Investigating the Toxicity of Fungi Isolated from Livestock Feed and Poultry in Khorramabad County

Reza Darvishnia
Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramaad, Iran, reazdarvishnia72@gmail.com
Mostafa Darvishnia*
Department Plant Protection of Faculty Agriculture Lorestan University, Khorramabad, Iran, mdarvishnia44@yahoo.com
Mohammad Hossein Gharouni
Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram abad, Iran, gharouni59@gmail.com

Abstract

Introduction: Mycotoxins or toxic fungi are primary or secondary metabolic products. A wide variety of mold fungi such as Aspergillus, Fusarium and other fungi are capable of producing large amounts of dangerous mycotoxins in human and animal food.

Materials and methods: In this study, samples of animal and poultry feed were transferred to the laboratory and cultured on potato dextrose agar (PDA) medium. After isolation, purification, and identification, the toxicity of fungi was performed on the corn media, and coconut agar medium was used for toxicity assessment. Then, they were evaluated using standard toxin on the TLC plate in the TLC tank under ultraviolet (UV) light. Also, the quantitative evaluation of toxins was performed using high performance liquid chromatography (HPLC).

Results: The results showed that the samples were infected with *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *Penicilliun glabrum*, *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. fujikuroi*, *F. concentricum*, *Rhizopus oreyzae*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor* sp., *Trichothecium* sp. and *Alternaria alternata*. *Rhizomucor*, *Absidia* and *Fusarium* (15 and 27.5%) were most infected in poultry and *F. prolifratum* (62.1%) in animal feed, respectively. Also, according to TLC, *F. prolifratum* and *F. verticillioides* fungi emitted the highest light, while *Rhizomucor* received the least light and, consequently, the least toxicity. Based on HPLC results of *F. verticillioides* and *A. flavus* isolates, Fumonisin B1 and *A. niger* had the highest amount of aflatoxin G1.

Discussion and conclusion: In the present study, *Aspergillus*, *Rhizomocor* and *Fusarium* fungi showed fluorescence in coconut-agar medium. After puncturing on the TLC plate, the toxin-containing dots had a higher fluorescence intensity, which the overall results of this toxin assay by HPLC also confirmed this.

Key words: Mycotoxins, Fungi, Toxin, Livestock and Poultry

* Corresponding author
Received: November 16, 2019/ **Accepted:** January 1, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)
سال هشتم، شماره ۳۱، پاییز ۱۳۹۸ ، صفحه ۵۱-۶۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱
Doi:10.22108/BJM.2020.120098.1238

بررسی توکسین‌زایی قارچ‌های جداشده از خوراک دام و طیور شهرستان خرم‌آباد

رضا درویش‌نیا: دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، reazdarvishnia72@gmail.com
مصطفی درویش‌نیا*: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، mdarvishnia44@yahoo.com
محمدحسین قارونی: استادیار گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، gharouni59@gmail.com

چکیده

مقدمه: میکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی، فرآورده‌های متابولیکی اولیه یا ثانویه‌اند. گسترهٔ وسیعی از انواع قارچ‌های کپکی مانند *Aspergillus*، *Fusarium* و دیگر قارچ‌ها مقادیر زیادی از میکوتوکسین‌های خطرناک در غذای انسان و دام را تولید می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در بررسی حاضر، نمونه‌هایی از خوراک دام و طیور به آزمایشگاه منتقل و روی محیط کشت سیب‌زمینی‌دکستروزآگار (PDA) کشت شدند. پس‌از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی، توکسین‌زایی قارچ‌ها روی بسترهٔ ذرت انجام و محیط نارگیل آگار برای بررسی قابلیت توکسین‌زایی استفاده شد؛ سپس ارزیابی با استفاده از توکسین استاندارد روی صفحهٔ TLC در تانک TLC و زیر نور ماورا بنفش (UV) انجام شد. ارزیابی کمّی توکسین‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد.

نتایج: نتایج نشان دادند نمونه‌ها به قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *A. parasiticus*، *A. ochraceous*، *A. niger*، *Penicilliun glabrum*، *Fusarium verticillioides*، *F. proliferatum*، *F. fujikuroi*، *F. concentricum*، *Rhizopus oreyzae*، *Absidia corymbifera*، *Rhizomucor* sp.، *Trichothecium* sp. و *Alternariaalternata* آلوده‌اند. بیشترین درصد آلودگی به قارچ‌های *Rhizomucor*، *Absidia* و *Fusarium* (۱۵ و ۲۷/۵ درصد) در خوراک طیور و *F. prolifratum* (۶۲/۱ درصد) در خوراک دام مربوط بود؛ همچنین بر اساس TLC، قارچ‌های *F. prolifratum* و *F. verticillioides* بیشترین نور را ساطع کردند؛ در حالی‌که قارچ *Rhizomucor* کمترین نور و کمترین توکسین‌زایی را به خود اختصاص داد. بر اساس نتایج HPLC، جدایه‌های *F. verticillioides* و *A. flavus* بیشترین توانایی تولید فومونیسین B_1 را داشتند و *A. niger* بیشترین میزان آفلاتوکسین G_1 را داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعهٔ حاضر، قارچ‌های *Aspergillus*، *Rhizomucor* و *Fusarium* در محیط کشت نارگیل آگار خاصیت فلورسانس از خود نشان دادند. پس‌از نقطه‌گذاری روی صفحهٔ TLC، نقاط حاوی توکسین شدت فلورسانس بیشتری داشتند و نتایج کلی سنجش این سم با HPLC نیز این مطلب را تائید کردند.

واژه‌های کلیدی: میکوتوکسین، قارچ، توکسین، دام و طیور

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

آلودگی مواد غذایی به قارچ‌ها خسارت‌های عمدهٔ تولیدات غذایی را در پی دارد که باتوجه‌به شیوهٔ تهیه و نگهداری مواد غذایی، احتمال آلودگی این مواد به انواع قارچ‌ها و درنتیجه، تولید میکوتوکسین‌ها و آفلاتوکسین‌ها زیاد است (۱). دانهٔ ذرت ازنظر چربی، پروتئین، کربوهیدرات، نمک‌ها و برخی عناصر به‌گونه‌ای است که در دما و رطوبت مناسب محیط، بستری بسیار مطلوب برای رشد قارچ *Aspergillus* و تولید آفلاتوکسین‌ها محسوب می‌شود (۲). پودر ماهی و کنجالهٔ سویا به‌علت خردشدن و نداشتن پوستهٔ محافظ، به‌آسانی در دسترس قارچ‌ها قرار می‌گیرند و قارچ‌ها به‌سهولت روی آنها رشد می‌کنند (۳). طیف وسیعی از انواع قارچ‌های کپکی مانند *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium* و دیگر قارچ‌ها مقادیر درخور توجهی از میکوتوکسین‌های خطرناک را تولید می‌کنند (۴). میکوتوکسین‌ها معمولاً در اجزای مادهٔ خوراکی مانند ذرت، جو، گندم و بادام‌زمینی دیده می‌شوند و مشکل آنها تنها در خوراک حیوان یا کاهش عملکرد دام و طیور نیست؛ آنها در گوشت، شیر و تخم‌مرغ وجود دارند و تهدیدی برای سلامت انسان محسوب می‌شوند. قارچ‌های *Aspergillus*، *Fusarium* و *Penicillium* اهمیت بیشتری در تولید میکوتوکسین‌های مضر دارند. میکوتوکسین مهمی که قارچ *Aspergillus* تولید می‌کند، آفلاتوکسین است (۵). آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 متابولیت‌های قارچی‌اند که گونه‌های خاصی مانند *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* آنها را تولید می‌کنند. غلات و حبوبات در مناطق گرم و مرطوب به آفلاتوکسین و عمدتاً آفلاتوکسین B_1 آلوده می‌شوند (۶). آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 مشتقات مونوهیدروکسیلهٔ آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 هستند که در شیر انسان و حیوانات شیردهٔ تغذیه‌شده با جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 تشکیل و ترشح می‌شوند. آفلاتوکسین M_1 به‌طور گسترده در محصولات لبنی مانند شیرخشک، پنیر و ماست یافت می‌شود (۷ و ۸).

گروهی از میکوتوکسین‌ها به‌طور مستقیم یا پس‌از تغییر ساختمان شیمیایی و سیستم‌های متابولیکی با مولکول DNA واکنش می‌دهند. نتیجهٔ واکنش بین میکوتوکسین‌ها و DNA، ایجاد تغییرات اساسی در توالی اطلاعاتی DNA است که با بروز آثار جهش‌زایی و سرطان‌زایی همراه است. اتصال میکوتوکسین‌ها به DNA سبب مهار همانندسازی DNA و ممانعت از تولید RNA می‌شود (۹). تمام جدایه‌های سمی *A. parasiticus* آفلاتوکسین‌های گروه B و G را تولید می‌کنند؛ درحالی‌که بیشتر جدایه‌های گونهٔ *A. flavus* صرفاً آفلاتوکسین‌های گروه B را تولید می‌کنند. آفلاتوکسین‌های گروه G به میزان کمتری نسبت به انواع B تولید می‌شوند (۱۰). جهش‌زایی و سرطان‌زایی ناشی از آفلاتوکسین در حیوانات به‌طور گسترده بررسی و در انسان نیز ارتباط آفلاتوکسین‌ها با سرطان کبد تأیید شده است (۱۱). فومونیسین که گونه‌های خاصی از قارچ *Fusarium* شامل *F. verticillioides*، *F. proliferatum*، *F. oxysporum*، *F. globosum* و چندین گونهٔ دیگر آن را تولید می‌کنند و بیشتر در ذرت و فرآورده‌های مربوط به آن یافت می‌شود، در سال ۱۹۸۸ در جنوب آفریقا کشف شد (۱۲) و توانایی *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و برخی جدایه‌های *F. oxysporum* در تولید فومونیسین به‌ویژه

