نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۰، پاییز ۱۳۹۲

تعیین آلودگی قارچی در غذای دست ساز و کارخانه ای قزل آلای رنگین کمان

• **سهیل علی نژاد** (نویسنده مسئول)
استادیار آموزش، گروه دامپزشکی، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی وزارت جهاد کشاورزی، تهران
• **مهدی رزاقی ابیانه**
دانشیار پژوهش بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران
• **سید سهیل قائم مقامی**
مربی آموزش، گروه دامپزشکی، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی وزارت جهاد کشاورزی، تهران
• **امیر اقبال خواجه رحیمی**
استادیار آموزش، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران
• **محمد رهاننده**
استادیار آموزش، موسسه آموزش عالی علمی- کاربردی وزارت جهاد کشاورزی، مرکز آموزش میرزاکوچک خان رشت
• **سید رضا صابری**
کارشناس ارشد صنایع غذایی، گروه صنایع تبدیلی و تکمیلی، موسسه آموزش عالی علمی- کاربردی وزارت جهاد کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۳۷۳۱۶۵
Email: isopod47@yahoo.com

چکیده

در تحقیق حاضر آلودگی قارچی غذای مصرفی قزل آلای رنگین کمان با تاکید بر قارچ های بالقوه مولد مایکوتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها از یک کارخانه تهیه خوراک دام و نیز از ۶ مزرعه پرورش تهیه شدند. در کارخانه تولید خوراک از مواد اولیه تشکیل دهنده پلت شامل گندم، آرد گندم، سویا، پودر ماهی، گلوتن و نشاسته و نیز محصول نهایی و از مزارع پرورش قزل آلا از خوراک مصرفی نمونه گیری بر اساس دستورالعمل شماره ۷۵۷۰ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران صورت گرفت. نمونه ها در کیسه های پلاستیکی سربسته به آزمایشگاه منتقل شدند و بلافاصله رقت های مختلف تهیه شده از نمونه ها به منظور جداسازی قارچ به محیط های *Aspergillus flavus* و *A.parasiticus* (AFPA) دیکلران رزبنگال کلرامفنیکل آگار (DRCA) منتقل گردید. کلنی های قارچی به محض ظهور بر روی محیط های کشت از طریق کشت مجدد بر روی محیط سابورو دکستروز آگار، خالص شده و با استفاده از تلفیقی از ویژگی های مورفولوژیک ماکرو و میکروسکوپی در سطح جنس و گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده، در مجموع ۱۳۳ گونه قارچ از ۱۱ جنس با فراوانی های مختلف جدا شد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به محصول نهایی کارخانه (۱۸/۰۴درصد) و سپس به ترتیب آرد گندم (۱۷/۲۹درصد) و گلوتن (۱۵/۷۸درصد) بود. گونه های آسپرژیلوس از همه محل های نمونه گیری غیر از یک مورد گزارش شدند. جنس آسپرژیلوس با ۵۴/۸۸ درصد بالاترین فراوانی را دارا بود و بعد از آن به ترتیب جنس های سودالشریا (۱۲/۰۳ درصد)، پنیسیلیوم (۱۰/۵۲درصد) و آبسیدیا (۹/۷۷) قرار داشتند. در بین گونه های جدا شده بیشترین جداسازی مربوط به گونه *A. flavus* (۳۶/۸۴درصد) بود. از محصول نهایی کارخانه خوراک دام و مواد اولیه آن در مجموع ۱۰۹ گونه قارچ از ۱۱ جنس جدا شد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به پلت (۲۲/۰۱درصد) و سپس آرد گندم (۲۱/۱درصد) و گلوتن (۱۹/۲۶درصد) بود. گونه های جنس آسپرژیلوس از همه نمونه های غذایی گزارش شدند، در حالی که جنس های سودالشریا و الوکلادیوم فقط از پلت جدا شدند. جنس آسپرژیلوس با ۵۵/۹۶ درصد بالاترین فراوانی را دارا بود و بعد از آن به ترتیب جنس های پنیسلیوم (۱۲/۸۴درصد)، آبسیدیا (۱۱/۰۱درصد) و سودالشریا (۱۰/۱درصد) قرار داشتند. سهم *A. flavus* ۳۳/۹۴درصد بود. در نمونه های به دست آمده از خوراک قزل آلا در ۶ مزرعه پرورش در مجموع ۲۴ گونه قارچ از ۶ جنس جدا شد، که آسپرژیلوس به تنهایی ۵۰ درصد از این آلودگی را تشکیل می داد که همگی مربوط به گونه *A. flavus* بود. سه مزرعه از غذای دست ساز و سه مزرعه از غذای آماده استفاده می کردند. میزان آلودگی در غذای دست ساز بیشتر از غذای آماده بود.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، خوراک ماهی، *A. flavus*، آلودگی قارچی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 100 pp: 35-46

Fungal contamination in handmade and factory-made feed of rainbow trout (*Oncorhincus mykiss*)

By: S. Alinezhad, (Corresponding Author; Tel: +989123373165) Assistant Professor, Department of Veterinary Medicin, Higher Education Institute of Applied Science and Technology of Jahad Agriculture, M. Razzaghi-Abyaneh, Associate Professor, Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran. S. S. Ghaemmagami, Lecturer, Department of Veterinary Medicin, Higher Education Institute of Applied Science and Technology of Jahad Agriculture, Tehran, A. Egbal Khajehrahimi,, Assistant Professor, Department of Fisheri Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran. M. Rahanandeh, Assistant Professor, Higher Education Institute of Applied Science and Technology of Jahad Griculture, Mirza Kochak Vocation and Higher Education Center for Fisheries Science, Guilan, Rasht, Iran,, S. R. Saberi, M.S. Food Science , Department of Food Science, Higher Education Institute of Applied Science and Technology of Jahad Agriculture, Tehran

Received: March 2012 **Accepted: March 2012**

In the present study, fungal contaminations of trout feed were examined with special attention of potentially mycotoxigenic fungi. The feed samples were obtained from a factory and 6 farms. Sampling was done on final pellets and their ingredients including wheat, wheat flour, soya, fish powder, gluten and starch in the factory and in the farm according to the instruction of Institute of Standard and Industrial Research of Iran (No: 7570). Samples were transferred to the laboratory in nylon bags and cultured for fungal isolation on specific media i.e. *Aspergillus flavus* and parasiticus agar (AFPA) and Dichloran rosebengal chloramphenicol agar (DRCA). Fungal colonies were purified from primary cultures by sub-culturing on Sabouraud dextrose agar plates and identified at the genus or species level by a combination of macro- and microscopic morphological criteria. Based on the results obtained, a total of 133 fungal isolates belonging to 11 different genera were isolated. The most contamination occurred on the factory's final production stage, followed by the wheat flour (17.29%) and gluten (15.78%). Aspergillus species were isolated from all the samples except one. The genus aspergillus was the most prominent fungus isolated (54.88%) followed by the genera penicillium (10.52%) and Absidia (9.77%). *Aspergillus flavus* was most frequently isolated fungus (36.84%). A total number of 109 fungal species from 11 genera were isolated from the pellets and feed ingredients in the factory. The most contamination was in the pellet (22.01%), followed by wheat flour (21.1%) and gluten (19.26%). Aspergillus species were present in all the samples, while pseudallscheria and ulocladium were isolated only from the pellets. Aspergillus was the most prominent genus (55.99%), followed by the genera penicillium (12.84%), absidia (11.01%) and pseudallscheria (10.1%). From the farm samples, a total of 24 fungal species were isolated, of which 50% were belonging to the genus aspergillus from the species, *Aspergillus flavus*. Three of the farms used handmade feed while the other three farms consisted of factory made feed. The feeds that were handmade were more contaminated than that of the factory made feed.

