*** وكان النوع الثاني اكثرها وجوداً وتكراراً.

ووجد **Mc Mahon** وجماعته (22) إن أهم الفطريات التي تصيب الذرة الصفراء في الحقل ويمكنها

* وزارة العلوم والتكنولوجيا- بغداد، العراق.
** كلية العلوم – الجامعة المستنصرية – بغداد، العراق.

الاستمرار في المخزن spp *Altarnaria* ، *Cladosporium spp* ، *Fusarium spp* و *Helminthosporium spp* فضلا عن الإصابة ببعض الأنواع البكتيرية والخمائر. 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 ديالى وتحديد نسب وتكرار وجودها في العينات المفحوصة واختبار قابلية عزلات الفطر *A.flavus* المعزولة على إنتاج الافلاتوكسين B_1.

المواد وطرائق البحث

تم جمع سبع عينات من أعلاف الدواجن المحلية المعروضة في مناطق مختلفة من محافظة ديالى اثناء شهر تشرين أول 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 غرامات) ووضعت في دورق زجاجي حجم 250 مل مجهز بمائة مل ماء مقطر معقم، رجت العينة جيداً باستخدام جهاز الخلط المغناطيسي لمدة 5 دقائق وبذلك تم الحصول على التخفيف 10^{-1}. بعدها حضرت سلسلة من التخافيف العشرية المناسبة وصولاً إلى التخفيف 10^{-6}. أضيف 1 مل من كل من التخفيف 10^{-3} و10^{-6} كلا على انفراد إلى أطباق بتري (قطر9 سم) مجهزة بالوسط ألزرعي أكار دكستروز مستخلص البطاطا (PDA)المعامل بالمضاد الحيوي كلورامفينيكول (100 ppm)، ثلاثة أطباق 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 ما ذكر في Tseng و Tu (31) ووفق المعادلات التالية :

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

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

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

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

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

شخصت الفطريات اعتمادا على المفاتيح التصنيفية المعتمدة في 32، 25 ، 28 ،12 ،24 ،16). لغرض تحديد قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج الأفلاتوكسين تمت تنميتها على وسطي Aflatoxin Producing Ability (APA) لمدة 7 أيام تحت درجة حرارة 28 م° ، ووسط Coconut Extract Agar (CEA) لمدة 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 (13 ،21). ا ستخدم التدرج المقترح من قبل Carballo و DeMiguel (13) مع إجراء التحوير التالي:

– : لا توجد 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).

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

استخدم وسط مستخلص الخميرة – سكروز Yeast Extract Sucrose (YES) لا نه وسطا جيدا لنمو الفطريات وإنتاجها للسموم (17)،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 وسط PDA بواقع قرص قطره 7 ملم وبعمراسبوع واحد وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة. حضنت الدوارق في الظلام وبدرجة حرارة 25±2 م^o لمدة أسبوعين مع الرج اليومي ثم أجريت لها عملية استخلاص للافلاتوكسين (14).

اتبعت طريقة Jones (19) مع إجراء بعض التحويرات من قبلنا لغرض فصل السموم الفطرية (Aflatoxin) من مزارعها على وسط YESعلى النحو التالي:

- رشحت المزارع لفصل الكتلة الحية للنمو الفطري عن راشح نمو المزرعة باستخدام ورق الترشيح Whatman No: 1 في 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 في 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 الافلاتوكسين B في مستخلصات مزارع عزلات الفطر *Asp.flavus* على ألواح السليكاجل Silica gel G60 20×20 سم بعد تنشيطها في الفرن الكهربائي بدرجة 105 م^o لمدة ساعتين (30). بوجود السم القياسي AFB_1 واستخدم نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (10:90) حجم : حجم، ثم عمل خط مستقيم على لوحة TLC يبعد مسافة 2 سم من قاعدة أللوحه، أذيب المستخلص الجاف في 1 مل من الكلوروفورم وسحب منه 20 مايكروليتر ووضع بشكل بقعة على ألوحة بمسافة 1.5 سم بين كل بقعة وأخرى كما عملت بقعة واحدة من السم القياسي AFB_1 على اللوحة نفسها للمقارنة. تركت الألواح لحين جفاف البقع ووضعت في إناء الفصل الحاوي على محلول الفصل وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول إلى مسافة تقارب 18 سم من نقطة البداية (4)، أخرجت الألواح وجففت ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 365 نانوميتر وتمت مطابقة معامل الترحيل (Rf) ولون التألق مع المادة القياسية لـAFB_1.