فومونیسین B_1 و B_2 گزارش شده است (۱۳ و ۱۴). آلودگی خوراک دام به فومونیسین سبب بیماری و مرگ دام می‌شود و زیان‌های اقتصادی را به همراه دارد. بر اساس تشخیص انجمن آزمایشگاه دامپزشکی آمریکا، مقدار ۵ میکروگرم‌درگرم فومونیسین برای اسب‌ها مضر است. پوست برنج که گاهی دام از آن تغذیه می‌کند، حاوی غلظت بیش از ۵ میکروگرم‌درگرم فومونیسین است. فومونیسین‌ها نسبت به حرارت مقاومند و با پخت‌وپز نابود نمی‌شوند (۱۵). در ایران، آلودگی ذرت به آفلاتوکسین‌ها در سال ۱۳۷۲ گزارش و در سال ۱۳۸۰، آلودگی بذرهای ذرت به قارچ *Aspergillus* برابر با ۴۷ درصد اعلام شد؛ آلودگی دانه‌های ذرت به این قارچ در مزارع مازندران و روی دانه‌ها گزارش شده است (۱۶ و ۱۷). در پژوهشی، تمام نمونه‌های ذرت وارداتی و داخلی گرفته‌شده از انبارهای استان اصفهان به آفلاتوکسین نوع B_1 آلوده بودند؛ در این مطالعه، بیشترین میزان آلودگی برابر با ۹/۹ میکروگرم‌درکیلوگرم اعلام شد (۱۸). در پژوهشی، نتایج بررسی میزان تولید توکسین‌های قارچی زیرالئون و داکسی‌نیوالنول تولیدشده از قارچ *Fusarium* روی پیش‌ماده‌های مختلف نشان داد این قارچ بیشترین توکسین‌زایی را روی کلش برنج دارد (۱۹). در بررسی انجام‌شده روی میزان توکسین‌زایی دو گونهٔ *A. flavus* و *Aspergillus ochraceus* در شرایط محیطی مختلف مشاهده شد رشد بهینهٔ *Aspergillus ochraceus* در دمای ۳۱ درجهٔ سلسیوس، اسیدیتهٔ ۵، رطوبت بذری ۲۷ درصد و رشد بهینهٔ *A. flavus* در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس، اسیدیتهٔ ۶ و رطوبت بذری ۲۷ درصد است و هر دو گونه قابلیت تولید آفلاتوکسین را دارند (۲۰). نتایج مطالعه‌ای با عنوان تأثیر اسیدیته و فشار اسمزی بر تولید آفلاتوکسین در قارچ *A. parasiticus* نشان دادند بیشترین توکسین‌زایی و رشد به‌ترتیب در تیمارهای اسیدیتهٔ ۶ و ۵ و در تیمار کلرورسدیم با غلظت ۳ و صفر درصد است (۲۱). آفلاتوکسین در خوراک و بذرهایی مانند برنج، بادام‌زمینی، ذرت، سویا و سایر دانه‌های ذخیره‌شده در انبار با شرایط دمایی و رطوبتی زیاد تولید می‌شود (۲۲). نتایج پژوهشی روی قارچ *A. parasiticus* نشان دادند این قارچ بیشترین میزان آفلاتوکسین را در شرایط تاریکی و دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس تولید می‌کند (۲۳) و نتایج پژوهش دیگری نشان دادند فومونیسین B در بیش از ۹۷ درصد سویه‌های *F. moniliforme* جداشده از خوراک مرغ و ۸۹ درصد نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف کاستاریکا یافت می‌شود (۲۴). فومونیسین‌ها مهم‌ترین عامل آلودگی مواد غذایی در شرق و جنوب آفریقا به شمار می‌آیند (۲۵) و از ۹۵ نمونه مادهٔ غذایی ارزیابی‌شده به روش TLC[1] طی سال ۱۹۹۰ در مصر، ۴۴/۲ درصد نمونه‌های ذرت، انواع برنج، انواع پنبه‌دانه و بادام‌زمینی به انواع آفلاتوکسین آلوده بودند (۲۶). هدف پژوهش حاضر، بررسی میزان آلودگی خوراک دام و طیور به آلودگی‌های قارچی و توکسین‌زایی آنها روی خوراک دام و طیور در شهرستان خرم‌آباد است.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی: به‌منظور شناسایی عوامل قارچی موجود در خوراک دام و طیور شهرستان خرم‌آباد، درمجموع ۱۰۰ نمونه خوراک و اجزای آن طی سال‌های ۹۷-۹۶ از ده مرغ‌داری و گاوداری فعال واقع در بخش‌های مختلف حومهٔ این

شهرستان جمع‌آوری شدند. حدود ۱۰۰ گرم از هر نمونه درون کیسه‌های پلاستیکی تمیز ریخته شد و پس‌از انتقال به آزمایشگاه، بخش‌های مختلف نمونه‌های مواد خوراکی دام و طیور به‌طور تصادفی برداشته و روی محیط‌کشت معمولی سیب‌زمینی دکستروز آگار[۲] و محیط‌کشت اختصاصی تغییریافتهٔ ناش اسنیدر[۳] کشت شدند. پس‌از رشد قارچ، زیرکشت‌هایی[۴] از حاشیهٔ جوان پرگنهٔ (کلنی) قارچ تهیه شدند و قارچ جداسازی شد؛ سپس قارچ‌ها خالص‌سازی و با مراجعه به کلیدهای معتبر و مقاله‌های منتشرشده شناسایی شدند.

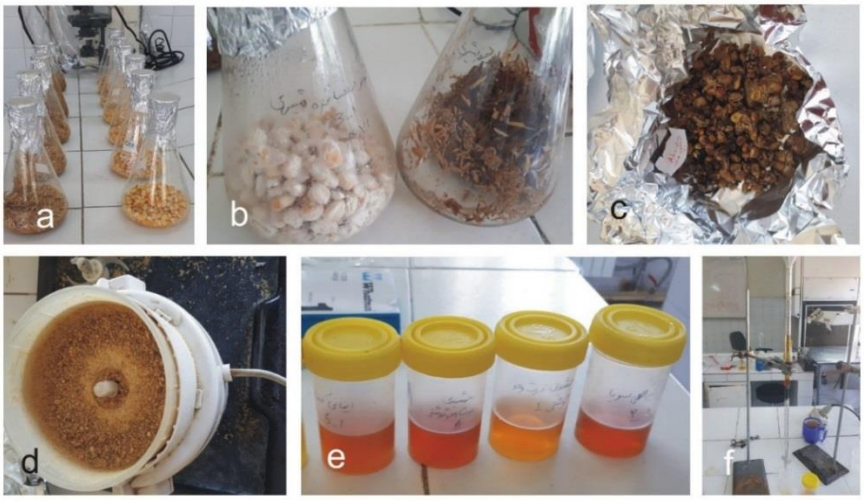
تعیین توکسین‌زایی اولیهٔ قارچ: محیط‌کشت نارگیل آگار[۵] برای بررسی اولیهٔ توکسین‌زایی قارچ استفاده شد. روش دیویس و همکاران[۶] (۱۹۸۷) با تغییرات جزئی برای تهیهٔ محیط‌کشت به کار برده شد؛ به‌این‌ترتیب که ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم پودر نارگیل در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب جوش ریخته شد و پس‌از ۵ دقیقه و چند نوبت به‌هم‌زدن، زمانی که عصارهٔ نارگیل کاملاً خارج شد، مایع حاصل از چهار لایه پارچهٔ ململ عبور داده شد؛ سپس ۲۰ گرم‌درلیتر پودر آگار و ۱۰ گرم‌درلیتر عصارهٔ مخمر به آن اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه دراتوکلاوی با فشار ۱/۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس استریل و در تشتک‌های پتری ۸ سانتی‌متری ریخته شد. قارچ روی این محیط‌کشت و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. پس‌از سه تا چهار روز از رشد قارچ، پتری‌های حاوی پرگنهٔ قارچ رشدکرده به اتاقک TLC منتقل و برای رؤیت هالهٔ آبی‌رنگ یا سبزرنگ اطراف پرگنهٔ قارچ، زیر نور UV با طول موج ۲۴۵ تا ۳۶۶ نانومتر بررسی شدند (۲۷-۲۹).

کشت قارچ روی بستر ذرت: تعدادی ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری فراهم شدند و در هریک، ۱۰۰ گرم ذرت قرار داده شد؛ سپس به‌ازای هر ۱۰۰ گرم بذر ذرت، ۳۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به ارلن‌ها افزوده و در ارلن‌ها با پنبه و فویل آلومینیومی محکم شد. ارلن‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در همین حالت نگهداری شدند تا رطوبت کافی جذب کنند و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاوی با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۱ اتمسفر قرار داده شدند تا تمام عوامل میکروبی آنها از بین بروند و ۲۴ ساعت بعد، دوباره در همین شرایط استریل شدند. پس‌از اتوکلاو دوم و سردشدن ارلن‌های حاوی بذرهای ذرت، ۵ عدد قرص میسلیومی ۱ سانتی‌متری به‌ازای هر ۱۰۰ گرم بذر ذرت از کشت ۳ تا ۴ روزهٔ قارچ در کنار شعله و زیر هود لامینار درون هرکدام از ارلن‌های حاوی ذرت مرطوب قرار داده شدند و در آنها کاملاً محکم بسته شد. ارلن‌ها تکان داده شدند تا اسپورها درون ارلن‌های حاوی بذرهای ذرت به‌طور یکنواخت پخش شوند. ارلن‌ها در اتاق تاریک قرار داده شدند و از روز سوم به بعد، روزی دو بار با احتیاط تکان داده شدند؛ این کار سبب شکسته‌شدن میسلیوم درون هر ارلن شد تا بستر را بهتر پوشش دهد. پس‌از روز هفتم، ارلن‌های حاوی بذرهای آلوده به قارچ آمادهٔ استخراج و تعیین توکسین بودند.

