مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (7) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

عزل وتشخيص بعض الفطريات الملوثة والكشف عن الأفلاتوكسين في الطحين والخبز والصمون المنتج في مدينة دهوك

إيمان علاء الدين المزوري ، صالح عيسى محمد
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

إستهدفت هذه الدراسة عزل وتشخيص بعض الفطريات الملوثة والكشف عن الأفلاتوكسين في الطحين والخبز والصمون المنتج منه في مدينة دهوك في كردستان العراق, شملت الدراسة عينات الطحين المحلي والمستورد, الأبيض والأسمر, وكذلك الخبز والصمون المنتج منه, حيث تبين وجود أنواع مختلفة من الفطريات, وكان الفطر *A.flavus* اكثر الفطريات أنتشاراً بنسبة عزل 58.82 %, حيث عزل من الطحين الأسمر المحلي والطحين الأسمر الإيراني, ثم يليه الفطر *Penicillium* sp. بنسبة عزل 35.29 %, حيث عزل من الطحين الأبيض المحلي والطحين الأسمر الأيراني, ثم الفطر *A.niger* بنسبة عزل 5.88 %, الذي عزل من الطحين الأسمر الأيراني, وهذا وكانت جميع عينات الخبز والصمون المنتجة خالية من أي تلوث بالفطريات. تبين من اختبار تأثير درجات الحرارة والأوساط الزرعية , وكذلك من الصفات الزرعية للمستعمرات والصورة المجهرية للفطر , بأن الفطر المعزول من عينات الطحين الملوثة هو الفطر *A.flavus* , وكذلك تبين إن هناك عزلتين فارزتين للأفلاتوكسين من العينتين (9,7) وهي الطحين الأسمر المحلي بتركيز 2 ملغم/ كغم والطحين الأسمر الأيراني 1 ملغم/كغم على التوالي, ولكن لم تتجاوز النسب المسموح بها من قبل منظمة الصحة العالمية.

المقدمة

تؤلف الحبوب ومشتقاتها الجزء الاكبر من الغذاء اليومي للانسان والحيوان، وإن الناتج النهائي في عملية تصنيع الحبوب إضافة الى الطحين، هناك منتجات أخرى تأتي من الطبقات السطحية لهذه الحبوب، تتميز باحتوائها العالي من العناصر الصغرى والنخالة، اذ تستخدم أعلافا للحيوان، وتمثل مصدراً للمركبات لها صفات فيزوكيمياوية وتغذوية ووظيفية، وتمتلك قيمة عالية لتغذية الانسان (1), وإن الحبوب، خاصة الحنطة، تعد المادة الخام المهمة لتغذية الانسان والحيوانات المنزلية، وإن العمليات الزراعية الملائمة لأنتاج هذه المحصول من زراعة وحصاد وتجفيف وتسويق وتخزين تحت الظروف الطبيعية تعرض هذه الحبوب للاصابة المايكروبية (2), وإن الفطريات لها القدرة على تلوث جميع أنواع الاغذية كالحبوب النجيلية و اللحوم و الحليب و الفواكة و الخضروات و المكسرات و الدهون وكافة منتجات ومشتقات هذه الاغذية، وإن نمو الفطريات على مختلف الاغذية يتسبب في تلف هذه الاغذية، من خلال تغير طعمها ولونها، تعفنها وإفرازها للسموم عليها، اذ إن أهم جانب في تلف الاغذية بسبب الفطريات هو إفرازها للسموم الفطرية، قد اكتشف إلى حد الآن اكثر من 400 سم فطري، وأخطرها هو سم الأفلاتوكسين (Aflatoxin) فضلا عن سموم آخرى مثل Ochratoxin A ، Trichothecin ، Zearalenone ، Fumonisin (3), وفي كينيا، تم عزل عدة أنواع فطرية من طحين الذرة، ومن هذه الفطريات *A.flavus* ، *A.sulphureus*، *F.moniliforme*، *P.stoloniferum*، *P.cyclopium*، وكانت عينات طحين الذرة هذه ملوثة بالأفلاتوكسين B_1 و B_2 (0.4-20 *Mg*/kg) ، Ochratoxin A (50-1500 *Mg*/kg) و Zeralenone (2500-5000 *Mg*/kg)، وكان Ochratoxin A اكثر السموم شيوعاً، إذ يشكل خطورة على صحة المستهلك (4), وكذلك تم عزل الفطر *A.flavus* من 32 عينة من أصل 83 عينة من حبوب الحنطة والشعير، وإن 27 عينة منها كانت ملوثة بالأفلاتوكسين B1 بمعدل (ppb 5-20) (5), وفي مازندران في ايران، وجد (63.7%) من عينات الحنطة كانت ملوثة بالفطر *A.flavus* ، و(2.54%) منها كانت ملوثة بالأفلاتوكسين B1 (6), وفي المملكة العربية السعودية قام (7) بعزل وتشخيص (12) نوعاً من الفطريات تعود إلى (6) اجناس وذلك من حبوب الحنطة من ثلاث مناطق في المملكة، وكانت نسبة العزل لهذه الاجناس الفطرية هي *Aspergillus* (14.3%)، *Fusarium* (29.1%)، *Penicillium* (9.3%) و *Alternaria* (8.2%), وتم اختبار (18) عزلة من الفطر *A.flavus* من حيث قابليتها على افراز الأفلاتوكسين بطريقة HPLC ، اذ تبين ان (13) عزلة فارزة للأفلاتوكسين كانت بمعدل 0.5-2.6 مايكروغرام/كغم.