اتبعت طريقة Romer (27) لتأكيد وجود السم AFB_1 باعتماد تغيير 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 لسبع عينات أعلاف دواجن تم جمعها من مناطق مختلفة في محافظة ديالى ، تباين العينات من حيث أنواع الفطريات المعزولة والنسبة المئوية لوجودها ضمن العينة وتكرار عزلها في العينات المفحوصة(جدول 1) ،ومعدل الحمل الفطري الكلي (جدول2) بتباين مصدر العينات .ففيما يخص الفطريات المعزولة فقد تم عزل الفطريات التالية (جدول 1): ***Alternaria alternata*** و ***Aspergillus flavus*** و ***Asp.niger*** و ***cladosporioids*** و ***Cladosporium oxysporum*** و ***Fusarium simplex*** و ***Gonatobotrys sp*** و ***Mucor cyclopium*** و ***Penicillium P. expansum*** و ***P.griesofulvum*** و ***P.oxalicum*** و ***Ulocladium sp.*** و مجموعة Mycelia sterile fungi. وقد اظهر الجنس ***Penicillium sp.*** أعلى نسباً مئوية للوجود إذ تراوح مدى وجوده من 88.65-13.95 % وسجلت العينة Di_4 أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 88.65% بينما سجلت العينة Di_3 اقل نسبة مئوية للوجود بلغت 13.95 %. أما ألنوع فقد سجل وجود الأنواع ***P. cyclopium*** و ***P. expansum*** و ***P.griesofulvum*** و ***P.oxalicum*** وبنسب تكرار بلغت قيمته 7:1، 7:3، 7:1، 7:2 % وعلى التوالي . واظهر الفطر ***P.griesofulvum*** أعلى نسبة مئوية للوجود في العينة Di_4 إذ بلغ88.65 % يليه في ذلك النوع ***P.expansum***الذي سجل أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 81.84% في العينة Di_5. ويلي ***Penicillium sp.*** جنس ***Aspergillus sp.*** الذي تراوح مدى وجوده من 7.40 -58.14% وسجلت العينة Di_3 أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 58.14% بينما سجلت العينة Di_5 اقل نسبة مئوية للوجود بلغت 7.40 %. أما مجموعة الفطريات Mycelia sterile fungi فقد تراوح مدى وجودها من 2.15-44 % وسجلت العينة Di_6 أعلى نسبة مئوية للوجود بلغت 44% بينما سجلت العينة Di_4 اقل نسبة مئوية للوجود بلغت 2.15 %. فيما يخص الحمل الفطري فقد أظهرت نتائج الحمل الفطري للعينات التي تمت دراستها (جدول 2) تباين الحمل الفطري للعينات، فقد سجلت العينة رقم 4 أعلى حملاً فطرياً بلغ 460×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف، تليها في ذلك العينة رقم 2 إذ بلغ الحمل الفطري 350×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف، تليها العينة رقم 7 إذ سجلت حمل فطري بلغ 130×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف. في حين سجلت العينات رقم 1 ، 5 و 3 حملا فطريا بلغ 110×10^6، 70×10^6 و 40×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف ، بينما سجلت العينة رقم 6 اقل حملاً فطرياً بلغ 10×10^6 وحدة مكونة للمستعمرة / غم علف جاف.