روش تولید توکسین: بسترهایی مانند ذرت، دانهٔ گندم یا ارزن یا شلتوک برنج استریل‌شده برای تولید توکسین از جدایه‌های قارچی و محیط‌کشت نارگیل آگار برای بررسی توکسین‌زابودن جدایه‌های قارچی استفاده شدند. به‌منظور تهیهٔ این محیط، مقدار ۲۰۰ گرم نارگیل در یک لیتر آب جوش ریخته شد و پس‌از ۵ دقیقه و چند نوبت هم‌زدن، زمانی که عصارهٔ نارگیل

کاملاً خارج شد، مایع حاصل از چهار لایه پارچهٔ ململ عبور داده شد و ۲۰ گرم آگار به آن اضافه شد. نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاوی با فشار ۱/۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس استریل و به تشتک‌های پتری ۸ سانتی‌متری منتقل و زیر نور UV با طول موج ۲۴۵ تا ۳۶۶ نانومتر ارزیابی شد (۲۷).

استخراج توکسین: به‌منظور استخراج توکسین‌های قارچی، ابتدا محتویات ارلن‌های حاوی بذرهای آلوده به قارچ به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند؛ سپس بذرهای ذرت آسیاب شدند و روی ۱۵ گرم از هر نمونهٔ آسیاب‌شده، ۴۸ میلی‌لیتر استونیتریل، ۹ میلی‌لیتر متانول و ۳ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و مواد به‌مدت ۳ ساعت روی شیکری با سرعت ۱۷۰ دوردردقیقه قرار داده شدند. مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن صاف شد و عصارهٔ حاصل از ستون تصفیهٔ حاوی رزین کاتیونی و مخلوط آلومینا- کربن عبور داده شد؛ به این منظور، ابتدا و انتهای ستون با یک لایه پشم شیشه مسدود شد، روی آن ۱ گرم مخلوط آلومینا- کربن اضافه شد و دوباره یک لایه پشم شیشه روی آن قرار داده شد. رزین کاتیونی که به‌مدت یک ساعت در آب مقطر قرار گرفته بود، در ستون ریخته شد و پس‌ازآن، عصارهٔ نمونه‌ها از ستون عبور داده شدند. عصارهٔ عبورداده‌شدهٔ ستون اول دوباره با استفاده از ستون تصفیهٔ دوم به‌ترتیب شامل پشم شیشه، آلومینا- کربن و پشم شیشه خالص شد و عصارهٔ عبورداده‌شده از ستون تصفیهٔ دوم برای تبخیر حلال به آون ۷۰ درجهٔ سلسیوس منتقل شد. پس‌از خشک‌شدن عصارهٔ استخراج‌شده، ۲ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (۱۰ به ۹۰) به آن اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد؛ سپس ۲ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (۵ به ۹۵) و ۲ میلی‌لیتر محلول استونیتریل- متانول (۳ به ۱) به آن افزوده شد و به‌منظور تبخیر حلال، دوباره در آونی با دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد؛ درنهایت، ۲ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (۵ به ۹۵) به عصارهٔ خشک‌شده اضافه شد و عصاره‌های استخراج‌شده در دمای منفی ۲۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (شکل ۱).



شکل ۱- مراحل استخراج توکسین؛ a. آماده‌سازی بستر ذرت در ارلن مایر، b. رشد قارچ روی بستر ذرت و شلتوک برنج، c. خشک‌کردن قارچ در آون ۷۰ درجهٔ سلسیوس، d. آسیاب‌کردن قارچ خشک‌شده، e. توکسن‌های ناخالص قارچی، f. خالص‌سازی توکسین قارچی

سنجش کلی سم‌های تولیدی قارچ‌ها به روش TLC[۷]: روش موسویان و همکاران (۲۱) برای سنجش TLC استفاده شد؛ به‌این‌ترتیب که پس‌از استخراج سموم، محلول‌های نمونه و استاندارد روی صفحهٔ Thin Layer Chromatography (TLC) (صفحه‌ای آلومینیومی همراه با سیلیکاژل) در یک راستا نقطه‌گذاری شدند. پس‌از اینکه صفحه در مخزن TLC قرار داده شد و محلول متانول–استونیتریل (۸۸ به ۱۲) از آن بالا رفت و صفحه شسته شد، صفحه در هوا خشک و زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیابی و شدت نقطهٔ فلورسانس آبی نمونه با نقطهٔ فلورسانس استاندارد مقایسه شد.

ارزیابی کمّی توکسین‌های موجود در عصاره به روش HPLC[۸]: دستگاه تحلیل‌گر HPLC موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه لرستان و دانشگاه خوارزمی تهران برای ارزیابی کمّی توکسین‌های موجود در عصاره به روش HPLC استفاده شد. به‌منظور تجمیع بیشتر توکسین‌ها، عصارهٔ به‌دست‌آمده به ستون ایمونوافینیتی[۹] (Biopharm Rhone Ltd, UK(R- با قطر ذرات داخلی ۰/۵ میلی‌متر وارد شد که به‌علت وجودداشتن آنتی‌بادی‌های سطحی روی ذرات، ابتدا توکسین‌ها نگهداری شدند و سپس با عبور متانول، از ستون خارج شدند و آب دیونیزه اضافه شد. دستگاه HPLC برای سنجش کمّی توکسین‌ها استفاده شد؛ به این منظور، ۲۰ میکرولیتر عصاره به ستون کروماتوگرافی فاز معکوس C18-Supelco Discovery به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر متصل به دستگاه Unicam-Crystal-200 (Brand Kinesis, UK) تزریق شد. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل (۲۰ درصد)، متانول (۲۰ درصد) و آب دیونیزه (۶۰ درصد) بود و با سرعت ۱ میلی‌لیتربردقیقه از ستون عبور کرد. آشکارساز از نوع فلورسانس در طول موج تحریکی ۳۶۵ نانومتر و طول موج خروجی ۴۴۵ نانومتر تنظیم و به‌منظور تقویت فلورسانس توکسین‌ها از ستون مشتق‌ساز تولیدکنندهٔ بر PB. PB با قطر ذرات داخلی ۰/۵ میلی‌متر (R- Biopharm Rhone Ltd, UK) استفاده شد. هرکدام از انواع توکسین‌ها بر اساس مطابقت پیک خروجی با زمان بازداری پیک استاندارد و بر اساس غلظت نمونهٔ استاندارد تعیین هویت و غلظت شد (۳۰ و ۳۱).

نتایج

نتایج نشان دادند جیره‌های غذایی شامل ذرت، سویا، کنسانتره، دان مخلوط در خوراک طیور و همچنین جیره‌های غذایی ذرت و جو، یونجه، کاه و کلش، کنسانتره و ذرت علوفه‌ای در خوراک دام به قارچ‌های مختلفی ازجمله *Aspergillus*، *Rhizopus*، *Rhizomocur*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Absidia*، *Trichotecium*، *Mucor* و *Fusarium* آلوده‌اند.

از ۴۰ جدایهٔ قارچی شناسایی‌شده در خوراک طیور، ۲۷ جدایه در روش TLC زیر نور فرابنفش، پرتوهای فلورسانس آبی‌رنگ از خود ساطع کردند و ۱۳ جدایهٔ دیگر پرتوهای فلورسانس نداشتند. بیشترین جدایه‌ها به قارچ‌های *Fusarium* با تعداد ۱۱ جدایه (۳۵ درصد)، *Rhizomocur* و *Absidia* با تعداد ۶ جدایه (۱۲/۵ و ۱۱/۷ درصد) مربوط بودند که باتوجه‌به توکسین‌زایی قارچ *Fusarium* و اهمیت فومونیسین‌ها، این قارچ یکی از عوامل اصلی در بحث توکسین‌زایی در نظر گرفته شد. جنس‌های *Alternaria* و *Trichotecium* با ۱ جدایه (۷ درصد)، کمترین جدایه‌های قارچی و درصد فراوانی را به خود اختصاص دادند. فراوانی آلودگی خوراک طیور

به جدایه‌های قارچی شامل دان مخلوط (۱۴ جدایه)، سویا (۱۳ جدایه)، ذرت (۱۰ جدایه) و کنسانتره (۳ جدایه) بود (جدول ۱). فراوانی توکسین‌زایی قارچ‌ها به‌ترتیب شامل *Fusarium* با ۱۱ جدایه (۳۵ درصد)، *Penicillium* با ۵ جدایه (۱۶ درصد)، *Rhizomucor* و *Absidia* هریک با ۶ جدایه (۱۲/۵ و ۱۱/۷ درصد)، *Aspergillus* و *Rhizopus* هرکدام با ۴ جدایه (۷ و ۱۰ درصد) و *Alternariana* و *Trichotecium* هریک با ۱ جدایه (۲/۵ و ۱/۸ درصد) بود؛ همچنین از این تعداد قارچ توکسین‌زا، ۱۱ جدایه سویا، ۱۰ جدایه دان مخلوط، ۴ جدایه ذرت و ۲ جدایه کنسانتره را آلوده کردند.