Key words: Rainbow trout, *Oncorhincus mykiss*, Trout feed, *Aspergillus flavus*, Fungal contamination

مقدمه

غذای قزل آلای رنگین کمان از اجزای مختلفی تشکیل شده است که مواد اصلی آن پودر ماهی، سویا، آردگندم، گلوتن، نشاسته و روغن می باشد. کیفیت نامطلوب هریک از این اجزای تشکیل دهنده اثرات مستقیم و غیرمستقیم بر کیفیت گوشت تولید شده خواهد داشت. عوامل متعددی باعث تغییرات نامطلوب در اجزای تشکیل دهنده جیره یا محصول نهایی می شوند. شدت این تغییرات به حدی است که بعضی اوقات منجر به غیر قابل مصرف شدن ماده غذایی می شود. غذای مورد استفاده در کارگاه های پرورش یا به صورت کارخانه ای بوده و یا دست ساز می باشد. در هر دوی این موارد کیفیت مواد اولیه و بعد شرایط نگهداری در مرغوبیت ماده غذایی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است.

یکی از عوامل مهم تأثیرگذار در کیفیت ماده غذایی قارچ ها هستند. قارچ ها از نظر سازماندهی سلولی در یکی از پنج سلسله متعلق به یوکاریوت ها قرار می گیرند و از زیر گروه های متعدد و متنوع تشکیل شده اند (شمس قهفرخی، علی نژاد، رزاقی ابیانه، ۱۳۸۴). حضور قارچ ها از دو جنبه ایجاد فساد و تولید سم در ماده غذایی دارای اهمیت

است. این قارچ ها روی غذاهایی که در شرایط بد نگهداری میشوند رشد کرده (Ardalani، Motalebi و Jamili، ۲۰۰۳) و به طور وسیعی غذا و محصولات کشاورزی را آلوده می کنند. محصول نهایی شامل چندین ماده اولیه است که هرکدام از این ها می توانند آلوده به یک یا چندین سم قارچی باشند که در نتیجه محصول نهایی نیز آلوده به سموم مختلف خواهد بود (Chelkowski، ۱۹۹۱؛ Franceschi،Bidoli، Baron و Vacchia، ۱۹۹۵). این سموم توسط سوش های خاصی از قارچ های رشته ای مانند آسپرژیلوس، پنیسیلیوم و فوزاریوم تولید می شوند. این قارچ ها به محصول در سطح مزرعه و نیز به مواد غذایی نگهداری شده در انبار درشرایط نا مساعد دمایی و رطوبتی حمله می کنند (Berry،۱۹۹۸؛ Smith Solomons، Lewis و Anderson، ۱۹۹۵). مهم ترین این سموم قارچی آفلاتوکسین ها هستند آفلاتوکسین ها عمدتاً توسط دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* تولید می شوند (Dutta و Das، ۲۰۰۰). *A. flavus* از گونه های اصلی مولد آفلاتوکسین است که مسئول آلودگی محصولات کشاورزی قبل از برداشت و یا در دوران نگهداری در انبار می باشد (Hedayati، Pasqualotto، Waen و Bowyer، ۲۰۰۷) . تاکنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین مورد شناسایی قرار گرفته اند که ازاین میان انواع G۱، B۱ و M۱ بیشترین اهمیت را دارند (علامه، رزاقی ابیانه، ۱۳۸۰). سموم عمده تولید شده توسط *A. flavus* آفلاتوکسین های B۱ و B۲ هستند درحالی که *A. parasiticus* علاوه برآن، دو سم دیگر یعنی G۱ و G۲ را هم تولید می کند (رزاقی ابیانه، پیله ور سلطان احمدی، شمس قهفرخی، علی نژاد، ۱۳۹۰؛ Bennett و Klich، ۲۰۰۳؛ Bhatnagar، Nierman، Whitelaw، Yu و Cleveland، ۲۰۰۴). هر دو گونه ذکر شده قادر به تولید آفلاتوکسین می باشند (رزاقی ابیانه، سلطان احمدی، شمس قهفرخی، علی نژاد، ۱۳۹۰; علامه، رزاقی ابیانه، ۱۳۸۰). در میان انواع آفلاتوکسین، نوع B۱ دارای بالاترین سمیت بوده و هپاتوکارسینوژنیک ترین ترکیب طبیعی است (Bennett وKlich، ۲۰۰۳). آفلاتوکسین B۱ به دلیل سمیت بالا و گسترش وسیع در مواد غذایی خام مورد مصرف در انسان و دام، معمولترین سم قارچی است که توسط FDA کنترل می شود (Coulombe، ۱۹۹۳). سایر ترکیبات سمی تولید شده توسط *A. flavus* شامل استریگماتوسیستین[۱]، سیکلوپیازونیک اسید[۲]، آفلاتریم[۳]، گلیوتوکسین[۴] و آسپرژیلیک اسید[۵] هستند. علاوه براین *A. flavus* می تواند بعضی دیگر از متابولیت های ثانویه مانند دی هیدروکسی آفلاوینین[۶]، ایندول، پاسپالینین[۷] و ورسیکلرین[۸] A را نیز تولید کند. لازم به ذکر است تمامی سویه های *A. flavus* و *A. parasiticus* قادر به تولید آفلاتوکسین نیستند. سویه های مولد سم نیز در همه محیط ها توانایی تولید سم را ندارند (علامه، رزاقی ابیانه، ۱۳۸۰؛ Mateos،Camara، Cuellar، Cutuli و Suarez، ۱۹۹۱). میزان گسترش آلودگی به این قارچ ها با توجه به موقعیت جغرافیایی، شرایط انبار و مراحل عمل آوری ماده غذایی متنوع است (Payne، Thompson، Zuber،Lillehoj و Adkins، ۱۹۸۸). مناسب ترین زمان، دما و رطوبت نسبی برای رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین به ترتیب ۲ تا ۳ هفته، ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد و ۸۸ تا ۹۵ درصد تعیین شده است (علامه، رزاقی ابیانه، ۱۳۸۰، اما رطوبت مهم ترین متغیر است (Gibson، Baranyi، Eyles، Pitt و Robert، ۱۹۹۴). با کاهش رطوبت ماده غذایی به کمتر از ۱۲ درصد، رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین متوقف خواهد شد. مناسب ترین درجه حرارت برای رشد *A. parasiticus* ۳۵ درجه سانتی گراد است. با این حال، حداکثر تولید آزمایشگاهی آفلاتوکسین هم بر روی محیط های مصنوعی و هم بر روی محیط های طبیعی در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد صورت می گیرد و فرآیند تولید سم در حرارت های پایین تر از ۷/۵ و بالاتر از ۴۰ درجه سانتی گراد متوقف خواهد شد. دمای حداقل، مطلوب و حداکثر برای تولید آفلاتوکسین به ترتیب ۱۲ ، ۲۷ و ۴۰ تا ۴۲ درجه سانتی گراد است (Asis، Paola و Aldao، ۲۰۰۲؛ Davis و Diener، ۱۹۷۰) وسعت اثرات ناشی ازآلودگی اغذیه به آفلاتوکسین درماهیان به فاکتورهای متعدد شامل قدرت اثر آفلاتوکسین (نوع آفلاتوکسین)، مقدار سم، گونه و استرین ماهی، وضعیت سلامتی، مرحله زندگی، استرس های محیطی و حضور یا عدم حضور ترکیبات مؤثر بر سمیت آفلاتوکسین ها وابسته است. تماس با مقادیر زیاد آفلاتوکسین می تواند مرگ و میر ماهیان را افزایش داده و خسارات مالی شدیدی به صنعت پرورش ماهی وارد سازد. از طرف دیگر اثرات آفلاتوکسیکوز مزمن به صورت تأخیر در رشد، کاهش کیفیت غذا، حساسیت به عفونت ها و نئوپلازی قابل مشاهده است (Hendrichs، Lee و Bailey، ۱۹۹۱). قارچ آسپرژیلوس علاوه بر تولید سم به عنوان عامل بیماری زا در ماهیان نیز مطرح است و باعث بیماری سیستمیک در ماهی می شود (Khoo، ۲۰۰۰). سابقه مطالعه بر روی آفلاتوکسیوزیس درماهیان آب شیرین خصوصاً قزل آلای رنگین کمان به زمانی که بشر به ماهیت آفلاتوکسین ها پی برد برمی گردد (سپهداری، ۱۳۸۸). طی این مدت تحقیقات متعددی روی آبزیان پرورشی صورت گرفته است. برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ آفلاتوکسیکوزیس درآبزیان پرورشی به همراه وقوع هپاتوم درمراکز تکثیر قزل آلای رنگین کمان درایالت آیداهو واقع در آمریکا گزارش گردید. درآزمایشات بعد از مرگ، کبدی حاوی ندول های بسیار (مولتی ندولار) به همراه کارسینومای اولیه سلول های کبدی مشاهده گردید (Ashley، ۱۹۷۰). علت نهایی تلفات، مصرف کنجاله های پنبه دانه کپک زده که آلوده به آفلاتوکسین ها بوده و به شکل خام جهت تغذیه ماهیان مورد استفاده قرار گرفته بودند تشخیص داده شد. مطالعات تکمیلی انجام شده موید این مطلب بود که قزل آلای رنگین کمان از گونه های بسیار حساس از نظر ایجاد تومورهای کبدی به واسطه مصرف آفلاتوکسین B۱ می باشد. بعد از آن تلفات دسته جمعی ناشی ازمصرف آفلاتوکسین ها ازآلمان نیزگزارش گردید (Mahoney، Molyneux و Campbell، ۲۰۰۰) . حضور سم درخوراک مصرفی حیوانات توسط DeVries و همکاران درسال ۲۰۰۲، بیوسنتز و متابولیسم آن توسط Calvo و همکاران درسال ۲۰۰۲، سم شناسی و اثرات بیولوژیک آن توسط Eaton و Groopman (۱۹۹۴)، Cullen و Newberre (۱۹۹۴)، Gloumbe (۱۹۹۳) وغیره به انجام رسید. اما تاکنون جمع بندی اقتصادی در مورد اثرات آفلاتوکسین با تاکید برآبزیان به انجام نرسیده است. در مکزیک توسط Ruizperez و همکاران درسال ۱۹۸۴، در دانمارک Rasmussen و همکاران درسال ۱۹۸۶ و در شیلی Tim Phillips درسال ۱۹۹۰ یک آلودگی تجربی ایجادگردید، Cagauam و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش وقوع تلفات دسته جمعی در میان ماهیان تیلاپیای پرورشی در فیلیپین را که از طریق تغذیه با غذاهای کپک زده اتفاق افتاده بود گزارش کردند (سپهداری، ۱۳۸۸). اثرسرطان زایی آفلاتوکسین