أظهرت نتائج الكشف عن الفطريات الموجودة في عينات لأعلاف 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 وجودا 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 (1) ، فضلا عن قدرة هذه الفطريات التنافسية العالية نتيجة لامتلاكها أنظمة إنزيمية واسعة تمكنها من استغلال مدى واسع من المواد الغذائية (6 ،3 ،7) وسرعة عالية على النمو وإنتاج الوحدات التكاثرية (9 ،2) والتضاد مع بقية الفطريات لنشاطها العالي في إنتاج المضادات الحياتية والسموم الفطرية (10)، إذ سجل Robert و Ellen (26) قدرة جنسي ***Aspergillus sp.*** و ***Penicillium sp.*** على أنتاج سموم وإنزيمات تساعد

جدول 1: النسب المئوية للوجود و نسب تكرار العزل للفطريات (الأجناس والأنواع التابعة لها) المعزولة من أعلاف الدواجن في محافظة ديالى

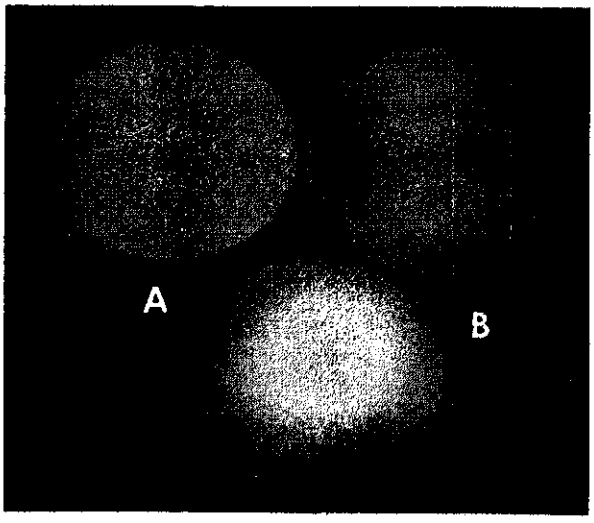
رقم العينة	الفطريات	النسبة المئوية للوجود %		نسبة تكرار العزل %	
		الجنس	النوع	الجنس	النوع
Di_1	*Aspergillus sp.*	33.33		7 : 7	
	A.flavus		1.67		7 : 5
	A.niger		31.67		7 : 6
	Cladosporium cladosporioids	5.0	5.0	7 : 3	7 : 3
	Gonatobotrys simplex	5.0	5.0		7 : 1
	Mucor sp.	3.33	3.33	7 : 1	7 : 3
	Mycelia sterile fungi	5.0	5.0	7 : 3	7 : 4
	Penicillium cyclopium	43.33	43.33	7 : 4	7 : 1
	Ulocladium sp.	5.0	5.0	7 : 3	7 : 3
Di_2	*Aspergillus sp.*	24.32			
	A.flavus		16.22		
	A.niger		8.10		
	Mucor sp.	10.81	10.81		7 : 2
	Penicillium oxalicum	64.86	64.86		
Di_3	*Alternaria alternaria*	2.33	2.33	7 : 3	7 : 3
	Aspergillus sp.		58.14		
	A.flavus		23.26		
	A.niger		34.88		7 : 1
	Fusarium oxysporum	25.58	25.58	7 : 1	
	Penicillium oxalicum	13.95	13.95		
Di_4	*Aspergillus flavus*	9.20	9.20		
	Mycelia sterile fungi	2.15	2.15		
	Penicillium griesofulvum	88.65	88.65		7 :1
Di_5	*Alternaria alternaria*	3.70	3.70		
	Aspergillus sp.		7.40		
	A.flavus		3.70		
	A.niger		3.70		
	Cladosporium cladosporioids	3.70	3.70		7 : 3
	Penicillium expansum	81.48	81.48		
	Ulocladium sp.	3.70	3.70		
Di_6	*Alternaria alternaria*	8.o	8.o		
	Aspergillus niger	12.0	12.0		
	Cladosporium cladosporioids	8.0	8.0		
	Mucor sp.	4.o	4.o		
	Mycelia sterile fungi	44	44		
	Penicillium expansum	16.0	16.0		
	Ulocladium sp.	8.0	8.0		
Di_7	*Aspergillus niger*	42.11	42.11		
	Mycelia sterile fungi	31.58	31.58		
	Penicillium expansum	26.31	26.31		