إن طحين الحنطة هو مسحوق ناتج من عملية الطحن , يستخدم للأستهلاك البشري وإن جميع ماينتج منه قد يصاب بالاعفان في جميع مراحل سلسلة الأنتاج (8)، ويعد طحين الحنطة هو أحد المكونات المستخدمة في أغذية عدة , ومن أهم الاغذية في العالم، إن الخبز والكيك والمعجنات الأخرى تصنع من الطحين أو يكون الطحين احد مكوناتها، ومن جهة أخرى فإن الطحين هو المنتج النهائي الانظف لعملية الطحن ويعد منتجاً سليماً من الناحية الميكروبية أو انه منتج غذائي قليل الحمولة الميكروبية، لكن الملوثات الميكروبية التي تلوث هذا الطحين قد تعيش فيه لفترة طويلة (9),(10), إن انواع الفطريات الملوثة للحنطة هي الفطريات نفسها التي ستلوث الطحين والاغذية المشتقة منها (11)، حيث تم عزل الفطر *A.flavus* وفصل الأفلاتوكسين B1 بمعدل 16.3 نانوغرام/غرام من طحين الحنطة

(12), وفي دراسة قام (13) حول تلوث طحين الحنطة بسبورات الفطر *A.flavus* وجد بأن هذا الطحين كان ملوثاً بمعدل 10^2 سبور/غرام بعد 16 ساعة من التحضين, قام (14) بعزل اجناس فطرية عدة من عينات طحين حنطة من اسواق مختلفة بجدة في المملكة العربية السعودية، وكانت الاجناس المعزولة هي *Aspergillus* (70%)، *Penicillium* (30%)، *Eurotium* (14%)، *Fusarium* (20%)، *Alternaria* (18%), ومن بين (29) عزلة للفطر *A.flavus* تم اختبارها من حيث قابليتها على افراز الأفلاتوكسين، فأن (4) عزلات فقط كانت فارزة للأفلاتوكسين B_1، عزلتان كانت فارزة للأفلاتوكسين B_1 ، B_2، عزلة واحدة كانت فارزة للأفلاتوكسينات B_1 ، G_1 ، G_2.

نظراً لقلة الدراسات المحلية حول هذا الموضوع، ولأهمية الطحين بوصفه منتجاً غذائياً عالمياً فضلا عن منتجاته من الخبز والصمون والمنتجات الآخرى, وللاقبال المتزايد في السنين الأخيرة على استهلاك الخبز والصمون الأسمر خصوصا لمرض السكر وللتنحيف واحتمالية تلوث هذا الطحين بالسموم الفطرية, فلقد تم اقتراح هذه الدراسة التي تهدف الى **عزل وتشخيص الفطريات الملوثة والكشف عن الأفلاتوكسين في الطحين المحلي والمستورد والمتداول محلياً، ومنتجاته من الخبز والصمون.**

المواد وطرق العمل

1- العينات

العينات المشمولة بالدراسة هي عينات طحين ومنتجاته من الخبز والصمون، محلية ومستوردة وهي متداولة وشائعة الاستهلاك محلياً في مدينة دهوك في إقليم كوردستان بالعراق، كما مبين في الجدول (1).

الجدول 1 : عينات الطحين ومنتجاته من الخبز والصمون المشمولة بالدراسة

ت	نوع العينة ومصدرها	موقع العينة	المواصفات	المكونات	الكمية
1	طحين أبيض محلي	مخبز شيلان/ شيلي	منتج نهائي منخول	طحين حنطة	100غم
2	خبز طحين أبيض محلي	مخبز شيلان/ شيلي			قطعة واحدة
3	طحين أبيض تركي	افران كاليني/ شيلي	منتج نهائي منخول	طحين حنطة	100غم
4	صمون طحين أبيض تركي	افران كاليني/ شيلي			قطعة واحدة
5	طحين أبيض محلي	مخبز سايدو/ كوجر	منتج نهائي منخول	طحين حنطة	100غم
6	خبز(رقائق) طحين أبيض محلي	مخبز سايدو/ كوجر			قطعة واحدة
7	طحين أسمر محلي	مخبز آزادي/ كري باصي	منتج أولي غير منخول	طحين(حنطة+شعير)	100غم
8	خبز طحين أسمر محلي	مخبز آزادي/ كري باصي			قطعة واحدة
9	طحين أسمر إيراني	مخبز سايدو2 / حي الشرطة السفلى	منتج أولي غير منخول	طحين(حنطة+شعير+شوفان)	100غم
10	خبز(رقائق) طحين أسمر إيراني	مخبز سايدو2 / حي الشرطة السفلى			قطعة واحدة

2- جمع العينات

تم جمع (10) عينات من الطحين والخبز والصمون المنتج عنه بأكياس بلاستيكية معقمة, وذلك من المخابز والأفران في مدينة دهوك، وهي الشائعة والمتداولة الاستهلاك من قبل أهالي مدينة دهوك ولمدة شهرين (2015/4/22) لغاية (2015/6/21) .