از ۳۷ جدایهٔ مربوط به خوراک دام، ۱۷ جدایهٔ قارچی در روش TLC زیر نور فرابنفش، پرتوهای فلورسانس آبی‌رنگ از خود ساطع کردند و ۲۰ جدایهٔ دیگر پرتوهای فلورسانس نداشتند. بیشتر جدایه‌ها به قارچ *Fusarium* مربوط بودند که گونه‌های *F. prolifratum* و *F. verticillioides* به‌ترتیب با ۲۳ جدایه (۶۱ درصد) و ۱۰ جدایه (۲۶ درصد) بیشترین جدایه‌ها و درصد فراوانی را به خود اختصاص دادند؛ همچنین کمترین درصد فراوانی به جنس *Alternaria* و گونهٔ *F. concentericum* هریک با ۱ جدایه (۶/۶ و ۱/۴ درصد) مربوط بود. فراوانی آلودگی خوراک دام به جدایه‌های قارچی شامل کنسانتره (۱۵ جدایه)، ذرت و جو (۸ جدایه)، ذرت علوفه‌ای (۷ جدایه)، کاه و کلش (۴ جدایه) و یونجه (۳ جدایه) بود (جدول ۲). فراوانی توکسین‌زایی قارچ‌ها به‌ترتیب شامل *F. verticillioides* با ۸ جدایه (۲۱/۶ درصد)، *F. prolifratum* با ۸ جدایه (۲۱/۶ درصد) و *F. fujikuoroi* با ۱ جدایه (۲/۷ درصد) بود؛ همچنین از این تعداد قارچ توکسین‌زا، فراوانی آلودگی خوراک به‌ترتیب شامل کنسانتره با ۹ جدایه، ذرت و جو با ۶ جدایه، کاه و کلش با ۲ جدایه و یونجه و ذرت علوفه‌ای بدون نمونهٔ توکسین‌زا بود.

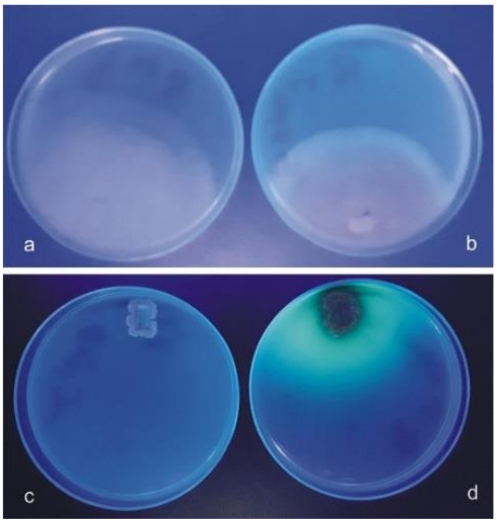
جدول ۱- تعداد نمونه و درصد آلودگی جیره غذایی آلوده به قارچ در خوراک طیور

		تعداد جدایه و درصد آلودگی																			
		Fusarium spp.		*Alternaria alternata*		*Penicillium glabrum*		*Aspergillus* spp.		*Absidia corymbifer*		*Terichotecium* sp.		*Rhizopus oryzae*		*Mucor* sp.		*Rhizomucor* sp.	
نمونه	تعداد جدایه	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (٪)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)	جدایه	آلودگی متوسط (درصد)
ذرت	۱۰	۲	۰/۲	۱	۰/۱	–	–	–	–	۱	۰/۱	–	–	۴	۰/۴	–	–	۲	۰/۲
سویا	۱۳	۶	۰/۴۶	–	–	۲	۰/۱۵	۱	۰/۰۸	۱	۰/۰۸	–	–	–	–	–	–	۳	۰/۲۳
کنسانتره	۳	۲	۰/۶۷	–	–	۱	۰/۳۳	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
دان مخلوط	۱۴	۱	۰/۰۷	–	–	۲	۰/۱۴	۳	۰/۲۱	۴	۰/۲۹	۱	۰/۰۷	–	–	۲	۰/۱۴	۱	۰/۰۷
مجموع	۴۰	۱۱	۰/۳۵	۱	۰/۰۲۵	۵	۰/۱۶	۴	./۰۷	۶	۰/۱۱۷	۱	۰/۰۱۸	۴	۰/۱	۲	۰/۰۳۵	۶	۰/۱۲۵
درصد آلودگی			۳۵		۲/۵		۱۶		۷		۱۱/۷				۱۰		۳/۵		۱۲/۵

جدول ۲- تعداد نمونه و درصد آلودگی جیرهٔ غذایی آلوده به قارچ در خوراک دام

تعداد جدایه و درصد آلودگی											
		F. prolifratum		*F. verticillioides*		*F concentericum*		*F. fujikuoroi*		*Alternaria alternata*	
نمونه	تعداد جدایه	جدایه	متوسط آلودگی (درصد)	جدایه	متوسط آلودگی (درصد)	جدایه	متوسط آلودگی (درصد)	جدایه	متوسط آلودگی (رصد)	جدایه	متوسط آلودگی (درصد)
ذرت و جو	۸	۳	۰/۳۸	۳	۰/۳۸	–	–	۲	۰/۲۵	–	–
کنسانتره	۱۵	۹	۰/۶	۵	۰/۳۳	۱	۰/۰۷	–	–	–	–
کاه و کلش	۴	۳	۰/۷۵	۱	۰/۲۵	–	–	–	–	–	–
یونجه	۳	۱	۰/۳۳	۱	۰/۳۳	–	–	–	–	۱	۰/۳۳
ذرت علوفه‌ای	۷	۷	۱	–	–	–	–	–	–	–	–
مجموع	۳۷	۲۳	۰/۶۱	۱۰	۰/۲۶	۱	۰/۰۱۳	۲	۰/۰۵	۱	۰/۰۶۷
درصدآلودگی			۶۱٪		۲۶٪		۱/۳٪		۵٪		۶/۷٪

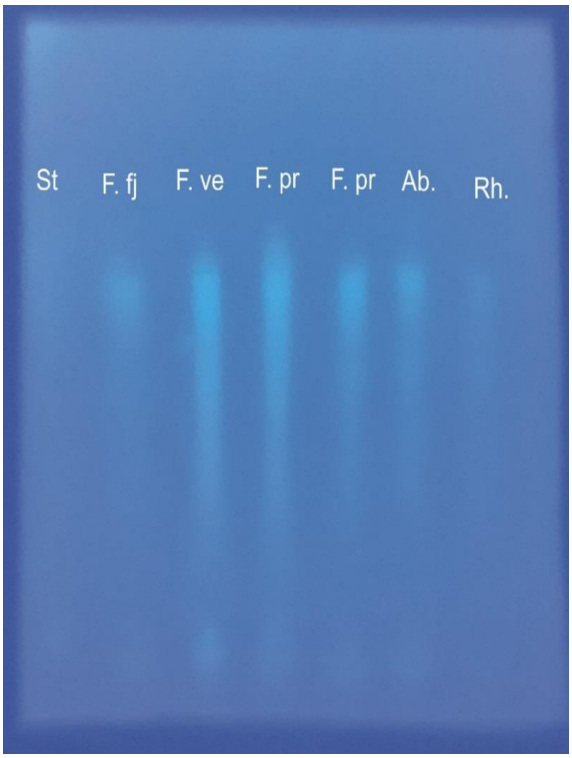
نتایج مطالعه روی محیط‌کشت نارگیل آگار: این روش برای تشخیص جدایه‌های توکسین‌زای *Aspergillus* پیش از عملیات استخراج توکسین و TLC استفاده شد. نتایج نشان دادند گونه‌های *Aspergillus* فلورسانس آبی از خود نشان می‌دهند و گونه‌های دیگر فلورسانس نشان نمی‌دهند (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج مطالعه روی محیط نارگیل آگار (*Aspergiluus flavus*)؛ a. قارچ بدون توکسین در محیط PDA، b. قارچ بدون توکسین در محیط نارگیل آگار، c. قارچ دارای توکسین در محیط PDA، d. قارچ دارای توکسین در محیط نارگیل آگار

نتایج آزمایش‌های TLC و HPLC: تجزیه‌وتحلیل آزمایش‌های TLC و HPLC نشان داد قارچ‌های *F. prolifratum* و *F. verticillioides* بیشترین نور را از خود ساطع می‌کنند و این در حالیست که قارچ *Rhizomucor* کمترین نور و درنتیجه، کمترین توکسین‌زایی را به خود اختصاص می‌دهد. باتوجه‌به

خاصیت فلورسانس آفلاتوکسین زیر نور UV و با درنظرگرفتن اینکه هرچه غلظت سم بیشتر باشد، انتظار می‌رود شدت نور فلورسانس بازتابیده از آن نیز بیشتر باشد، جدایه‌هایی که توکسین بیشتری داشتند، فلورسانس بیشتری نیز تولید کردند (شکل ۳).