جدول 2: الحمل الفطري للعينات المدروسة على أساس العدد الكلي للوحدات المكونة للمستعمرة

رقم العينة	Cfu x 10^6 / gm
1	110
2	350
3	40
4	460
5	70
6	10
7	130

هذه الفطريات على السيادة على بقية الفطريات الأخرى. كما وأظهرت نتائج الكشف عن الفطريات وجود الفطر ***Gonatobotrys simplex*** وهو من الفطريات المتطفلة (**Mycoparasite**) على جنسي ***Alternaria sp.*** و ***Cladosporium sp.*** (**32**). وان وجود هذا الفطر مؤشر لوفرة وجود عائله (الفطريات) من جهة ، ومن جهة أخرى فهو مؤشر لإمكان استخدامه عاملا للمكافحة الإحيائية لهذه الفطريات لا سيما إذا لم يثبت إنتاجه لمواد سامة تؤثر سلبيا في قيمة أعلاف الدواجن. ويعد هذا أول تسجيل لهذا الفطر على أعلاف الدواجن. وفي الحالات جميعها فان وجود هذا المدى من الفطريات المتهمة بإنتاجها لأنواع مختلفة من السموم الفطرية (**11**) يعطي مؤشراً بضرورة الاهتمام بسلامة الأعلاف.

تم الكشف عن قابلية عزلات الفطر ***A.flavus*** على إنتاج الافلاتوكسين بدلالة تكوينها هالة متألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية (**UV**) بطول موجي **365** نانوميترا عند تنميتها على وسط **APA** ووسط **CEA**، إذ أظهرت السلالات المنتجة للافلاتوكسينات هالة متألقة حول المستعمرات النامية وبذلك يعد هذا فحص موجب 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، اذ أظهرت نتائج فحص **5** عزلات للفطر ***Asp.flavus*** تم عزلها من أعلاف الدواجن قابلية **3**عزلات على إنتاج هالة متألقة حول المستعمرات النامية (صورة**1**)، (جدول **3**). وأظهرت نتائج قياس مستوى إنتاج الأفلاتوكسين (وفق التدرج الموصوف سابقا) المبني على أساس مساحة البقعة المتألقة تحت **UV** بطول موجي **365** نانوميتر وعلى وسط **CEA** ، إن أعلى العزلات المنتجة للأفلاتوكسين كانت عزلة Di_1 إذ أظهرت قدرة عالية على الإنتاج (+++) تليها العزلة Di_2التي سجلت قدرة متوسطة (++) في حين سجلت العزلة Di_4 قدرة ضعيفة على الإنتاج (+) .



صورة 1: عزلة Di_1 للفطر ***A.flavus*** المنتجة للافلاتوكسين تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي **365** نانوميتر والمنماة على وسط **CEA**

A: عزلة Di_1 للفطر ***A.flavus*** غير المنتجة للافلاتوكسين ؛ **B**: وسط **CEA** غير ملقح؛ **C**: عزلة Di_1 للفطر ***A.flavus*** المنتجة للافلاتوكسين

تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه **Carballo** و **DeMiguel** (**13**) أظهرت العزلات مستوى متباين من التألق تحت الأشعة فوق البنفسجية بعد 7 أيام من تلقيحها على وسط **APA** وتتفق أيضا مع ما توصل إليه الجرموندي **Dianese** (**1**) و **Lin** (**15**). اذ تألقت العزلة المنتجة للافلاتوكسين وبمستويات متباينة تحت الأشعة فوق البنفسجية بعد **32** ساعة من تلقيحها على وسط **CEA**.