3- تحضير الأوساط الزرعية

تم تحضير الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar (P.D.A) وهو وسط اجار البطاطا والدكستروز، وهو الوسط الأكثر شيوعاً واستخداماً في تنمية الفطريات الملوثة للأغذية، وذلك بوزن 200 غم من شرائح البطاطا المقشرة، ووضعها في بيكر زجاجي سعة 500 سم^3 من الماء، ثم التسخين على مصدر حراري لحين الغليان ومن ثم ترشيحه من خلال قماش شاش ثلاثي الطبقات، ومن ثم اكمل الحجم الى 1000 سم^3 من الماء مع اضافة 15غم من الاكار و20غم من الديكستروز، ونعقم بجهاز المعقام (Autoclave) تحت ظروف التعقيم اللازمة تحت ضغط 1.2 كغم/سم^2 ودرجة حرارة 121 م$^\circ$ ، لمدة 15 دقيقة (15).

4- عزل الفطريات الملوثة لهذه العينات

تم وزن 1 غم من كل عينة طحين، وكذلك 1 غم من كل عينة صمون وخبز، بعد تقطيعها الى شرائح رقيقة، ثم وضع هذه العينات في قنان زجاجية معقمة، سعة كل قنينة 25 سم^3 حاوية على 9 سم^3 ماء مقطر ومعقم، ثم مزجت جيداً ليصبح التخفيف 10/1، ثم عمل التخافيف 100/1 و 1000/1، ثم أخذ 1 سم^3 من التخفيف الاخير بواسطة محقنة Syringe معقمة، ووضعها في قاع طبق بتري معقم قطره 9 سم، ثم اضيف له الوسط الزرعي PDA ، تم تحضير ثلاثة مكررات لكل عينة، وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 27 م$^\circ$±1 م$^\circ$ ولمدة اسبوع، لحين ظهور المستعمرات الفطرية بشكل واضح على سطح الوسط الزرعي (16).

5- تشخيص الفطريات المعزولة

تم تشخيص الفطريات المعزولة من هذه العينات على وسط اجار البطاطا والدكستروز وذلك حسب صفاتها المزرعية (شكل ولون وقوام المستعمرة وافرازها للصبغات)، وكذلك صفاتها المجهرية (طبيعة الهايفات والكونيدات وكيفية اتصالهما) واعتمدت المفاتيح التصنيفية لاغراض التشخيص (18, 17, 15).

6- تشخيص عزلات الفطر *Aspergillus flavus* المحلية

تم تشخيص عزلات الفطر *A.flavus* المحلية وحسب مصادرها ومواقعها والنامية على وسط PDA الصلب والمحضنة على درجة حرارة 27م°±1 م° لمدة اسبوع بتنميتها على الاوساط الزرعية الآتية والخاصة بتشخيص انواع الفطر *Aspergillus*

1- وسط زابك ومستخلص الخميرة Czapek Yeast Extrect Agar (CYA)

2- وسط مستخلص الشعير Malt Extract Agar (MEA).

3- وسط نترات الكليسيرين Glycerol Nitrate (G25N) 25%.

بعد ضبط درجة الحموضة pH على درجة 6.5 , عقمت هذه الأوساط في جهاز المعقام, وصبت في اطباق بتري معقمة بقطر 9 سم وبمعدل ثلاثة مكررات لكل وسط زرعي، لقحت الاطباق بقرص قطره 0.5 سم من مستعمرة الفطر *A.flavus* المحلية بواسطة ثاقب فلين Cork porerبعد تعقيمه بالكحول 70% ثم التلهيب والتبريد بأستخدام إبرة التلقيح المعقمة والمبردة ثم رفع القرص ووضع في مركز كل طبق بتري ثم حضنت الاطباق على درجات حرارية (5 ، 25 ، 37) م° لمدة اسبوع، بعدها تم تشخيص عزلات الفطر بالاعتماد على شكل ولون وطبيعة نمو المستعمرات الفطرية واقطارها ووجود او عدم وجود الافرازات والصبغات بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية المعتمدة (15).

7- تشخيص عزلات الفطر *A.flavus* المحلية الفارزة للافلاتوكسين

تم تشخيص افراز عزلات الفطر *A.flavus* للافلاتوكسين وذلك بتنميتها على الوسطين الآتيين:

1- **وسط *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA)**

وهذا الوسط الزرعي يكون تفريقياً للكشف عن العزلة المنتجة للافلاتوكسين والتي تعود للفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* ، اذ ان العزلات المنتجة للافلاتوكسين تعطي لوناً برتقالياً مصفراً وبراقاً في خلفية الوسط الزرعي بعد مرور 48 ساعة على التحضين عند درجة حرارة 27 م°±1 م° (19).

2- **وسط Aflatoxin-Producing Ability Medium (APA)**

وهو وسط متخصص للكشف عن العزلات التابعة للفطرين *A.flavus*، *A.parasiticus* المنتجة للافلاتوكسين على التفلور عند الطول الموجي 365 نانوميتر، اذ تعطي المستعمرات الفطرية النامية على هذا الوسط لمدة اسبوع وعند درجة حرارة 27 م°±1م° تفلوراً أزرق اللون تحت مصباح الاشعة فوق البنفسجية (20 , 21).

8- استخلاص وفصل وتشخيص السموم الفطرية من عينات الطحين الملوثة

تم فصل وتشخيص السموم الفطرية الملوثة لعينات الطحين المستخدمة في الدراسة، وذلك حسب تقنية Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) وذلك في مختبر دائرة بيطرة دهوك قسم الصحة الحيوانية / المختبرات / وحدة تحليل السموم، اذ تم وزن (5) غم من كل عينة طحين، ووضعت في دورق زجاجي، واضيف لكل عينة (25) سم³ من الميثانول تركيز 70%، ومزجت جيداً بتحريكها حركة دائرية لمدة (3) دقائق، بعدها تم ترشيحها بواسطة ورق ترشيح ومن ثم صب مستخلصاتها في أنابيب بلاستيكية مع كتابة رقم كل عينة على الانبوبة ومن ثم فحص هذه العينات وتشخيص السموم الفطرية (إن كانت حاوية عليها) بواسطة تقنية ELISA وكما يلي:

1- نقل 100 مايكروليتر من الافلاتوكسين القياسي (aflatoxin conjugate) الى طبق الاليزا خالي من ال antigen لغرض المزج.