شکل ۳- نقطه‌گذاری فومونیسین‌های استاندارد و نمونه‌های استخراجی تیمارهای مختلف روی صفحهٔ TLC و زیر نور UV

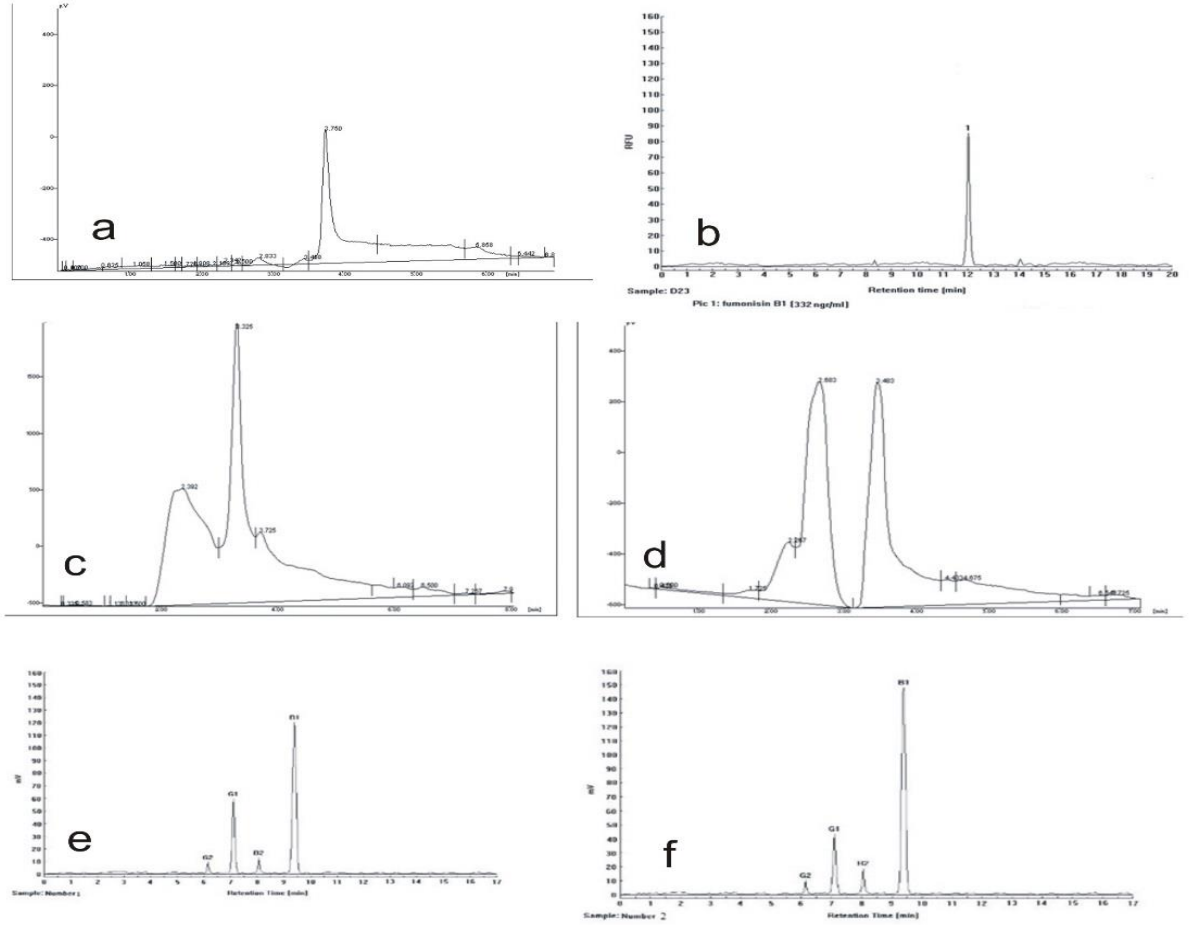
نتایج آزمایش‌های HPLC سه جدایه از قارچ *Fusarium*: پس‌از انجام آزمایش TLC مربوط به گونه‌های *F. prolifratum*، *F. verticillioides* و *F. fujikouri*، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا برای دستیابی به نوع و میزان توکسین استخراج‌شده انجام شد (شکل ۴، a، b، c و d). نتایج HPLC اولیه برای جدایه‌های *Fusarium* نشان دادند قارچ *F. verticillioides* بیشترین توانایی تولید فومونیسین B_1 را نسبت به *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* دارد. بر اساس این یافته‌ها، غلظت فومونیسین جدایه‌های *F. verticillioide* که بیشترین توانایی توکسین‌زایی را بین جدایه‌ها داشتند، ۰/۳۳۲ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر بود (جدول ۳).

جدول ۳- غلظت فومونیسین B1 در آزمایش HPLC

نمونه قارچ	غلظت فومونیسین B1 (µgr/ml)
Fusarium verticillioides	۰/۳۳۲
Fusarium prolifratum	۰/۰۵
Fusarium fujikuroi	۰/۰۲

کروماتوگرام حاصل از HPLC نمونهٔ استاندارد قارچ *Fusarium* و گونه‌های *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* نشان داد گونه‌های مطالعه‌شده توکسین فومونیسین B_1 را دارند (شکل ۴، a، b، c و d).

نتایج آزمایش‌های HPLC قارچ *Aspergillus*: پس‌از انجام آزمایش TLC، دو نمونه از توکسین‌های تولیدی مربوط به گونه‌های *A. niger* و *A. flavus* برای تعیین نوع و میزان توکسین استخراج‌شده به روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا ارزیابی شدند و نتایج HPLC اولیه برای جدایه‌های *Aspergillus* نشان دادند گونهٔ *A. flavus* بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین B_1 و گونهٔ *A. niger* بیشترین میزان آفلاتوکسین G_1 را دارد (شکل ۴، e و f). گونهٔ *A. flavus* با غلظت ۱۷/۱۹ میکروگرم‌برمیکرولیتر بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین B_1 و گونهٔ *A. niger* با غلظت ۱۲/۲۵ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر بیشترین میزان آفلاتوکسین G_1 را دارد (جدول ۴).



شکل ۴- کروماتوگرام HPLC فومونیسین B_1؛ a. تولیدی از نمونهٔ استاندارد *Fusarium*، b. تولیدی از قارچ *F. verticillioides*، c. تولیدی از *F. proliferatum*، d. تولیدی از *F. fujikuroi*، e. تولیدی از *Aspergillus niger*، f. تولیدی از *A. flavus*

جدول ۴- غلظت آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1، G_2 در آزمایش HPLC

نمونهٔ قارچ	B_1 (µgr/ml)	B_2 (µgr/ml)	G_1 (µgr/ml)	G_2 (µgr/ml)
Aspergillus niger	۱۲/۲۵	۰/۵۹	۵/۸۶	۰/۲۸
Aspergillus flavus	۱۷/۱۹	۱/۵۷	۴/۰۷	۰/۴۰

بحث

قارچ *Aspergillus flavus* در محیط‌کشت نارگیل آگار خاصیت فلورسانس از خود نشان داد که بادرنظرگرفتن خاصیت فلورسانس آفلاتوکسین‌ها، این قارچ توانایی تولید آفلاتوکسین را دارد و حضور ترکیباتی در محیط‌کشت سبب تحریک خاصیت فلورسانس آن می‌شود؛ به‌طوری‌که این ترکیبات به شناسایی آفلاتوکسین‌ها کمک می‌کنند. ازآنجاکه این قارچ در محیط‌کشت PDA خاصیت فلورسانس ندارد؛ پس‌از نقطه‌گذاری روی صفحهٔ TLC، نقاط حاوی آفلاتوکسین‌های بیشتر، شدت فلورسانس بیشتری از خود نشان می‌دهند. پژوهش‌های بسیاری در این زمینه انجام شده‌اند و مشخص شده است تولید نور فلورسانس به‌علت ماهیت طبیعی آفلاتوکسین‌هاست و فلورسانس طبیعی آفلاتوکسین‌ها از ساختار حلقوی پنتاهیدروسیکلیک اکسیژنهٔ آنها ناشی می‌شود (۳۲). ایامانکا[۱۰] و همکاران بیان کردند حضور برخی ترکیبات

در محیط‌کشت سبب تحریک خاصیت فلورسانس می‌شود و به گسترش و روش‌های شناسایی این ترکیبات کمک می‌کند؛ گزارش‌های این پژوهشگران نتایج آزمایش حاضر را تأیید می‌کنند (۳۳). نتایج نمونه‌های مطالعه‌شده با نتایج پژوهشگرانی ازجمله دیویس[۱۱] و همکاران (۱۹۸۷) و میلنز[۱۲] و همکاران (۲۰۰۲) که از محیط‌کشت نارگیل آگار برای شناسایی سریع آفلاتوکسینی استفاده کردند که گونه‌های مختلف قارچ *Aspergillus* تولید می‌کنند، مطابقت دارند. پس‌از تجزیهٔ سموم تولیدی به روش TLC و HPLC مشخص شد در قارچ *A. flavus*، کمیت آفلاتوکسین‌ها با شدت نور حاصل از محیط‌کشت و کاغذ TLC رابطهٔ مستقیم دارد (۲۷ و ۳۴)؛ این مطلب در پژوهش‌های کوتولی[۱۳] و همکاران اثبات شده است (۲۸). لمک[۱۴] و همکاران پس‌از کشت قارچ *Aspergillus* روی محیط نارگیل آگار بیان کردند مشاهدهٔ هالهٔ فلورسانس اطراف پرگنهٔ قارچ‌ها زیر نور فرابنفش در طول موج ۳۶۵ نانومتر نشان‌دهندهٔ توانایی قارچ‌ها در تولید آفلاتوکسین‌هاست (۳۵). در پژوهش‌های دیگر مشخص شده است خاصیت فلورسانس این ماده زیر نور فرابنفش به‌علت وجود متیل‌بتاسیکلودکسترین است که با تأثیر آنزیم سیدترانس‌گلیکولاز روی دکستران تولید و طی واکنش با آفلاتوکسین‌ها سبب افزایش خاصیت فلورسانس آنها زیر نور فرابنفش با طول موج ۳۶۰ نانومتر می‌شود (۳۶).