جدول 3: قابلية 5 عزلات للفطر *A.flavus* على إنتاج الافلاتوكسين B

رمز العزلة	شدة التألق تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) مقارنة بالسم القياسي*
Di_1	+++
Di_2	++
Di_3	–
Di_4	+
Di_5	–

*حسبت درجة التألق حسب التدرج المذكورة في ادناه:

– : عديمة القدرة على الإنتاج؛ + : ضعيفة القدرة على الإنتاج ؛ ++ : متوسطة القدرة على الإنتاج

+++ : عـالية القدرة على الإنتاج ؛ ++++ : فائـقة القدرة على الإنتاج

اعتمادا على نتائج اختبار القدرة على إنتاج الافلاتوكسين تم انتخاب أربع عزلات من الفطـر *A.flavus* (أظهرت قابلية مختلفة على إنتاج الافلاتوكسين تحت ظروف الطبيعية) ، عزلة غير منتجة (–) عاملا للسيطرة Di_3،عزلة ضعيفة القدرة على الإنتاج (+) Di_4 ، عزلة متوسطة القدرة على الإنتاج (++) Di_2 ، عزلة عالية القدرة على الإنتاج (+++)Di_1 ، على إنتاج الافلاتوكسين تحت ظروف المختبر وعلى الوسط الغذائي YES.

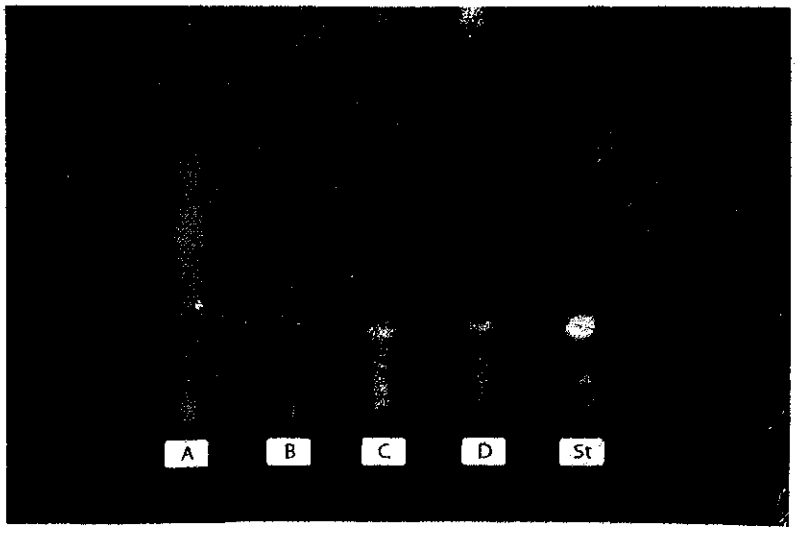
أظهرت النتائج من خلال الكشف على ألواح الكروماتوكرافي الرقيقـة (TLC) لمستخلـصات المـزارع المنتخبة آنفا إن نوع السم المنتج هو الافلاتوكسين B_1 بدلالة معامل الترحيل وبوجود السم القياسي، وأظهرت النتائج تباين العزلات في قابليتها على إنتاج سم الافلاتوكسينB_1 (صورة 2) بدلالة التباين في درجة تألق البقع على ألـواح الكروماتوغرافي الرقيقة ، فقد أظهرت تألقا ازرقا واضحا 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 (Di_4) و تألق متوسط (Di_2) وتألق عالي(Di_1). وهذا يعود إلى التبـاين الوراثي لهذه السلالات الذي ينعكس على كمية ونوعية السم المنتج بفعـل تبـاين المـسارات الايـضية للفطريـات المختبرة(20). إن هذه النتائج تؤكد دقة نتائج الاختبار السابق وكفاءة التدرج المذكور آنفا في الكشف شبه الكمـي عن قابلية العزلات على أنتاج سم الافلاتوكسين.