2- أضافة 100 مايكروليتر من كل عينات المستخلص و 100مايكروليتر من مجموع اربعة مقارنات وبالتراكيز 0 ، 5 ، 15 ، 50 ppb، الى نفس الطبق لغرض المزج مع الافلاتوكسين القياسي.

3- تحويل 100مايكروليتر من الخليط وكذلك 100 مايكروليتر من المقارنات ووضع في طبق اخر حاوي على antigen والتحضين لمدة دقيقتين بدرجة حرارة 25 م°.

4- غسل الطبق بـ 300 مايكروليتر من الماء المقطر لخمس مرات.

5- أضافة 100 مايكروليتر من مادة التفاعل Substrate إلى كل الطبق والحضن لمدة ثلاثة دقائق بدرجة حرارة 25 م° لغرض التفاعل.

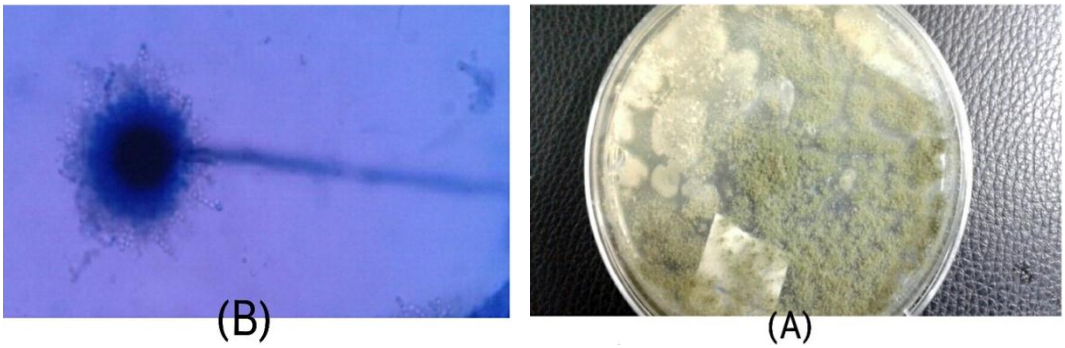
6- بعدها تم أضافة 100 مايكروليتر من محلول الايقاف Stop solution .

7- القراءة بجهاز ELISA على 360 نانوميتر (كثافة ضوئية) (22).

النتائج والمناقشة

1- تشخيص الفطريات المعزولة من عينات الطحين والخبز والصمون المنتج عنه حسب أنواعها ومصادرها

أوضحت نتائج عزل الفطريات من عينات الطحين (المحلية والمستوردة) والخبز والصمون المنتج منه, والتي أخذت من الأفران والمخابز المحلية في مدينة دهوك عن وجود أنواع مختلفة من الفطريات, وكان الفطر *Aspergillus flavus* (الشكل 1) اكثر الفطريات انتشاراً, اذ عزل من كل من الطحين الأسمر المحلي, والطحين الأسمر الإيراني, ثم يليه الفطر *Penicillium* sp. , اذ عزل من الطحين الأبيض المحلي (1،5) والطحين الأسمر الايراني, ثم الفطر *A.niger*, الذي عزل من الطحين الأسمر الايراني فقط, هذا وقد كانت عينات الخبز والصمون المنتج في كافة عينات الطحين خالية من أي تلوث بالفطريات (الجدول 2).



شكل 1: الفطر *A.flavus* (عزلة محلية)

(A): المستعمرة (الصفات المزرعية) , (B): الصورة المجهرية للفطر بقوة تكبير 40X

الجدول2: الفطريات المعزولة من عينات الطحين والخبز والصمون المنتج عنه حسب أنواعها ومصادرها

رقم العينة	نوع العينة ومصدرها	الفطريات المعزولة	تكرارها *
1	طحين أبيض محلي	*Penicillium* sp.	3
2	خبز طحين أبيض محلي	(–)	(–)
3	طحين أبيض تركي	(–)	(–)
4	صمون طحين أبيض تركي	(–)	(–)
5	طحين أبيض محلي	*Penicillium* sp.	11
6	خبز (رقائق) طحين أبيض محلي	(–)	(–)
7	طحين أسمر محلي	*Aspergillus flavus*	15
8	خبز طحين أسمر محلي	(–)	(–)
9	طحين أسمر إيراني	*Aspergillus niger A.flavus Penicillium* sp.	3 15 4
10	خبز (رقائق) طحين أسمر إيراني	(–)	(–)

*** كل قراءة تمثل ثلاثة مكررات, كل مكرر طبق واحد .**

(–) عدم وجود نمو فطري .

*** التكرار الكلي للفطر هو مجموع تكرار مستعمراته المعزولة من جميع العينات.**

1.1 تشخيص الفطريات المعزولة من عينات الطحين والخبز والصمون المنتج عنه حسب تكرارها ونسبة عزلها .