B۱ در ماهیانـی ماننـد قزل آلای رنگین کمان، گربـه ماهی کانال، تیلاپیا، گوپـی، کپورماهی هنـدی (Chavez، Martinez،Osorio،Palacios و Mareno، ۱۹۹۴؛ Jantraroti و Lovell،۱۹۹۰؛ Lovell، ۲۰۰۱؛ Motalebi،Ardalani و Jamili، ۲۰۰۳) و *Penaus monodon* (Bautista، Pitogo، Subosa و Begino، ۱۹۹۴) مطالعه شـده است. آفلاتوکسـیکوزیس بیماری است که می تواند بسـیاری ازگونه های ماهی و پوسـته داران را مبتـلا کنـد و وقتی که غذای آلوده به آفلاتوکسـین ها توسـط ماهی خورده شـود بروز می کند (Ashley، ۱۹۷۰؛ Bautista، Pitogo Subosa و Begino، ۱۹۹۴). آفلاتوکسـیکوزیس تجربـی در ایـران از فیـل ماهی[۹] نوجوان که با جیره آلوده به سـم تغذیه شـده بودند گزارش شده اسـت (Farabi، Yosefian و Hajimoradloo، ۲۰۰۶). مطلبی و همکاران (۲۰۰۸) نیز بر روی خوراک قزل آلای رنگین کمان کار کردنـد. در این تحقیق طـی دو مرحله نمونه گیری در دو زمان متفاوت از سال، خوراک مصرفی قزل آلای پرورشی مورد آزمایش قرار گرفت. طی این مطالعه اثرات فصل و شـرایط محیطی بر میزان آلودگی بررسی شد. غلظت آفلاتوکسـین هـا در پاییـز و زمسـتان بین ۲ تـا ppb ۴ بـود. درحالی کـه در تعـدادی از نمونـه های گرفته شـده در بهـار و تابسـتان، غلظت آفلاتوکسین های B۱ ، B۲، G۱، G۲، بین ۱/۲۱ تا ppb ۶/۶۲ بود. مزارعی که بهداشـت را در نگهداری خوراک رعایت می کردند میزان سم کمتری را درغذا نشان دادند (Motalebi، Ardalani و Jamili، ۲۰۰۳).