تتفق هذه النتائج مع ما ذكره قحطان (8) من إن سلالات الفطر *A.flavus* تتباين في قدرتها علـى إنتـاج سموم الافلاتوكسين ، فقد لاتنتج بعض السلالات سموم الافلاتوكسين أوانها 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 وهـذا ما يتفق أيضا مع ما ذكره Frakhonry و Woloshuk (18) في إن سلالة الفطر تحدد القابلية على إنتاج الـسم كماً ونوعاً.

أظهرت نتائج معاملة الافلاتوكسين على ألواح TLC بمحلول حـامض الكبريتيـك المركـز: ميثـانول (80:20) تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 365 نانوميتر، إن الافلاتوكسين المنتج مـن قبـل الـسلالات 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 ان هذه السلالات المنتخبة (والتي لها القابلية الوراثية على إنتـاج هـذا السم) ذات انتشار جغرافي واسع، فقد ذكر العزاوي (4) إن الفطر *A.flavus* سجل نسبة وجود بلغـت 41.3 % من بين 705 عزلة فطرية في 9 أنواع من العلائق وان هذه العلائق ملوثة بسم أفلا B_1 بتراكيز تراوحت بين 0.2-160

جزء بالبليون، وكان التركيز الأعلى لهذا السم في علائق الدواجن. كما ذكر الوائلي (7) إن **10** عزلات من مجموع **19** عزلة للفطر ***A.flavus*** المعزولة من حبوب الحنطة والذرة والشلب لها القابلية في إنتاج الافلاتوكسين B_1.



صورة **2**: قابلية عزلات الفطر ***A.flavus*** على إنتاج سموم الافلاتوكسين B_1 اذ يلاحظ تباين العزلات في إنتاج سموم الأفلاتوكسين بتباين القابلية الوراثية والمسارات الايضية.

A: عزلة غير منتجة (--) عاملا للسيطرة Di_3؛ **B**: عزلة ضعيفة القدرة على الإنتاج (+) Di_4؛ **C**: عزلة عالية القدرة على الإنتاج (+++) Di_1؛ **D**: عزلة متوسطة القدرة على الإنتاج (++) Di_2؛ **St**: سم الافلاتوكسين القياسي

المصادر

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

2- الحصاني، 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، العراق.

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

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

5- النزال، احمد إسماعيل احمد (**2004**). طرائق تحطيم سم الأوكرا-**A** في الذرة الصفراء وتأثيره على فروج اللحم. أطروحة دكتوراه - كلية الزراعة- جامعة بغداد، العراق.

6- السبتي، أياد عبد الواحد (**1992**). السموم الفطرية. المفهوم العام. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد.

7- الـــوائلي، هـــديل وائـــل (2005). تـــأثيرات الزيـــت الطيـــار للقـــشور الـــصفراء لثمـــار الكريب *Citrus paradise* وأوراق حشيشه الليمون *Cymbopogon citrate* وإنتاجه للأفلاتوكسين B_1. رسالة ماجستير –تربية ابن الهيثم– جامعة بغداد، العراق.

8- قحطان ،فتحي عبدة عبد الله (2002). الكشف عن سموم أفلا B_1 وB_2 وسم أوكرا A في الذرة الصفراء وبعض منتجاتها. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

9- Beneke, E. and A. Rogers (1996). Medical Mycology and Human Mycoses. Star Publishing co.Belmont.CA.

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

11- Bennett, J.W.; S.B. Christensen and A. Benni (2003). New erspectives on aflatoxin biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol, 29:53-92

12- Booth, C. (1971). The Genus Fusarium.Kew.Surrey.England: Commonwealth Mycological Institute.

13- Carballo, M. and J.A. DeMiguel (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.

14- Davis, N.D. and U.L. Diener; D.W. Eldridage (1966). Production of aflatoxin B_1 and $G_1$by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. Appl.Microbiol.,14:378.