تبين من خلال نتائج عزل الفطريات من عينات الطحين والخبز والصمون المنتج عنه إن الفطر *A.flavus* كان اكثر الفطريات المعزولة تكراراً, فقد عزل بنسبة (58.82%), يليه الفطر *Penicillium* sp. , حيث عزل بنسبة (35.29%), ثم الفطر *A.niger* حيث عزل بنسبة (5.88%) (الجدول 3) .

الجدول 3: الفطريات المعزولة من عينات الطحين والخبز والصمون المنتج عنه حسب تكرارها الكلي ونسبة عزلها.

الفطريات المعزولة	تكرارها الكلي *	% للعزل **
Aspergillus flavus	30	58.82
A.niger	3	5.88
Penicillium sp.	18	35.29

*** التكرار الكلي للفطر هو مجموع تكرار مستعمراته المعزولة من جميع العينات**

$$\text{** \% للعزل} = \frac{\text{مجموع تكرار مستعمرات الفطر المعزول}}{\text{المجموع الكلي لتكرار مستعمرات الفطريات المعزولة}} \times 100$$

وهذه النتائج تتفق مع ماوجده (12) اذ عزل الفطر *A.flavus* من طحين الحنطة, وكذلك مع (23) في بون بألمانيا اذ عزلا كل من الفطر *A.flavus* , الفطر *Penicillium* sp. والفطر *Cladosporium* sp. من طحين الحنطة, وكذلك مع (5) في جمهورية التشيك, اذ عزلوا الفطر *A.flavus* من طحين الحنطة, وكذلك مع (13) , اذ عزلوا الفطر *A.flavus* من طحين الحنطة, وكذلك مع (14) في جدة في المملكة العربية السعودية, اذ عزلوا فطريات *A.flavus* و *Penicillium* من عينات طحين الحنطة, وكذلك مع (3) في جمهورية مقدونيا, اذ عزلوا فطريات الجنس *Aspergillus* والجنس *Penicillium* من طحين الحنطة, وكذلك مع (8) في محافظة بابل بالعراق, اذ عزلوا فطريات الأجناس *Aspergillus* , *Penicillium* , *Cladosporium* و *Rhizopus* من عينات طحين الحنطة, إن جميع عينات الطحين هذه والتي كانت ملوثة بالفطريات, هي ناتجة من حنطة ملوثة أساساً بالفطريات, اذ إن أنواع الفطريات الملوثة للحنطة هي نفس الفطريات التي ستلوث الطحين والأغذية المنتجة عنه (11), إن عينات الطحين الأسمر

المحلي والإيراني كانت ملوثة بفطريات *A.flavus* , *Penicillium* و *Rhizopus stolonifer* لاحتوائها على النخالة, وهذه النتائج تتفق مع ماوجده (24) من ان الفطر *Penicillium* sp. تم عزله من عينات الطحين الغير منخول (الطحين الأسمر), وإن الطحين ذو الدرجة الأولى (ذو التهيئة العالية) كان خالياً من التلوث بالفطريات.

إن عينات الخبز والصمون المنتج في كافة عينات الطحين المستخدمة, كانت خالية من التلوث بالفطريات, وهذه النتائج تتفق مع ماوجده (25), من ان المعاملات الحرارية التي تتعرض لها المنتجات الغذائية المصنعة من الطحين كالخبز والصمون تقضي على الفطريات الملوثة لها. إن تلوث الطحين بهذه الفطريات قد يكون ناتجاً عن إصابة أو تلوث الحبوب المنتج منها أو أنه نتيجة تخزين هذا الطحين او الحبوب المنتج عنها تحت ظروف غير صحية, وهذا يتفق مع ماوجده (26), من إن المحاصيل الزراعية المخزنة تحت ظروف غير صحية تكون عرضه للتلوث بالفطريات الخيطية.