روش کار

در این تحقیق از مواد اولیه و محصول نهایی یک کارخانه تولید خوراک و نیز از ۶ مرکز پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان نمونه گیری به عمل آمد. از ۶ مزرعه پرورش، ۳ مزرعه از غذای دسـت ساز و ۳ مزرعه از غذای کارخانه ای اسـتفاده می کردند. برای نمونه گیری از دسـتورالعمل شماره ۷۵۷۰ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران استفاده شد. در کارخانه تولید خوراک از مواد اولیه تشکیل دهنده پلت شامل گندم، آرد گندم، سویا، پودر ماهی، گلوتن و نشاسته و نیز محصول نهایی نمونه گیری به عمل آمد، و از مـزارع پرورش قزل آلا از خوراک مصرفـی نمونه گیری صورت گرفت. نمونه ها در کیسـه های پلاستیکی سربسـته به آزمایشگاه منتقل شدند و بلافاصله با اسـتفاده از روش Samson و همکاران برای جداسازی قارچ ها اقدام به رقیق سـازی نمونه ها شد (Samson، Hoekstra، Frisvad و Filtenborg، ۲۰۰۰). مقـدار ۲۰ گـرم نمونه با ۱۸۰ میلی لیتر آب مقطر اسـتریل حاوی ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بر روی شـیکر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شـد. سپس حجم های ۰/۵ ، ۰/۷۵ و ۱ میلی لیتر از آن را برداشـت شـد و به محیط های AFPA و DRCA منتقل گردید. پلیت ها به طور روزانه مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند.

در محیط کشـت AFPA[۱۰]، قارچ های آسـپرژیلوس گـروه فلاووی از جمله گونه های فلاووس و پارازیتیکوس به صورت پرگنه های پشت نارنجی مشـخص می شـوند. محیط DRCA[۱۱] نیز به دلیل دارا بـودن دیکلران، روزبنگال و کلرامفنیکل برای جدا سـازی قارچها از محیط بسـیار مناسب است. دیکلران رشد قارچ های سریع الرشد را کند می کند و مانع از پوشانده شدن سایر قارچ ها توسط آنها می شود. کلرامفنیکل هم رشد باکتری ها را مهار کرده و در نهایت جدا سازی و شناسایی کلنی های قارچی رشد کرده بر روی محیط کشت بهتر صورت میگیرد.

از کلیـه پرگنـه هـای پشـت نارنجـی نمونـه گیـری شـد و جهت خالص سـازی به پلیت هـای حاوی محیـط، SDA[۱۲] AFPA و CZ[۱۳] (چاپکس) منتقل گردید. کشـت بر روی محیط چاپکس برای مشاهده بهتر کلنی و به صورت سـه نقطه ای انجام شد (شکل ۲ قسمت e). بعد ازخالص سـازی پرگنه های پشت نارنجی، برای بررسـی مورفولوژیکی اقدام به تهیه اسـلاید کالچر (کشـت بر روی لام) شد و سپس برای نگهداری اسپور قارچ بـرای آزمایش های بعدی، اقدام به کشـت برروی محیـط SDA در لوله گردید. اسـپورها بعد از یک هفته با ایجاد سوسپانسـیون توسط آب مقطر اسـتریل و توئیـن ۸۰ جمـع آوری و در دمـای ۸۰ – درجه سـانتی گراد نگهداری شـدند. لازم به ذکر اسـت از همه پرگنه های رشد کرده بر روی پلیت گسترش مستقیم (تیزمانت) برای شناسایی فلور قارچی نمونه ها تهیه شـد و از قارچ های غیر آسـپرژیلوس که با این روش شناسایی نمی شدند نیز اسلاید کالچر تهیه گردید. شناسایی فلور قارچی با توجه به ویژگی های مورفولوژی ماکرو و میکروسکوپی ایزوله های قارچی انجام گرفت.

گسترش مستقیم از پرگنه قارچ

روش تهیه گسترش مستقیم از قارچ یکی از تکنیک های رایج در آماده سازی قارچ ها برای بررسی میکروسکوپی است. در تهیه گسترش مستقیم از پرگنه، ابتدا قطـره کوچکی از یک ترکیب تثبیت کننده، نظیر لاکتوفنل با بخش کوچکی از پرگنه قارچ درحال بررسـی در سطح یک لام تمیز قرار داده شـد. درادامه، بخشی از پرگنه قارچ با دو وسیله نوک تیز و برنده نظیر سـوزن جدا کننده یا اسکالپل بر روی لام به قطعات کوچک تقسیم گردید، به نحوی که به طور کامل به لاکتوفنل آغشـته شـود. درپایان، لاملی روی مجموعه قارچ - لاکتوفنل قرار گرفت و مجموعه با میکروسـکوپ مشـاهده شـد. درصورتی که قرار باشـد لام را به مدت طولانی نگه دارند، حد فاصل حاشیه های لامل را با برق ناخن مسدود می کنند. پیش از این مرحله، باید لاکتوفنل اضافی را از حاشیه های لامل با کاغذ خشک کن حذف کرد.

کشت بر روی لام

روش کشـت روی لام برای کمک به شناسایی قارچ های رشته ای، که به سـختی با روش تهیه تیزمانت شناسایی می شوند، انجام می شود (شکل ۱). محیط های کشت متفاوت نظیر محیط آگار غلات، آرد ذرت آگار، سیب زمینی دکستروز آگار و آگار عصاره سبزیجات برای تحریک تولید کونیدیوم بسـیار مناسـب اند و به همین دلیل در تهیه کشـت روی لام استفاده می شـوند. کشت ها به طور معمول به مدت ۲ هفته درتاریکی در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سـانتی گراد نگهداری می شوند. برای تهیه کشت روی لام ابتدا یک کاغذ فیلتر به اندازه سـطح کف یک پلیت شیشه ای ۱۰۰ میلی متری بریـده و در داخل پلیت قرار گرفت و مجموعه به وسـیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل و با فورالکتریکی خشک شـد. ابتدا محیط کشـت SDA در پلیت با یک اسکاپل استریل به قطعات مربع با ابعاد ۱ در ۱ سانتی متر برش داده شد و یک قطعه از محیط کشت با اسـکاپل روی لام موجود در پلیت شیشه ای قرار گرفت. در ادامه، بخش کوچکی از پرگنه قارچ درحال بررسـی، با یک آنس بلند برداشـت شـده و در وسـط اضلاع مربع محیط کشـت تلقیح گردید. یک لامل استریل روی

محیط کشت تلقیح شده با قارچ قرار داده شد و مقداری آب مقطر استریل به پلیت شیشه ای افزوده گردید. این آب مقطر، فیلتر کاغذی موجود در پلیت را مرطوب نگه میدارد و دراین شرایط، علاوه برتامین رطوبت کافی برای رشد قارچ، از تبخیر محیط کشت نیز جلوگیری خواهد شد. کشت ها به مدت ۲ هفته در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد، دریک مکان تاریک قرار گرفتند و در طی این مدت، به طور مرتب با یک لوپ از نظر رشد قارچ و اسپورزایی بررسی شدند. پس از اطمینان یافتن از کامل شدن رشد قارچ، لام از داخل پلیت شیشه ای خارج و سطح زیرین آن را با گاز یا پنبه خشک گردید. قطره کوچکی از یک ترکیب تثبیت کننده قارچ نظیر لاکتوفنل در وسط یک لام تمیز میکروسکوپی قرار گرفت و در ادامه با استفاده ازیک پنس، لامل موجود روی محیط کشت پس از جداسازی از سطح محیط روی لاکتوفنل قرار داده شد. حدفاصل لام و لامل با لاک مسدود گردید. لام دیگری نیز با حذف محیط کشت موجود روی لام اصلی و قرار دادن لاکتوفنل و لامل روی ناحیه رشد قارچی درسطح لام و درپایان مسدود کردن حد فاصل لام و لامل با لاک تهیه شد. لام های تهیه شده در زیر میکروسکوپ بررسی و جنس قارچ و درصورت امکان، گونه قارچ شناسایی گردید (رزاقی، قهفرخی، ۱۳۸۴).