استفاده از روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و روش Enzyme Link Immuno Sorbant Assary (ELISA).برای سنجش آفلاتوکسین امکان‌پذیر است (۳۷ و ۳۸). در پژوهش حاضر، میزان کمّی و کیفی آفلاتوکسین‌های تولیدی گونه‌های *Aspegillus* با سه روش محیط‌کشت نارگیل آگار، TLC و HPLC سنجیده شد؛ اساس کار دو روش اول بر خاصیت فلورسانس آفلاتوکسین‌هاست. در روش نارگیل آگار، صرفاً توانایی تولید آفلاتوکسین‌ها بررسی می‌شود، ولی در دو روش دیگر میزان تولید آفلاتوکسین نیز تعیین می‌شود. در روشTLC، مجموع سموم تولیدی محاسبه می‌شود، ولی در روش HPLC آفلاتوکسین‌ها تفکیک و میزان تولید هرکدام مشخص می‌شود. گزارش شده است روش TLC ضریب تغییرات نسبتاً زیادی دارد و تنها در جایی به کار می‌رود که سطوح آلودگی میکوتوکسین بیشتر از حدود کنترل‌پذیر باشد؛ باوجوداین، روش یادشده یکی از آسان‌ترین روش‌های شناسایی آفلاتوکسین‌هاست که در زمان‌ها و مکان‌های مختلف می‌توان توکسین‌ها را به‌سهولت و با کمترین امکانات تشخیص داد و از آثار سوء آنها پیشگیری کرد (۳۹).اغلب روش‌هایی که به‌تازگی برای شناسایی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها استفاده می‌شوند، حساسیت زیادی دارند؛ باوجوداین، مرحلهٔ استخراج آفلاتوکسین به کمک حلال را نیاز دارند و هزینه‌بر و زمان‌برند؛ ازاین‌رو استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی آفلاتوکسین‌ها، روشی ساده و اقتصادی برای شناخت اولیهٔ قارچ‌های آفلاتوکسین‌زا در آزمایشگاه‌هایی است که امکانات لازم برای شناسایی شیمیایی آفلاتوکسین را ندارند (۴۰). پژوهشگران بسیاری از روش به‌کارگیری محیط‌های کشت اختصاصی استفاده کرده‌اند: آلمیدا[۱۵] و همکاران برای جداسازی فلور قارچی و شناسایی آفلاتوکسین در نمونه‌های ذرت به‌ترتیب از محیط‌های کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار و نارگیل آگار استفاده کرده‌اند (۴۱). لمک و همکاران از محیط‌کشت

عصارۀ نارگیل با عنوان روشی مناسب برای شناسایی آفلاتوکسین‌ها برای کشت *A. flavus* و *A. parasiticus* استفاده کرده‌اند (۳۸). لین[۱۶] و دیانز[۱۷] از محیط نارگیل آگار برای شناسایی آفلاتوکسین‌ها استفاده کرده‌اند (۴۲). دیویس و همکاران و میلانز و همکاران هالۀ آبی‌رنگ و فلورسانت‌شدۀ آفلاتوکسین‌ها را با استفاده از محیط‌کشت مشخص کرده‌اند (۲۷ و۳۴).

نقطه‌گذاری روی صفحۀ TLC مشخص کرد نمونه‌های آفلاتوکسین استخراجی از روی بسترۀ ذرت پس‌از نقطه‌گذاری، چنانچه غلظت سم زیادی داشته باشند، شدت فلورسانس بیشتری نیز از خود نشان می‌دهند و نور بازتابیده از آنها بیشتر و حتی اندازۀ نقاط بزرگ‌تر است (شکل ۲). در همین زمینه، فنت[۱۸] و همکاران بیان کرده‌اند خاصیت فلورسانس این ماده زیر نور فرابنفش از وجود متیل‌بتاسیکلودکسترین ناشی می‌شود (۴۳).

قارچی مانند *A. flavus* ازنظر توکسین‌زایی اهمیت دارد. این قارچ آفلاتوکسین B_1 را تولید می‌کند که بیشترین سمیت را نسبت به سایر آفلاتوکسین‌های تولیدی قارچ *Aspergillus* دارد. بین دو گونۀ قارچ *Aspergillus* آزمایش‌شده که توکسین‌زایی آنها بررسی شد، گونۀ *A. flavus* با تولید ۱۷/۱۹ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر در مقایسه با گونۀ *A. niger* با تولید ۱۲/۲۵ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر، تولید آفلاتوکسین بیشتری داشت. باتوجه‌به سمیت زیاد و مقدار زیاد توکسین تولیدی، فعالیت این قارچ روی بذرها و جیره‌های غذایی سلامت انسان و دام را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به خطر می‌اندازد؛ برای نمونه، خوردن تخم‌مرغ آلوده به توکسین این قارچ یا شیر آلوده به آفلاتوکسین M_1 که از مشتقات آفلاتوکسین B_1 است، انسان را به عوارض ناشی از مصرف آفلاتوکسین‌ها مبتلا می‌کند. این قارچ در مرغ‌داری‌ها سبب ایجاد بیماری آفلاتوکسیکوزیس[۱۹] در طیور می‌شود (۴۴). سازمان غذا و داروی ایالات متحدۀ آمریکا سطح قابل‌تحمل آفلاتوکسین در جیرۀ طیور را ۲۰ قسمت در بیلیون (ppb) گزارش کرده است (۴۵). هنک[۲۰] و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کرده‌اند از میان ۱۴۲ نمونه دانۀ گیاهی جیرۀ طیور جمع‌آوری‌شده از بخش‌های مرکزی، جنوبی و شرقی تگزاس، ۷ درصد نمونه‌ها بیش از ۱۰۰ میکروگرم‌درکیلوگرم آفلاتوکسین داشتند و ۸۳ درصد این نمونه‌ها ذرت بودند (۴۶). علاوه‌بر گونه‌های *Aspergillus*، جنس‌های دیگری از سایر گروه‌های قارچی در جیرۀ غذایی طیور وجود داشتند که برخی از گونه‌های آنها مانند *F. proliferatum* دارای قابلیت توکسین‌زایی بودند. اگرچه سایر قارچ‌های شناسایی‌شده در پژوهش حاضر قابلیت توکسین‌زایی ندارند، ازنظر حساسیت‌زایی و ایجاد حساسیت‌های پوستی در طیور و کارگران اهمیت زیادی دارند (۱۶). باتوجه‌به میزان مجاز سمیت (LD_{50}) آفلاتوکسین B_1 که سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برابر ۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین کرده است، بدیهی است در کودکان به‌علت کم‌بودن وزن آنها و دریافت آفلاتوکسین بیش از مقدار مجاز و به‌ویژه تجمع‌پذیری درازمدت سموم در کبد و کلیه‌ها، عوارض سوء بیشتر بروز می‌کنند. اگل[۲۱] و همکاران گزارش کرده‌اند میزان ترکیب آلبومین- آفلاتوکسین موجود در خون کودکان نه‌ماهه تا پنج‌سالۀ بنین و توگو واقع در غرب آفریقا به میزان ۹۹ درصد افزایش یافته است که از وجود آفلاتوکسین در ذرت و بادام‌زمینی مصرفی در رژیم غذایی ناشی می‌شود (۴۷). ذرت یکی از ترکیبات

غذایی اصلی به‌کاررفته در جیرهٔ غذایی طیور و دام است و شرایط میزبانی و ترکیبات به‌کاررفته در دانهٔ ذرت، شرایط را برای ترجیح میزبانی و استقرار قارچ‌های توکسین‌زا فراهم می‌کند. سوسل[۲۲] و همکاران با مطالعه روی شش نوع دانهٔ گیاهی جیرهٔ پرندگان گزارش کردند همراه با افزایش رطوبت دان و مدت زمان نگهداری آن، میزان آلودگی قارچی و توکسین‌زایی آن افزایش می‌یابد (۴۸). بسیاری از جدایه‌های *Aspergillus* جداشده روی بسترهٔ ذرت قابلیت توکسین‌زایی داشتند؛ به‌طوری‌که بیشتر جدایه‌ها روی محیط‌کشت نارگیل آگار و TLC رنگیزهٔ فلورسانس آبی از خود نشان دادند. به نظر می‌رسد میزان رطوبت و دمای محل نگهداری (واحد تولیدی بلغور و واحد مصرف‌کنندهٔ بلغور) در فراهم‌کردن شرایط رشد و فعالیت قارچ‌ها که به تولید آفلاتوکسین منجر می‌شود، نقش بسزایی دارند (۴۹). باتوجه‌به مطالب یادشده، شرایط رطوبتی و تهویهٔ نامناسب و رعایت‌نکردن اصول درست خشک‌کردن و انبارداری ذرت و سایر بذرها از سوی انبارداران و مرغ‌داران در مراحل مختلف تولید تا مصرف عامل مهم افزایش درصد فراوانی این‌گونه قارچ‌ها و درنتیجه، توکسین تولیدی از آنهاست؛ ازاین‌رو، رعایت اصول صحیح انبارداری باید مدنظر مرغ‌داری‌ها قرار گیرند. نتایج خسروی[۲۳] و همکاران در زمینهٔ بررسی قارچ‌شناسی ترکیب اجزای غذای دامی در گاوداری‌های شهر قم نشان دادند میزان آلودگی به قارچ *Aspergillus* زیاد است و *A. flavus* با ۴۸ درصد بیشترین میزان آلودگی را دارد (۵۰)؛ در نتایج وسنا[۲۴] و همکاران در زمینهٔ بررسی قارچ‌های جداشده از خوراک طیور گوشتی صربستان نیز تعداد گونه‌های *آسپرژیلوس* ۵۴ درصد گزارش شده است (۵۱).

از ۱۰۸ نمونهٔ آزمایش‌شده در مطالعهٔ کارانجا[۲۵] و همکاران روی قارچ‌های توکسین‌زا در صربستان، ۸۴ درصد به *Fusarium* و ۵۹ درصد به قارچ‌های دیگر آلوده بودند که بر حسب گونه‌های قارچی غالب تقریباً با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد (۵۲). چنانچه فرآورده‌هایی ازجمله پودر ماهی، ذرت و کنجالهٔ سویا در محیط‌های مرطوب نگهداری شوند یا در فرآوری آنها یا در مسیر حمل‌ونقل آنها دقت لازم نشود، شرایط رشد قارچ روی آنها فراهم می‌شود، اسپورهای موجود رشد و تولید سم می‌کنند (۵۳). از مقایسهٔ نتایج این بررسی و مطالعه‌های انجام‌شده در سایر کشورها می‌توان نتیجه گرفت آلودگی به قارچ و سم ناشی از آن در اقلام عمدهٔ مواد غذایی و خوراک دام و طیور وجود دارد و باید هنگام برداشت تمام اقلام تشکیل‌دهندهٔ خوراک دام و طیور، استانداردهای جهانی اِعمال شوند و شرایط مناسبی برای حمل و نگهداری تا زمان مصرف آنها فراهم شود. نکتهٔ شایان توجه دیگر اینست که هرچه زمان برداشت محصول در نقطهٔ پایانی خط تولید یا در زمان تهیهٔ خوراک تا زمان مصرف کمتر باشد، احتمال آلودگی کمتر است.