2- تشخيص عزلة الفطر *Aspergillus flavus* المحلية

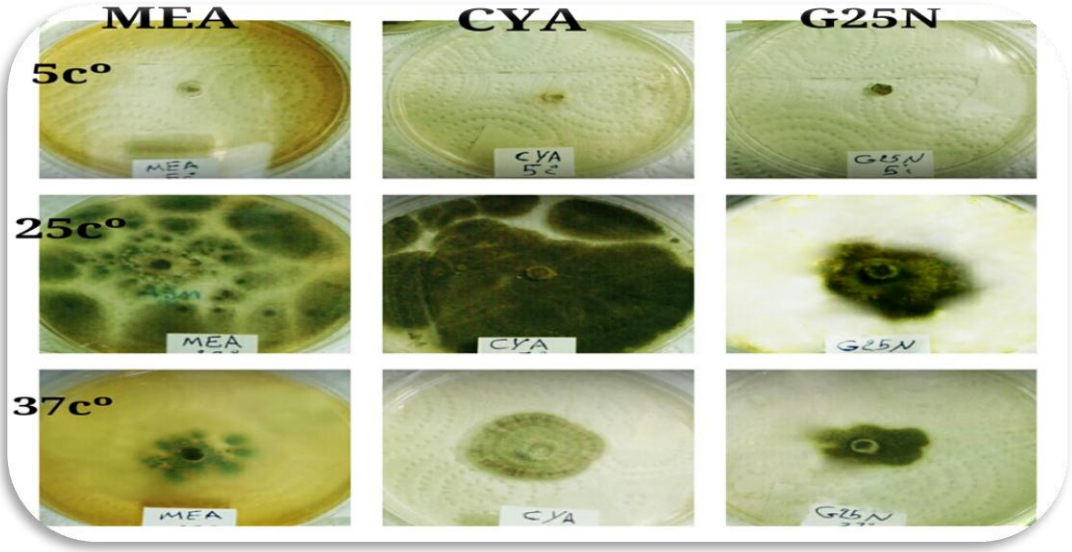
تبين من دراسة تشخيص عزلة الفطر *A.flavus* (المحلية) اعتماداً على الصفات المزرعية للمستعمرات والصورة المجهرية للفطر , وكذلك اعتماداً على تأثير بعض الأوساط الزرعية وهي وسط زابك ومستخلص الخميرة (CYA) ووسط مستخلص الشعير (MEA) ووسط نترات الكليسرين (G25N25%) وبدرجات حرارية مختلفة (5،25، 37) مْ على نمو عزلة الفطر *A.flavus* المحلية, إنه لم يحصل اي نمو للفطر على درجة حرارة (5) مْ وعلى جميع الأوساط الزرعية المستخدمة, في حين ان الفطر قد نما عند درجة حرارة (25) مْ وعلى جميع الأوساط الزرعية (الجدول 4 , الشكل 2), حيث كان متوسط اقطار المستعمرات للفطر *A.flavus* (8.0) سم على الوسطين الزرعيين (MEA) و (CYA) و (3.25) سم على الوسط الزرعي (G25N), وعند درجة حرارة (37) مْ مع متوسط اقطار المستعمرات (5) سم على الوسط الزرعي (MEA) و (5.5) سم على الوسط الزرعي (CYA) و(3) سم على الوسط الزرعي (G25N), هذا ولم توجد فروقات معنوية بين اقطار المستعمرات ولنفس الدرجة الحرارية (25) مْ على الوسطين الزرعيين (MEA) و (CYA), (الجدول 4) وإن هذه النتائج تتفق مع ما ذكره (15), من حيث معدل أقطار مستعمرات القطر *A.flavus* النامية على الأوساط الزرعية وتحت الدرجات الحرارية اعلاه, وإن هذا الفطر المعزول هو *A.flavus*.

الجدول (4): تأثير درجات الحرارة والأوساط الزرعية على نمو عزلة الفطر *A.flavus* المحلية

درجات الحرارة (مْ)	الأوساط الزرعية	أقطار المستعمرات النامية (سم) *
5	MEA CYA G25N	0.5 د 0.5 د 0.5 د
25	MEA CYA G25N	8.0 أ 8.0 أ 3.25 ج
37	MEA CYA G25N	5 ب 5.5 ب 3.0 ج

***1- كل معاملة تمثل متوسط ثلاثة مكررات, كل مكرر طبق واحد .**

2- القيم التي تشترك بحرف أبجدي واحد أو أكثر ليس بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05 .



الشكل 2: تشخيص عزلة الفطر *A.flavus* (المحلية) على الأوساط الزرعية

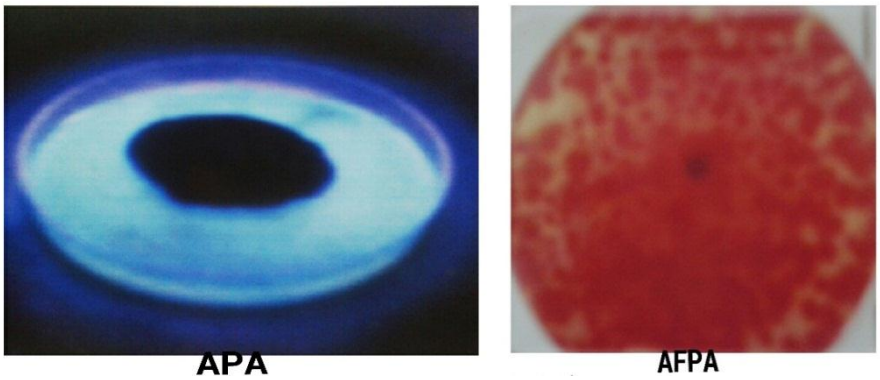
3- تشخيص عزلات الفطر *A.flavus* الفارزة للأفلاتوكسين

تم التأكد من إفراز عزلتي الفطر *A.flavus* المحلية والمعزولتين من العينتين (7) و (9) وهي الطحين الأسمر المحلي والطحين الأسمر الإيراني لسموم الأفلاتوكسين من خلال إظهارها لوناً برتقالياً مصفراً وبراقاً في خلفية المستعمرات النامية على وسط *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA) (الشكل 3)، وهذا يتفق مع ما وجده (19 , 27) من أنَ العزلة الفارزة للأفلاتوكسين للفطر *A.flavus* تظهر لوناً برتقالياً مصفراً في خلفية المستعمرة الفطرية عند تنميتها على وسط AFPA (الجدول 5), وكذلك أظهرت العزلتان عند تنميتهما على وسط Aflatoxin-Producing Ability Medium (APA) وميضاً متفلوراً مزرقاً تحت الأشعة فوق البنفسجية بالطول الموجي 365 نانوميتر، عند تعريضها له في حجرة مظلمة (الشكل 3) ، وهذا يتفق مع ما وجده (20 , 21) من أنَ عزلة الفطر *A.flavus* الفارزة للأفلاتوكسين تظهر وميضاً متفلوراً تحت الأشعة فوق البنفسجية بالطول الموجي 365 نانوميتر،(الجدول 5).

الجدول 5: أختبار قابلية عزلات الفطر *A.flavus* المعزولة من عينات الطحين على إفراز الأفلاتوكسين.