نتایج

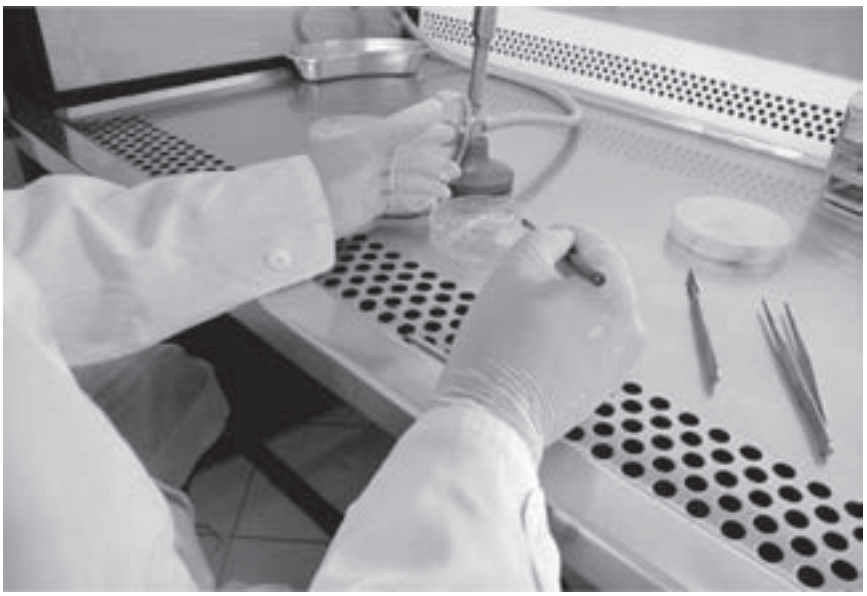
بعد از نمونه گیری و حمل به آزمایشگاه، برای غربالگری اولیه قارچ های آسپرژیلوس گروه فلاووی از محیط AFPA استفاده شد. در این محیط کشت پرگنه های قارچ های آسپرژیلوس گروه فلاووی به صورت پشت نارنجی مشاهده می شوند. سپس جداسازی، خالصسازی و شناسایی نهایی آنها با استفاده از ویژگی های مورفولوژیک انجام گرفت (شکل ۲). سایر گونه های قارچی جداسازی شده از غذا نیز با استفاده از کلیدهای مورفولوژیک شناسایی گردیدند.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می شود در مجموع ۱۳۳ گونه قارچ از ۱۱ جنس با فراوانی های مختلف از مواد اولیه، محصول نهایی در کارخانه و نیز مراکز پرورش جدا شد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به محصول نهایی کارخانه (۱۸/۰۴ درصد) و سپس به ترتیب آردگندم (۱۷/۲۹ درصد) و گلوتن (۱۵/۷۸ درصد) بود. اعضای جنس آسپرژیلوس از همه محل های نمونه گیری غیر از ایستگاه ۱ گزارش شدند. جنس آسپرژیلوس با ۵۴/۸۸ درصد بالاترین فراوانی را دارا بود و بعد از آن به ترتیب جنس های سودالشریا[15] (۱۲/۰۳ درصد)، پنیسیلیوم[16] (۱۰/۵۲ درصد) و آبسیدیا[17] (۹/۷۷ درصد) قرار داشتند

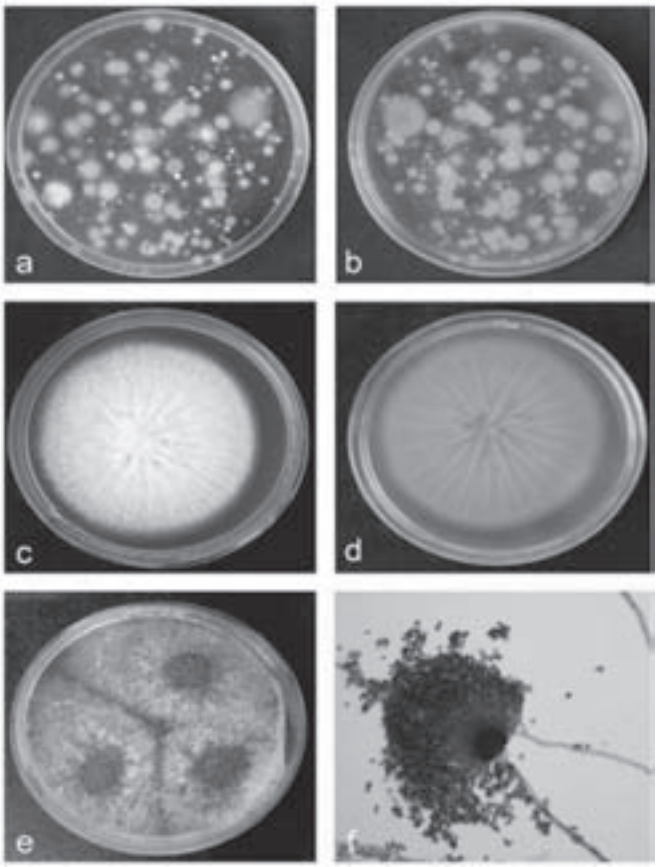
از محصول نهایی کارخانه خوراک دام و مواد اولیه آن در مجموع ۱۰۹ گونه قارچ از ۱۱ جنس با فراوانی های مختلف جدا شد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به پلت (۲۲/۰۱ درصد) و سپس به ترتیب آرد گندم (۲۱/۱ درصد) و گلوتن (۱۹/۶۲ درصد) بود. اعضای جنس آسپرژیلوس از همه نمونه های غذایی گزارش شدند، درحالی که جنس های سودالشریا و الوکلادیوم[18] فقط از پلت جدا شدند. ۸ جنس دیگر بطور تصادفی در نمونه های تهیه شده ازخوراک پراکنده بودند. جنس آسپرژیلوس با ۵۵/۹۶ درصد بالاترین فراوانی را دارا بود و بعد از آن به ترتیب جنس های پنی سیلیوم (۱۲/۸۴ درصد)، آبسیدیا (۱۱/۰۱ درصد) و سودالشریا (۱۰/۱۰ درصد) قرار داشتند.

در نمونه های به دست آمده از خوراک قزل آلا در ۶ مزرعه پرورش در مجموع ۲۴ گونه قارچ از ۶ جنس جدا شد. که *A. flavus* با حضور در ۵ مزرعه پرورش از ۶ مزرعه بالاترین میزان آلودگی را تشکیل میداد (جدول ۱).