15- Dianese, J.C. and M.T. Lin (1976). Acoconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopathology., 66: 1416-1418.

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

17- Fente,C.A.; J. Jaimez Ordaz; B.I. Vazques; C.M. Franco and A.,Cepeda (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin production *Aspergillus* strains. Appl. Environ. Microbialm, 67(10):4858-4862

18- Frakhonry, A.M. and C.P. Woloshuk (1999). Amylase gene of *Aspergillus flavus*: involvement in aflatoxin bbiosynt hesis in maize kernels. Phytopathology, 89 (10):908-914.

19- Jones, B.D. (1972). Method of aflatoxin analysis.G.70.Tropical Products Institute.

20- Lee, Y.J. and W.M. Hagler (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.

21- Lemke, P.A.; N.D. Davis; S.K. Lyer and G.W. Creech (1989). Direct visual detection of aflatoxin synthesis by minicolnies of *Aspergillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 55:1808-1810.

22- Mc Mahon, E.M.; P.A. Hartman; R.A. Saul and L.H. Teffary (1975) Deterioration of high moisture corn. Appl. Micro, 30(1):103-109.

23- Oliveira, C.A.F.; N.B. Gonçalves; R.F. Rosim and A.M. Fernandes (2009). Determination of aflatoxins in peanut products in the Northeast region of São Paulo.Brazil.Int.J.Mol.Sci., 10:174-183.

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

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

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

27- Romer, T.R. (1973). Determination of aflatoxin in mixed feeds.J.of the 28-AOAC.56-75

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

29- Sulaiman, E.D. (1977). Comprehensives survey of fungi associated with in Iriq with a note on pathogenicity and control. M. Sc. Thesis, college of Agriculture and Foresty, Mosul, Iriq.

30- Seitz, L.M. and H.W. Mohr (1977). New method for quantification of aflatoxin in corn.Cerela Chem.54:179-183

31- Tseng, T.C.; J.C. Tu and S.S. Tzean (1995). Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario, Canada.Bot.Bull.Acad.Sin., 36:229-234.

32- Whaley, J.W. and H.L. Barnett (1963). Parasitism and nutrition of *Gonatobotrys simplex*.Mycologia., 55 (2):199-210.

Iraqi J. Agric. Res. (Special Issue) Vol.16 No.6 2011

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED WITH POULTRY FEEDS IN DEILA GOVERNORATE AND DETECTION OF AFLATOXIN-PRODUCING BY STRAINS OF *Aspergillus flavus*

H. M. Aboud* H. F. Duli** M. M. Noori**

ABSTRACT

The results of the detection of the fungi associated with seven poultry feed samples from different locations in Deila governorate revealed that the feed samples varied in the isolated fungi and the percentage of occurrence and the frequency of isolation and total fungal load. The following fungi were recorded: *Alternaria alternata* , *Aspergillus flavus* ,A.*niger* , *Cladosporium cladosporioids* , *Fusarium oxysporum*, *Gonatobotrys simplex* , *Mucor sp.* , *P.cyclopium* , *P.expansum* , *P.griesofulvum* , *P.oxalicum* , *Ulocladium sp* and Mycelia sterile fungi.The genus *Penicillium* recorded the highest percentage of occurrence (88.65%) in sample Di_4 and the species *P.griesofulvum* recorded the highest percentage of occurrence in sample Di_4 (88.65%). The genus *Aspergillus* come in the next which recorded the highest percentage of occurrence in sample Di_3 (58.14%). Sample Di_4 recorded the highest total fungal load (460 x 10^6 cfu) while sample Di_6 recorded the lowest total fungal load (10 x 10^6cfu).

The results of toxigenic activity of 5 isolates of Asp.flavus showed that only 3 of them have toxigenic activity of aflatoxin production,and isolate. Di_1 was the most toxigenic isolates.

* Ministry of Sci. and Tech. - Baghdad, Iraq.
** Colleg of sci. – El- Mustansria Univ.- Baghdad, Iraq .