رقم العينة	مصدرها	لون المستعمرة على ظهر الطبق على الوسط الزرعي AFPA	التألق تحت الأشعة فوق البنفسجية على الوسط الزرعي APA	إفرازها للأفلاتوكسين
7	طحين أسمر محلي	برتقالي أصفر	وميض أزرق	(+)
9	طحين أسمر إيراني	برتقالي أصفر	وميض أزرق	(+)

(+): **عزلة قادرة على إفراز الأفلاتوكسين .**



الشكل 3: إفراز عزلة الفطر *A.flavus* (المحلية) للأفلاتوكسين على وسط AFPA و APA

4- الكشف عن الأفلاتوكسين في عينات الطحين المستخدمة في الدراسة

أظهرت نتائج الكشف النوعي والتقدير الكمي لسموم الأفلا (الأفلاتوكسين) في عينات الطحين المستخدمة في الدراسة بتقنية ال ELISA ، إن بعض عينات الطحين كانت ملوثة بالأفلاتوكسين، وهي العينة (7) من الطحين الأسمر المحلي بمقدار 2 ملغم/كغم، تليها العينة (9) من الطحين الأسمر الإيراني، وبمقدار 1 ملغم/كغم، هذا وكانت العينات (1) من الطحين الأبيض المحلي، (3) من الطحين الأبيض التركي و (5) من الطحين الأبيض المحلي خالية من أي تلوث بالأفلاتوكسين (الجدول 6)، إن تراكيز الأفلاتوكسين في عينات الطحين هي ضمن الحدود المسموح بها عالمياً حسب ما حددته منظمة الصحة العالمية (WHO) كحد أعلى مسموح به في أغذية الكبار وهي 20 ملغم/كغم (20 ppb) (WHO, 2002)، وهذه النتائج تتفق مع ما وجده (12)، حيث فصل الأفلاتوكسين B_1 بمعدل 16.3 نانوغرام/غرام من طحين الحنطة، وكذلك مع ما وجده (2)، بأن طحين الحنطة كان موجباً لفحص الأفلاتوكسين B_1 بتركيز 25.62 مايكروغرام/كغم ، وكذلك مع (5)، في جمهورية التشيك الذين وجدوا تلوث طحين الحنطة بالأفلاتوكسين بمعدل (2-10) ppb، وكذلك مع (28) في الرباط بالمغرب، من ان طحين الحنطة كان ملوثاً بالأفلاتوكسين B_1 بمعدل 0.07 نانوغرام/غرام. ولقد كانت عينات الطحين الأسمر المحلي و الأسمر الإيراني ملوثة بالأفلاتوكسين، وذلك لاحتوائها على النخالة والتي هي قشور الحبوب دون الطحين الأبيض الخالي من النخالة وهذه النتائج تتفق مع ما وجده (29) من انه عملية تقشير حبوب الحنطة أدت إلى تقليل محتواها من السموم الفطرية، وكذلك مع (30)، من إن مستوى السموم الفطرية كان عالياً في النخالة، بينما كان الطحين النهائي (المنخول) أقل مستوى من هذه السموم, بهذا نستنتج إن عينات الطحين الأسمر المحلي وكذلك عينات الطحين الأسمر الأيراني, ملوثة بلأفلاتوكسين B ولكن ضمن الحدود المسموح بها عالميا, أما عينات الطحين الأبيض التركي والطحين الأبيض المحلي فكانت خالية تماما من أي تلوث بالأفلاتوكسين.

الجدول 6: الكشف عن سموم الأفلا (الافلاتوكسين) في عينات الطحين المستخدمة في الدراسة

رقم العينة	نوعها ومصدرها	تركيز الافلاتوكسين (ملغم/كغم)
1	طحين أبيض محلي	0
3	طحين أبيض تركي	0
5	طحين أبيض محلى	0
7	طحين أسمر محلي	2
9	طحين أسمر إيراني	1