در بین قارچ های جدا شده جنس های آسپرژیلوس، پنیسیلیوم و



شکل ۱- روش کشت روی لام



شکل ۲- ویژگی های تشخیصی ایزوله های *A. flavus* جداسازی شده از غذای قزل آلا:
(a, b): منظره سطح (a) و پشت (b) پرگنه برروی محیط کشت AFPA در کشت اولیه نمونه آرد گندم آلوده
(c, d): منظره سطح (c) و پشت(d) پرگنه خالص سازی شده قارچ برروی محیط کشت AFPA
(e, f): منظره پرگنه *A. flavus* برروی محیط CZ (e) و منظرهمیکروسکوپی قارچ در روش کشت برروی لام، بزرگنمایی (fx) ۴۰۰

آلترناریا به جهت توانایی تولید آفلاتوکسین و سایر مایکوتوکسین های خطرناک نظیر سیکلوپیازونیک اسید، کوجیک اسید و غیره از اهمیت بالایی برخوردار هستند. جدول ۱ فراوانی و توزیع گونه های آسپرژیلوس را در غذای قزل آلا نشان می دهد. براساس نتایج به دست آمده، ۷۳ استرین از جنس آسپرژیلوس جدا شد که شامل گونه های *A. flavus* (۶۷/۱۲ درصد)، *A. niger* (۱۶/۴۳ درصد)، *A. fumigatus* (۲/۷۳ درصد)، *A. clavatus* و *A. ochraceus* (۳۶ /۱ درصد) بودند. ۸ مورد نیز درحد جنس (.Aspergillus spp) گزارش شد. در مجموع در تمام نمونه های اخذ شده، *A. flavus* با ۳۶/۸۴ درصد بالاترین میزان آلودگی را تشکیل می داد (جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

براساس نتایج ارائه شده بوسیله سازمان غذا و داروی ایالات متحده، هرساله حدود ۲۵ درصد ازمحصولات غذایی در سراسر جهان با سموم قارچی آلوده می شوند. بی تردید مصرف اغذیه آلوده به آفلاتوکسین یک مشکل معمول در آبزی پروری است که موجب بروز مشکلات اقتصادی و بهداشتی در تولیدات آن می شود. این مساله درکشورهای توسعه یافته بیشتر است (Fegan، ۲۰۰۵؛ Spring و Fegan، ۲۰۰۵). در بین مایکوتوکسین ها، انواع تولید شده به وسیله جنس آسپرژیلوس و بویژه آفلاتوکسین ها بواسطه خسارات هنگفت اقتصادی به صنعت کشاورزی و آلوده شدن غذای انسان و دام از اهمیت بسزایی برخوردار هستند. سالیانه مقادیر قابل توجهی از محصولات کشاورزی به ارزش میلیاردها دلار دستخوش حمله قارچ های مولد آفلاتوکسن شده و از بین می روند. محصولات حاوی آفلاتوکسین کیفیت مرغوبی نداشته و به قیمت ارزان تری ارایه می شوند. زیان های اقتصادی ناشی از آلوده شدن مواد غذایی و خوراک دام، طیور و آبزیان به آفلاتوکسین ها شامل خسارات اقتصادی وارده به صنعت دامپروری و ایجاد تلفات در انواع دام ها، شیوع بیماری های دامی، تضعیف سیستم ایمنی در دام ها، کاهش رشد و تولید، افزایش ضریب تبدیل مواد غذایی و افزایش هزینه های برنامه ریزی جهت کاهش خطرات می باشد (رزاقی ابیانه، پیله ور سلطان احمدی، شمس قهفرخی، علی نژاد، ۱۳۹۰).

با توجه به اینکه در بین ماهیان پرورشی، قزل آلای رنگین کمان به عنوان حساس ترین گونه به آفلاتوکسین B۱ مطرح می باشد، به همین دلیل در انتخاب مواد اولیه در تولید غذای مصرفی برای این ماهی باید دقت زیادی صورت گیرد.

در این تحقیق پلت مصرفی قزل آلای رنگین کمان و اجزای سازنده آن از نظر فلور قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. در قسمتی از کار از اجزای سازنده و محصول نهایی یک کارخانه تهیه خوراک دام نمونه گیری به عمل آمد. آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و آبسیدیا جنس های اصلی قارچی جدا شده بودند. نکته جالب اینکه جنس سودالشریا که چهارمین جنس اصلی جدا شده بود، فقط از غذای پلت در کارخانه جدا شد. با توجه به اینکه نمونه گیری از پلت بلافاصله بعد از تولید صورت گرفت حضور این قارچ های بیماری زا در پلت می تواند به دلیل آلوده بودن اجزای سازنده آن باشد، البته این قارچ در اجزای سازنده حضور نداشته و فقط از پلت جدا شد که نشان دهنده آلودگی مسیر خط تولید به آن می باشد. جدای از سودآلشریا بیش از نیمی از قارچ های جدا شده از خوراک قزل آلا متعلق به جنس آسپرژیلوس بود که از این میزان نزدیک به ۶۰ درصد آن را *A. flavus* تشکیل می داد. نتایج به دست آمده از مطالعات مشابه در سایر کشورها با نتیجه این تحقیق همخوانی دارد (Acunaو Diaz، Lozano، ۲۰۰۹؛ Keller و همکاران، ۲۰۰۷). در مرحله بعدی از ۶ کارگاه پرورش نمونه گیری به عمل آمد که سه تا از این کارگاه ها از غذای دست ساز و سه تای دیگر از غذای کارخانه ای استفاده می کردند. اگر چه میزان آلودگی در خوراک دست ساز بیشتر از کارخانه ای بود ولی اختلاف زیادی بین این دو به چشم نمی خورد. ضمن اینکه آلودگی کلی در این شش کارگاه پرورش کمتر از اجزای سازنده و پلت در کارخانه تهیه خوراک دام بود (جدول ۱). در همه این شش گروه شرایط انبار نگهداری (شکل ۳) و نیز مرحله خشک کردن پلت های دست ساز مناسب نبوده است.

جدول ۱- قارچ های جدا شده از کارخانه تهیه خوراک و کارگاه های پرورش ماهی قزل آلا

قارچ	خوراک دستساز			خوراک تجاری			اوره (mmol/l)	کارخانه اجزای سازنده						
	ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	جمع*	پلت	سویا	گندم	آرد گندم	پودر ماهی	نشاسته	گلوتن	جمع*
A. flavus	۲	۲	۳	-	۳	۲		۵	۱۱	۷	۶	۴	۲	۳۷(۳۳/۹۴)
A. niger	-	-	-	-	-	-	۱۲(۵۰)	۲	-	-	۴	۱	-	۲	۱۲(۱۱/۰۱)
A. clavatus	-	-	-	-	-	-	-	۵	-	-	-	-	-	۱	۱(۰/۹۲)
A. fumigatus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱	-	۱	۲(۱/۸۳)
A. ochraceus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱	۱(۰/۹۲)
آسپرژیلوس .spp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۲	-	۴	۸(۷/۳۳)
جمع آسپرژیلوس ها	۲	۲	۳	-	۳	۲	-	۲	۵	۱۱	۱۱	۱۰	۴	۱۱	۶۱(۵۵/۹۶)
	-	-	۱	-	-	-	۱۲(۵۰)	۹	-	-	-	-	-	-	۱
الوکلادیوم	۲	۱	۱	-	-	۱	۱(۴/۱۶)	۱	-	-	-	-	-	-	۱۱
سودالشریا	-	۱	۱	-	-	۱	۵(۲۰/۸۳)	۱۱	۲	-	-	-	-	-	۲(۱/۸۳)
اسکوپولاریوپسیس	-	-	-	۲	-	-	۳(۱۲/۵)	-	-	-	۱	-	-	-	۲(۱/۸۳)
آلترناریا	-	۱	-	-	-	-	۲(۸/۳۳)	۱	۲	-	۵	-	۱	۴	۱۲(۱۱/۰۱)
آبسیدیا	-	-	-	-	-	-	۱(۴/۱۶)	-	-	-	۱	-	۱	-	۲(۱/۸۳)
موکور	-	-	-	-	-	-	-	-	۳	-	۵	-	-	۴	۱۴(۱۲/۸۴)
پنیسیلیوم	-	-	-	-	-	-	-	۲	۱	-	-	-	-	۱	۲(۱/۸۳)
پسیلومایسس	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱	۱(۰/۹۲)
کلادوسپوریوم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱	-	۱(۰/۹۲)
ریزوپوس	۴	۵	۶	۲	۳	۴	-	-	۱۳	۱۱	۲۳	۱۰	۷	۲۱	۱۰۹(۱۰۰)
جمع	۴	۵	۶	۲	۳	۴	۲۴(۱۰۰)	۲۴							