استفاده از روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع[۲۶]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و روش الایزا[۲۷] برای سنجش فومونیسین میسر است (۵۴ و ۵۵). در پژوهش حاضر، میزان کمّی و کیفی فومونیسین‌های تولیدی از قارچ *F. verticillioides* با استفاده از دو روش TLC و HPLC سنجیده شد (۵۶). در روش TLC می‌توان مجموع سموم تولیدی را به‌دست آورد، ولی در روش HPLC می‌توان میزان تولید فومونیسین‌ها را تفکیک و میزان تولید هرکدام از جدایه‌ها را

مشخص کرد؛ درحقیقت، فومونیسین تولیدی قارچ *F. verticillioides* چهار نوع است که فومونیسین B_1 به بیشترین میزان ممکن تولید می‌شود.

نگارندگان در بازدید از مرغداری‌ها و گاوداری‌های شهرستان خرم‌آباد با انباشت بسیاری از جیره‌های غذایی مواجه شدند که بدون استفاده در انبارها جمع‌آوری شده بودند و در پاسخ به پرسش دربارهٔ علت بی‌استفاده‌ماندن آنها، تلفات در اثر مصرف روزانهٔ این مواد به‌ویژه در ماکیان مشخص شد. در نمونه‌های منتقل‌شده به آزمایشگاه نیز مشخص شد غالباً آلودگی‌های کپکی موجود روی ذرت و سویا عامل مرگ‌ومیر طیور است و بیشتر قارچ‌های جداشده روی نمونه‌ها به دو گونهٔ *F. prolifratum* و *F. verticillioides* مربوط بودند که هر دو از گونه‌های توکسین‌زا و کپک‌هایی‌اند که قابلیت بیماری‌زایی و حساسیت‌زایی در انسان و طیور را دارند؛ این در حالی است که بنا به گزارش لانیاسونیا[۲۸] و همکاران در سال ۲۰۰۵، تا مرحلهٔ تبدیل اقلام به دان مخلوط و آماده‌شده، در اثر ناآگاهی بسیاری از مرغداران از نگهداری درست دان آماده‌شده یا وجودنداشتن انبار و جایگاه مناسب برای نگهداری دان به‌ویژه در مناطق و فصل‌هایی که درصد رطوبت هوا زیاد است، شرایط مساعد برای رشد بیشتر قارچ و تولید بیشتر سم فراهم می‌شود (۵۷).

امروزه نیز دو روش TLC و HPLC همچنان به‌طور وسیع در تشخیص و ردیابی فومونیسین‌ها کاربرد دارند. دانتزر[۲۹] و همکاران غلظت فومونیسین B_1 را در محیط‌کشت مایع فیزیکی با استفاده از روش HPLC اندازه‌گیری و میزان آن را ۷۵۰ میلی‌گرم بیان کردند (۵۸). در بررسی دیگر که ولوتی[۳۰] و همکاران روی ۵۸ نمونه مواد غذایی مبتنی بر ذرت در اسپانیا انجام دادند، با استفاده از HPLC مشخص شد ۸۶ درصد نمونه‌ها حاوی مقادیر زیادی از فومونیسین B_1 هستند (۵۹). در پژوهش دیگری که علی‌اکبری[۳۱] و همکاران در مزارع ذرت منطقهٔ مغان انجام دادند، میزان داکسی‌نیوالنول (DON) نمونه‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) تعیین شد و نتایج تجزیهٔ نمونه‌ها نشان دادند آلودگی ذرت‌های این منطقه به DON در ۴۵ درصد کل نمونه‌ها وجود دارد و میانگین کل آلودگی ۹۵/۳۰ نانوگرم‌درگرم است (۶۰).

باتوجه‌به آلودگی زیاد فوزاریوم‌ها در غذای ترکیبی طیور در کاراتاکای هند، از ۷۱ ترکیب خوراک طیور بررسی‌شده، گونهٔ *Fusarium verticilloides* با ۸۹ درصد بیشترین فراوانی را بین گونه‌های *Fusarium* به خود اختصاص داد (۶۱).

در بررسی آلودگی‌های خوراک دامی به قارچ‌های توکسین‌زا در صربستان و نگاهی اختصاصی به گونه‌های *Fusarium* در بلگراد، از ۱۰۸ نمونهٔ مختلف خوراک دامی جمع‌آوری‌شده از مزارع دامی، ۸۴ درصد گونه‌های *Fusarium*، ۵۹ درصد گونه‌های *Aspergillus*، ۴۹ درصد *Rhizopus*، ۴۴ درصد *Mucor* و ۴۲ درصد *Penicillium* جداسازی شدند که گونهٔ *F. vertecilloides* (با فراوانی ۴۶ درصد) بیشترین فراوانی را در گونه‌های *Fusarium* به خود اختصاص داد (۵۱). در بررسی فلور قارچی خوراک طیور در کشور مصر، از ۱۱۰ نمونهٔ جمع‌آوری‌شده، گونه‌های *Fusarium*، *Penicillium*، *A. fumigatus* و *Rhizopus* گونه‌های غالب به‌دست‌آمده از جیره‌های غذایی معرفی شدند (۶۲).

نتیجه‌گیری

درمجموع از ۱۰۰ نمونه خوراک دام و طیور، ۷۷ نمونهٔ قارچی روی محیط‌کشت PDA رشد کردند که از این تعداد، ۴۰ نمونه قارچ به خوراک طیور و ۳۷ نمونه قارچ به خوراک دام مربوط بودند. به‌طورکلی گونه‌های مختلفی ازجمله *Aspergillus*، *Rhizopus*، *Rhizomocur*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Absidia*، *Trichotecium*، *Mucor* و *Fusarium* از خوراک دام و طیور جداسازی شدند که به‌علت وجود انواع فومونیسین‌ها و آفلاتوکسین‌ها به‌ویژه B_1، می‌توان آنها را عوامل اصلی توکسین‌زایی در خوراک دام و طیور برشمرد؛ به‌طوری‌که این قارچ‌ها به‌علت انواع ترکیبات توکسینی و همچنین توکسین‌زایی و سمیت زیادی که دارند، اهمیت دارند. نتایج آزمایش TLC نشان دادند گونه‌های قارچی از خود فلورسانس آبی نشان می‌دهند و برخی جدایه‌ها فلورسانس آبی را به‌وضوح نشان نمی‌دهند؛ ازاین‌رو، قارچ‌های *F. prolifratum* و *F. verticillioides* بیشترین نور را از خود ساطع کردند و نتایج HPLC به‌دست‌آمده از قارچ‌های *Fusarium* و *Aspergillus* نشان دادند قارچ *F. verticillioides* بیشترین توانایی تولید فومونیسین B_1 را نسبت به *F. proliferatum* و *F. Fujikuroi* دارد و *A. flavus* با تولید آفلاتوکسین B1 و *A. niger* با تولید آفلاتوکسین G_1 بیشترین توانایی تولید توکسین را دارند. حاکم‌نبودن شرایط مطلوب در انبار مواد غذایی و مزرعه سبب ابتلای مواد غذایی به قارچ می‌شود که علاوه‌بر خسارت به گیاهان، خطرهای بسیار زیادی با تولید توکسین برای سایر موجودات دارد.

References

(1) Mikaili A. Aflatoxin bread flour and yeast species in Kermanshah in 2003. 9th Iranian Nutrition Congress Tabriz. Tabriz: University of Tabriz press; 2003.

(2) Asevedo I., Gambale W., Correa B., Paula C., Almeida R., Framil V. Influence of temperature and relative humidity on production of aflatoxins in samples of stored maize artificially contaminated with *Aspergillus flavus* (Link). *Revista de Microbiologia* 1993; 24: 32-37.

(3) Stanley VG., Ojo R., Woldesenbet S., Hutchinson DH., Kubena LF. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science* 1993; 72: 1867-1872.

(4) Kazemi VA. Consumption of rice contamination by fungi that produce mycotoxins in East Azerbaijan Province. *Medical Science* 2008; 30(3): 111-118.

(5) Hamzehkhani R., Khavari H. The toxicity of mycotoxins, prevention and treatment. *Asian Journal of food and Agro-Industry* 2009; 114.

(6) Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Allameh A., Kazeroon-Shiri A., Ranjbar-Bahadori S., Mirzahoseini H., A survey on disribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia* 2006; 161(3): 183-192.

(7) Frobish R., Bradley B., Wagner D., Long-Bradley P., Hairston H. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *Journal of Food Protection* 1986; 49: 781-785.

(8) Sweeney MJ., Dobson AD. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 43: 141-158.

(9) Khosravi AR., Shokrp H., Yahyaraeyat R., Soltani M. Isolation toxigenic and nontoxigenic fungi from feedstuffs referred to the center of mycology. *Journal Faculty Veterenary Medicin* 2004; 59(3): 221-226.

(10) Frisvad JC., Skouboe P., Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 2005; 28: 442-453.

(11) Wild CP., Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 2010; 31: 71-82.

(12) Scott PM. Recent research on fumonisins: A review. *Food Additives and Contaminants: Part A* 2012; 29(2): 242-248.