المصادر

1. **Hemery, Y.; Rouau, Y.; Lullien-Pesserin, V.; Barron, C. and Abecassis, J. (2007)**. Dry processes to develop wheat fractions and products with anhanced nutritional quality. Journal of Cereal Science, 46: 327-347 .
2. **Abdullah, N.; Nawawi, A. and Othman, I. (2000)**. Fungal spoilage of starch-based foods in relation to it is water activity(aw). Journal of stored products Rcsearch.
3. **Bogdanoska, V.; Doneva - Sapceska, D.; Gavazova, E. and Ristovska-Shurbevska, F.(2014)**. Fungal contamination of cereals and flour-based products,including breads and determination of ochratoxin A with ELISA technique. Journal of hygenic engineering and design,8:112-115 .
4. **Muriuki, F.K. and Siboe, G.M.(1995)**. Maize flour contaminated with toxigenic fungi and mycotoxins in Kenya. Afr. J. Health Sci. 2(1): 236-241.
5. **Halt,M.; Lcovacevie, D.; Pavlovie, H. and Jukic,J.(2004)**. Contamination of cereals,flour and pastry with mould species A*spergillus flavus* and aflatoxin B1in the region of Slavonia and Basanja. Zech. J. Food Sci., 22(2):67-72 .
6. **Hedayati, M.T. and Mohammad pour, R.A. (2005)**. The *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in wheat samples of Mazandaran province, Iran Behbood. 9: 52-61 .
7. **Al-Wadai, A.S.; AL-Othman, M.R.; Mohmoud, M.A. and Abdel-Aziz, A.R. (2013)**. Molecular characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxin concentration of wheat grains from Saudi Arabia. Genetic and Molecular Research.12(13): 3335- 3352.
8. **Al-Defiery, M.J. and Mergan, A.F. (2015)**. Mycoflora of mold contamination in wheat flour. Meso. environ. J.1(2):16-25 .
9. **Berghofer, L.K.; Hocking, A.D.; Miskelly, D. and Jansson, E. (2003)**. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of food microbiology, 85:137-149.
10. **Cabanas, R.; Bragulat, M.R. and Abarca, M.L.(2008)**. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market, Food Microbiol.25:642-647 .
11. **Graves, R. R. and Hesseltine, C. W. (1966)**. Fungi in flour and refrigerated dough products. Mycopathol. Mycol. Appl. 29: 277-290.
12. **Halt, M. (1994)**. *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 in flour production. European Journal of epidemiology, 10(5):555-558 .
13. **Gonzalez-Salgado, A.; Gonzalez-Jaen, T.; Vazquez, C. and Patino, B. (2008)**. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour.Food additives and contaminats: part A. 25(6):758-764 .
14. **Gashgari, R. M.; Shebany, Y. M. and Gherbawy, Y.A. (2010)**. Molecular characterization of mycobiota and aflatoxin contamination of retail wheat flours from Jeddah markets. Food borne pathogens and disease.7(9): 1047-1054 .
15. **Pitt, J. and Hocking A. D. (1997)**. Fungi and Food Spoilage, 2nd ed., Acadimic Press. Sydney. 240 pp.
16. **Ronald, M. A. ; Alfard, E. B. and Lawrence, C. P. (1995)**. Laboratory manual of experimental microbiology, Mosby Year book, Inc. United states of America.
17. **Smith, J. E. (1971)**. Mycotoxins Formation Analysis and Significance. Jhon Wiley and Sons 1 td. Great Britain, 120 pp .
18. **Koneman, E. W.; Roberts, G. D. and Wright, S. E. (1979)**. Practical laboratory mycology. The Williams and Willkimugs Company. 2nd ed. Baltimor, USA., 153 PP .
19. **Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. (1996)**. Principles of Seed Pathology. 2nd edition. Lewis Publishers. New York. 539 pp.
20. **Wicklow, D. T.; Shotwell, O. L. and Adams, G. L. (1981)**. Use of Aflatoxin-producing ability medium to distinguish aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus*. Applied Environmental Microbiology. 697-699 .
21. **Hara, S.; Feunell, D.I. and Hesseltine, C.W. (1974)**. Aflatoxin producing strains of *A. flavus* defectal by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. Appl. Microbiol. 27(6): 1118-1123.
22. **Saadullah, A. A. M. and Abdullah, S. K. (2015)**. Contamination of Dried Figs with Fungi and Aflatoxigenic Potential of Some Isolates of *Aspergillus* Section Flavi. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 5(2): 76-80.
23. **Senckenberstr and Romerstr (2000)**. Whole wheat and white wheat flour- The mycobiota and potential mycotoxins, Food microbiology, 17(1): 103-107 .

24. Krenzberger, M. (2011). Fusarium infection of bread wheat and subsequent mycotoxin contamination of milling products : Impact on quality parameters and composition of flour. Doctoral Dissertation, Faculty of Agricultural sciences. Georg-August-University. Gottingen, Germany.

25. Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Sinmons, A. (1996). Apractical medical microbiology. 4th ed., Churchill lining stone, 720-725,U.K .

26. Dropa, T.; Hajslova, J.; Lancova, K. and Buresova, I. (2014). The effect of bread-making process on contents of key Trichothecenemycotoxins: Deoxynivalenol and T-2 oxins. Czech J. Food Sci.32 (6): 570-577 .

27. Corry, J.E.L. (1995). Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA). Culture Media for Food Microbiology. 34:254-256.

28. Zinedine, A.; Juan, C.; Soriano, J.M.; Molto, J.C. ; Idrissi, L. and Manes, J. (2007). Limited suvey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabate, Moroco, Int.J.Food Microbial. 115: 124-127.

29. Cheli, F.; Pinotti, L.; Rossi, L. and Dellorto, V. (2013). Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions. Food sci. and Technology XXX:1-8 .

30. Tibola, C.S.; Fernaudes, J.C.; Guarienti, E.M. and Nicolau, M. (2015). Distribution of *Fusarium* mycotoxins in wheat milling process. Food Control. 53: 91-95 .

Isolation and Identification of Some contaminant fungi and Detection of Aflatoxin in flour and produced bread and loaf in Duhok city

Eman A.R. Al-Mazorey , Saleh Easa Mohammad

Biology department , College of Science , Mosul University , Mosul , Iraq

Abstract

This study aimed to isolate and detect some contaminant fungi and its produced mycotoxins on flour and its produced bread and loaf in Duhok city, Kurdistan Region, Iraq, This study included samples of local and imported flour (White & Black), and also the produced bread and loaf.

The study showed different species of contaminant fungi , and the fungus *Aspergillus flavus* was the dominant fungus, which isolated from both the local black flour and Iranian black flour, and fungus *Penicillium* sp, which isolated from both the local white flour and Iranian black flour, then fungus *A.niger*, which isolated from Iranian black flour only, and all the samples of produced bread and loaf were free from any contaminant fungi.

Investigation of effect of temperature degrees and cultures media on growth of the isolated fungi from flour samples, its cultured characteristics and microscopic picture, showed that this fungus is *A.flavus*, and there are two isolates (7,9) produced aflatoxin, which are local black flour and black Iranian flour respectively, but agreed with the allowed limits of World Health Organization.