* اعدادداخل پرانتز فراوانی جنس قارچ جدا شده از نمونه های غذا را به درصد نشان می دهند.

با توجه به پراکندگی وسیع اسپورهای قارچ ها در محیط، احتمال آلودگی به میزان زیادی افزایش می یابد. ضمن اینکه در پلت های دست ساز به دلیل انجام عملیات در شرایط غیر کارخانه ای و اکثراً نامناسب و نیز عدم نظارت دقیق بر کیفیت مواد اولیه احتمال آلودگی بیشتر می شود(شکل ۶). درصد قارچ های مولد آفلاتوکسین در بین *A. flavus* جدا شده ازخوراک دام بستگی به چندین فاکتور شامل نوع غذا، شرایط محیطی، شرایط کشت، روش جداسازی و غیره دارد. به عنوان یک واقعیت، حضور قارچ های مولد آفلاتوکسین روی غذای انسان یا دام نمی تواند به معنای وجود آفلاتوکسین ها در آنها باشد. زیرا شرایط برای رشد قارچ های مولد سم و تولید آفلاتوکسین متفاوت است. *A. flavus* در جهان گسترده است و درحالت طبیعی به عنوان یک قارچ ساپروفیت در خاک و انواع ترکیبات آلی در حال فساد یافت می شود. *A. flavus* مهم ترین عامل مولد آفلاتوکسین به حساب می آید، سوش های مختلف *A. flavus* ممکن است هم آفلاتوکسین B۱ و هم B۲ را تولید کنند (Hedayati و همکاران ۲۰۰۷) در حالی که *A. parasiticus* علاوه بر آن دو سم دیگر یعنی G۱ و G۲ را هم تولید می کنند (Bennett و Klich، ۲۰۰۳، Yu و همکاران، ۲۰۰۴). توانایی تولید آفلاتوکسین توسط سوش های جدا شده از غذا در یک دامنه وسیع از ۱/۶۰درصد برای سوش های جدا شده از خوراک طیور (Tanvinova، Labuda ، ۲۰۰۶) تا ۷۶ درصد برای موارد جدا شده از خوراک دام در هند (Das، Dutta، ۲۰۰۰) گزارش شده است. Cutuli و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند که ۷۵ درصد سوش های *A. flavus* جدا شده از غذای قزل آلای رنگین کمان روی محیط طبیعی، مولد آفلاتوکسین بودند(رحیمی، کریم، ۱۳۸۷). در کل قارچ های جدا شده از مواد اولیه و محصول نهایی نشان از آلودگی بالا می باشد که می تواند باعث تولید سموم قارچی شود. البته تمامی سویه های *A. flavus* و *A. parasiticus* قادر به تولید آفلاتوکسین نیستند. سویه هایی که توانایی تولید آفلاتوکسین را دارند سویه های سمی و آنهایی که مولد آفلاتوکسین نیستند سویه های غیر سمی نامیده می شوند. ضمن اینکه سویه های مولد سم نیز در همه محیط ها توانایی تولید سم را ندارند (علامه، رزاقی ابیانه، ۱۳۸۰؛ Cutuli و همکاران، ۱۹۹۱).

بنابراین حضور این قارچ ها بطور قطع نمی تواند نشان دهنده حضور سم در غذا باشد اما پتانسیل تولید سم وجود دارد و در صورت ایجاد شرایط مساعد مانند بالا بودن میزان رطوبت غذا و یا شرایط بد نگهداری احتمال تولید سم در پلت افزایش می یابد. از طرفی میزان سم تولید شده ممکن است به حدی نباشد که ایجاد مسمومیت و تلفات کند و ماهی های آلوده صید و به بازار عرضه می شوند که این می تواند باعث تجمع تدریجی سم در مصرف کنندگان و به خطر افتادن بهداشت عمومی شود.بسیاری از عوامل مثل نوع سوبسترا، pH، رطوبت و دما روی حضور آفلاتوکسین ها در خوراک طی مدت زمان نگهداری تاثیرگذار هستند. درواقع رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین اغلب در خوراک دام و اجزای سازنده خوراک دام که در شرایط نامناسب نگهداری می شوند و یا در خوراک هایی که با مواد اولیه نامرغوب در فصول مختلف تهیه شده اند رخ می دهد (Charoen Pornsook و Kavisarasai، ۲۰۰۶).

دربعضی موارد،قارچ های مولدآفلاتوکسین درطی مراحل تهیه خوراک ازبین می روند اما آفلاتوکسین ها به دلیل مقاومت بسیار بالا نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی بویژه حرارت در محصول نهایی باقی می مانند و انسان بطور غیر مستقیم با مصرف گوشت ماهی در معرض سم قرار می گیرد. به دلیل گسترش جهانی *A. flavus* و سایر قارچ های مولد آفلاتوکسین در خاک، هوا و مکان های دیگر، جلوگیری از وقوع آلودگی طبیعی به آفلاتوکسین در خوراک دام نیاز به یک همکاری و توجه جهانی دارد که از موارد مهم آن می توان از شرایط مناسب نگهداری در انبارها و نیز استفاده از مواد اولیه با کیفیت بالا در تولید خوراک های مخلوط نام برد.