(13) Rheeder JP., Marasas WFO., Vismer HF. Production of fumonisin analogs by Fusarium species. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68(5): 2101-2105.

(14) Canxing D., Qin Z., Yang Z., Li W., Sun S., Zhu Z., Wang X. Identification of pathogenic *Fusarium* spp. causing maize ear rot and potential mycotoxin production in China. *Toxins* 2016; 8(6): 186.

(15) Abbas HK., Cartwright RD., Shier WT., Abouzied MM., Bird CB., Rice LG., Frank Ross PG., Sciumbato L. and Meredith FI. Natural occurrence of fumonisins in rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Plant Diseases* 1998; 82(1): 22-25.

(16) Boujari J. and Ershad D. An Investigation on Corn- seed Mycoflora. *Iranian Journal of Plant Pathology* 1993; 29: 23-35.

(17) Contamination of some corn hybrids with Aflatoxins B1 and B2 and its producing fungi in field. *Plant Diseases* 2001; 69(2): 79-84.

(18) Rasti Ardakani M. Determination of aflatoxin contamination of corn in central depository of Isfahan. M.Sc. Thesis. *Tehran University of Medical Sciences* 1995; 14-17.

(19) Davari M., Safaie N., Darvishnia M., Didar Taleshmikaeel R. Occurrence of deoxynivalenol producing isolates of *Fusarium graminearum* species complex associated with head blight of wheat in Moghan area. *Journal of Crop Protection* 2014; 3: 113-123.

(20) Moosavian M., Darvishnia M., Bazgir E. The effect of pH and NaCl on the aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *Iranian Journal of Plant Protection* 2016; 46(2): 259-267.

(21) Moosavian M., Darvishnia M., Khosravinia HA., Comparison of growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in different conditions of temperature, moisture and pH. *Applied Research in Plant Protection* 2016; 5(2): 1-12.

(22) Cavalheiro AC. Aflatoxin and Aflatoxicosis- A Review. *World's Poultry Science Journal* 1981; 37: 34-38.

(23) Bennett J., Dunn J., Goldsman C. Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillusparasiticus*. *Applied and Envir onmental Microbiology* 1981; 41: 488-491.

(24) Viquez OM., Castell-Perez ME., Shelby RA. Occurrence of fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44(9): 2789-2791.

(25) Doko BM., Canet C., Brown N., Sydenham EW., Mpuchane S., Siame BA. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996: 44(10): 3240-3243.

(26) Abdelhamid A. Occurrence of some mycotoxins (aflatoxin, ochratoxin A, citrinin, zearalenone and vomitoxin) in various Egyptian feeds. *Archives of Animal Nutrition* 1990; 40: 647-664.

(27) Davis N., Iyer S., Diener U. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53: 1593-1595.

(28) Cutuli M., Cuellar A., Camara J., Mateos A., Suarez G. Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains

isolated from trout feed. *Mycopathologia* 1991; 113: 121-125.

(29) Atanda O., Ogunrinu M., Olorunfemi F. A neutral red desiccated coconut agar for rapid detection of aflatoxigenic fungi and visual determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* 2011; 4: 147-155.

(30) Trucksess MW., Stack ME., Nesheim S., Albert RH., Romer TR. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 1994; 77(6): 1512-1521.

(31) Shephard G., Krska R. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 395: 1215-1224.

(32) Tavakoli HR., Kamkar A., Riazipour M., Mozaffari Nejad A., Rafati H. Assessment of aflatoxin M_1 levels by enzyme-linked immunosorbent assay in yoghurt consumed in Tehran, Iran. *Asian Journal Chemistry* 2013; 25: 2836-2838.

(33) Iamanaka BT., de Menezes HC., Vicente E., Leite RS., Taniwaki MH. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control* 2007; 18: 454-457.

(34) Milanez T., Schoenlein-Crusius I., Okino L. Evaluation of Brazilian terrestrial *Aspergillus* strains for mycotoxin production. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2002; 61: 7-11.

(35) Lemke PA., Davis ND., Iyer SK., Creech GW., Diener UL. Fluorometric analysis of iodinated aflatoxin in minicultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Industrial Microbiology* 1988; 3: 119-125.

(36) Fente CA., Jaimez JO., Vazquez BI., Franco CM., Cepeda CM. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin- producing *Aspergillus* strains. *Applied Environment Microbiology* 2001; 67(10): 4858-4862.

(37) Ahmed SA., Abo El-Makarem HS. Aflatoxin M1 levels in milk and some dairy products in Alexandria City. *Assiut Veternary Medical Journal* 2013; 59(139): 93-98.

(38) Rastogi S., Dwivedi PD., Khanna SK., Das M. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004; 15(4): 287-290.

(39) Sydenham EW., Shephard GS., Thiel PG., Stockenström S., Snijman PW., Van DJS. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 1996; 79(3): 688-696.

(40) Arseculeratne S., De Silva L., Wijesundera S., Bandunatha C. Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Applied Microbiology* 1969; 18: 88-94.

(41) Almeida AP., Corrêa B., Mallozzi MA., Sawazaki E., Soares LMV. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology* 2000; 31: 321-326.

(42) Lin M., Dianese J. A coconut agar medium for rapid detection of anatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 1976; 66: 1466-1469.

(43) Fente CA., Jaimez JO., Vazquez BI., Franco CM., Cepeda CM. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin- producing *Aspergillus* strains. *Applied Environment Microbiology* 2001; 67(10): 4858-4862.

(44) Choudhary G. Biodeterioration in Emblica based Medicinal products and their Aflatoxin contamination. *Ancient Science of Life* 2011; 30: 65.

(45) Aravind KL., Patil VS., Devegowda G., Umakantha B., Ganpule SP. Efficacy of modified glucamannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance, serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science* 2003; 82: 570-576.

(46) Henke SE., Gallardo VC., Martinez B., Bailey R. Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37: 831-835.

(47) Egal S., Hounsa A., Gong Y., Turner P., Wild C., Hall A., Hell K., Cardwell K. Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 104: 215-224.

(48) Scussel VM. Aflatoxin and food safety: recent South American perspectives. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 2004; 23: 179-216.

(49) Bandyopadhyay R., Kiewnick S., Atehnkeng J., Donner M., Cotty P., Hell K. Biological control of aflatoxin contamination in maize in Africa. Abstr. Tropentag 2005 Conf. Int. Agric. Res. Dev. *Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland*; 2005.

(50) Khosravi AR., Dakhili M., Shokri HA mycological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom Province, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition* 2008; 7: 31-34.

(51) Vesna K., Stonjonovic R. Contamination of animal feed with potentially toxigenic fungi with spicial refrence to genus *Fusarium* species .*Oriental Science* 2008: 823-826.

(52) Krnjaja V., Stojanović L., Cmiljanić R., Trenkovski S., Tomašević D. The presence of potentially toxigenic fungi in poultry feed. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2008; 24: 87-93.

(53) Schweitzer SH., Quist CF., Grimes GL., Forster DL. Aflatoxin levels in corn available as wild turkey feed in Georgia. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37: 657-659.

(54) Krstović S., PopovićVrangeš A., Kasalica A., Jevtić M., Jajić I. Aflatoxin M1 transfer rate from milk into cheese and wehy during the production of hard cheese. *Contemporary Agriculture* 2018; 67(3-4): 215-220.

(55) Rastogi S., Dwivedi PD., Khanna SK., Das M. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004; 15(4): 287-290.

(56) Sydenham EW., Shephard GS., Thiel PG., Stockenström S., Snijman PW., Van DJS. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 1996; 79 (3): 688-696.

(57) Lanyasunya T., Wamae L., Musa H., Olowofeso O., Lokwaleput I. The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. *Pakistan Journal of Nutrition* 2005; 4: 162-169.

(58) Dantzer WR., Hopmans E., Clark A., Hauck C., Murphy PA. Purification of fumonisin B1 from liquid cultures of Fusarium proliferatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44(12): 3730-3732.

(59) Velluti A., Marin S., Sanchis V., Ramos AJ. Note. Occurrence of fumonisin B1 in Spanish corn-based foods for animal and human consumption. *Food Science and Technology International* 2001: 7(5): 433-437.

(60) Aliakbari Z., Aminian H., Mirabulfathi M., Karami Osboo R. *Fusarium* species and Deoxynivalenol in maize product of Moqan region. *Entomology and Phytopathology* 2011; 79(2): 163-180.

(61) Dass RS., Sreenivasa MY., Janardhana GR. High Incidence of *Fusarium verticillioides* in Animal and Poultry Feed Mixtures Produced in Karnataka, India. *Plant Pathology Journal* 2007; 6(2): 174-178.

62- Moharram A., Abdel-Gawad K., Megalla S., Mahmoud AL. Fungal flora of poultry feedstuff ingredients. *Journal of Basic Microbiology* 1989; 29: 491-499.

[1]- Thin Layer Chromatography (TLC)
[2]- Potato Dextrose Agar (PDA)
[3]- Nash and Snyder
[4]- Sub culture
[5]- Coconut Agar
[6]- Davis *et al.*
[7]- Moosavian
[8]- High-Performance Liquid Chromatography
[9]- Immunoaffinity columns(IAC)
[10]- Iamanaka
[11]- Davis
[12]- Milanez
[13]- Cutuli
[14]- Lemke
[15]- Almeida
[16]- Lin
[17]- Dianese
[18]- Fente
[19]- Aflatoxicosis
[20]- Henke
[21]- Egal
[22]- Scussel
[23]- Khosravi
[24]- Vesna
[25]- Krnjaja
[26]- Liquid Chromatography (LC)
[27]- Enzyme Link Immuno Sorbant Assary (ELISA)
[28]- Lanyasunya
[29]- Dantzer
[30]- Velluti
[31]- Aliakbari