شکل ۳- انبار نگهداری مواد غذایی کنسانتره تجاری

شکل های ۴ و ۵- شرایط نامناسب خشک کردن پلت

شکل۶- استفاده از مواد اولیه نامناسب در تهیه خوراک ماهی

پیشنهادات

۱- تهیه پلت از مواد اولیه مناسب
۲- انجام آزمایشات کنترلی برای تعیین کیفیت مواد اولیه
۳- نظارت دقیق بر مراحل تولید پلت، خصوصاً در مرحله رطوبت گیری
۴- بسته بندی مناسب توسط کارخانه تا میزان رطوبت پلت بیش از حد مجاز نشود
۵- حفظ شرایط بهینه طی مدت زمان نگهداری کیسه ای حاوی پلت در انبار
۶- عدم نگهداری کیسه های پلت در مدت طولانی

پاورقی ها

1- Sterigmatocystin
2- Cyclopiazonic acid
3- Aflatrem
4- Gliotoxin
5- Aspergillic acid
6- Dihydroxyaflavinine
7- Paspalinine
8-Versicolorin A
9- *Huso huso*
10- *Aspergillus flavus* and parasiticus agar (AFPA)
11- Dichloran rosebengal chloramphenicol agar (DRCA)
12- Sabouraud dextrose agar
13- Czapek dox agar
14- Tease mount
15- Pseudallescheria
16- Penicillium
17- Absidia
18- Ulocladium
19- Alternaria

منابع مورد استفاده

۱- رحیمی، ا، کریم، گ. (۱۳۸۷) تعیین میزان آلودگی آفلاتوکسین M۱ در شیرهای تولیدی مزارع پرورش گاو شیری استان چهارمحال و بختیاری به روش الایزا، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۵۱ تا ۵۸.

۲- رزاقی ابیانه، م، پیله ورسلطان احمدی، ی، شمس قهفرخی، م، علی نژاد، س. (۱۳۹۰)، آفلاتوکسین ها و اهمیت آن در بهداشت عمومی. موسسه اموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، صفحات ۴ و ۵۹ تا ۶۱

۳- رزاقی ابیانه، م.، شمس قهفرخی، م. (۱۳۸۴) قارچ شناسی عمومی دامپزشکی، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، صفحات ۱۱۶ تا ۱۱۷ ، ۱۲۱ تا ۱۲۲.

۴- سپهداری، ا. (۱۳۸۸) بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی ازمصرف خوراک مقادیر مختلف آفلاتوکسین B۱ درفیل ماهی پرورشی (*Huso huso*). پایان نامه برای دریافت درجه دکترای تخصصی در رشته بهداشت و بیماری های آبزیان از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ثبت ۳۴۶، صفحات ۸ تا ۹، ۱۴ تا ۱۵.

۵- شمس قهفرخی، م، علی نژاد، س، رزاقی ابیانه، م. (۱۳۸۴) قارچ شناسی و بیماری های قارچی آبزیان. موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، صفحات ۲ تا ۳.

۶- علامه، ع.، رزاقی ابیانه، م. (۱۳۸۰) مایکوتوکسین ها، انتشارات دانشگاه امام حسین (ع).

7- Ashley, L.M. (1970) *Pathology of fish fed aflatoxins and other antimetabolites.* A Symposium on Diseases of Fish and Shellfishes, 1970, Washington, American Fisheries Society, 366-379.

8- Asis, R.D., Paola, D.R. and Aldao, A.M. (2002) Determination of aflatoxin B1 in highly contaminated peanut samples using HPLC and ELISA. *Journal of Food, Agriculture and Immunology* 14, 201-208.

9- Bautista, M.N., Pitogo, L., Subosa, C.R. and Begino, E.T. (1994) *Response of Penaeus monodon juveniles to aflatoxin B1 dietary contamination.* 1st, Edn. The 3rd Asian Fish Forum Soc., Manila, 771-.

10- Bennett, J.W. and Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497–516.

11- Berry, C.L. (1998) The Pathology of mycotoxins. *Journal of Pathology* 154, 301-311.

12- Charoen Pornsook, K. and Kavisarasai, P. (2006) Mycotoxins in animal feedstuffs of Thailand. *KMITL Science and Technology Journal* 6:25-28.

13- Chavez, S., Martines, P., Osorio, M., Palacios, C.A.M. and Mareno, I.O. (1994) Pathological effects of feeding young *Orechromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin. *Aquaculture* 127, 49-61.

14- Chelkowski, J. (1991) *Mycological quality of mixed feeds and ingredients.* In J. Chelkowski (ed.), Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage, pp. 217-227.

15- Coulombe, RA (1993) Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 76, 880- 891.

16- Cutuli, M.T., Cuellar, A., Camara, J.M., Mateos, A. and Suarez, G. (1991) Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains isolated from trout feed. *Mycopathologia* 113, 121–125.

17- Davis, N.D. and Diener, U.L. (1970) *Enviromental factors affecting the production of aflatoxin.* Proceedings of the 1st US-Japan Conference on Toxic Microorganisms, 1970, US Govt. Printing office,Washington, D.C., pp. 43-47.

18- Diaz, G.J., Lozano, M.C. and Acuña, A. (2009) Prevalence of Aspergillus species on selected Colombian animal feedstuffs and ability of Aspergillus section flavi to produce aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* 2, 31-34.

19- Dutta, T.K. and Das, P. (2000) Isolation of aflatoxigenic strains of Aspergillus and detection of aflatoxine B1 from feeds in India. *Mycopathologia* 151, 29-33.

20- Farabi, S.M.V., Yosefian, M. and Hajimoradloo, A. (2006) Aflatoxicosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. *Journal of Applied Ichthyology* 22, 234-237.

21- Fegan, D. (2005) *Mycotoxins*: the hidden menace. http://www.alltech.com.

22- Franceschi, S., Bidoli, E., Baron, A.E. and LA Vacchia, C. (1995) Maize and risk of cancer of the oral cavity, Pharynx and esophagus in northeastern Italy. *Nati. Cancer Institute* 82, 1407–1411.

23- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, M.J., Eyles, M.J. and Robert, T.A. (1994) Predicting fungal growth: The effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.

24- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A. and Bowyer, P. (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Journal of Microbiology* 153, 1677-1692.

25- Jantraroti, W. and Lovell, R.T. (1990) Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 2, 248-254.

26- Keller, K.M., Queiroz, B.D., Keller, L.A.M., Ribeiro, J.M.M., Cavaglieri, L.R., Gonzalez Pereyra, M.L., Dalcero, A.M. and Rosa, C.A.R. (2007) The mycobiota and toxicity of equine feeds. *Veterinary Research Communications* 31, 1037-1045.

27- Khoo, L. (2000) *Fungal diseases in fish*. Seminars in Avian and Exotic pet medicine. 9, 102-111.

28- Labuda, L. and Tanvinova, D. (2006) Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogeniety. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 193-200.

29- Lee, B.C., Hendrichs, J.D. and Bailey, G.S. (1991) *Toxicity of mycotoxins to fish* In: Mycotoxins and Animal Foods (J.E. Smith, R.S. Henderson, eds.), CRC Press, New York, pp. 607-626.

30- Lovell, R.T. (2001) *Nutrition and feeding of fish*, 2nd Edn., Haworth Press, New York, pp: 24-28.

31- Mahoney, N., Molyneux, R. J. and Campbell, B.C. (2000) Regulation of aflatoxin production by naphtoquinones of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4418-4421.

32- Motalebi, A.A., Ardalani, K. and Jamili, S. (2003) Effect of temperature on the produced aflatoxins in the rainbow trout feed in West Azerbaijan province. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3, 392-397.

33- Payne, G.A., Thompson, D.L., Lillehoj, E.B., Zuber, M.S. and Adkins, C.R. (1988) Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 78, 1376-1380.