Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences

Original Article

Molecular identification of fungal species and evaluation of Ochratoxin A contamination in spreading flour in Hamedan bakeries

Shamimeh Ghafori, Reza Habibipour*, Samiye Bayat

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
*Corresponding author; E-mail: Habiby.reza@gmail.com

Received: 16 Sep 2019 Accepted: 28 Oct 2019 First Published online: 23 Jun 2021
Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(3):267-273

Abstract

Background: The presence of toxicogenic fungi and the production of ochratoxin in flour are dangerous to human health. Therefore, identification of these fungi by molecular and precise methods is essential. The aim of this study was molecular identification of fungal species and investigation of ochratoxin A contamination in flours used in bakeries in Hamadan

Methods: In this descriptive-analytical study, 60 flour samples were collected from bakeries in Hamadan. At first, fungi were identified using phenotypic methods such as slide culture. Then, the genus and species of fungi were confirmed by PCR and sequencing of PCR products. ELISA method was used to detect ochratoxin A. Data were analyzed with GraphPad software version 6.

Results: Of the 60 samples, 28 flour samples (46.66%) were free of fungal contamination and 32 flour samples (53.33%) were over fungal contamination (10^4 colonies/gr). Aspergillus and penicillium were the most abundant in samples. The prevalence of fungi in flour of Lavash bread, Sangak Bread, Barbari bread, Taftoon bread (Handmade), Taftoon bread (Machinal made), Stokbrood bread and Loaf bread were 50%, 46%, 35%, 31%, 26%, 18% and 11%, respectively. However, the highest levels of ochratoxin A were reported in flour of Lavash bread (3.98 ppb) and the lowest in Loaf bread (0.66 ppb). There was also a significant relationship between the fungal species and the amount of ochratoxin A production in flour of beards.

Conclusion: While phenotypic and genotypic methods did not show the same sensitivity, the presence of ochratoxin in the studied flours indicated the necessity of modification in wheat storage and bakery flours.

Keywords: Ochratoxin, Mycotoxins, Polymerase Chain Reaction

How to cite this article: Ghafori Sh, Habibipour R, Bayat S. [Molecular identification of fungal species and evaluation of Ochratoxin A contamination in spreading flour in Hamedan bakeries]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(3):267-273. Persian.

© 2021 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی گونه‌های قارچی و بررسی آلودگی به اکراتوکسین A در آردهای توزیع شده در نانوایی‌های شهر همدان

شمیمه غفوری، رضا حبیبی پور*، سمیه بیات

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Habiby.reza@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۶ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۴/۲
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛۴۳(۳):۲۶۷-۲۷۳

چکیده

زمینه: وجود قارچ‌های توکسین‌زا و تولید اکراتوکسین در آرد برای سلامتی انسان خطرناک است. لذا، شناسایی این قارچ‌ها با روش‌های به‌روز امری ضروری است. هدف از این مطالعه، شناسایی مولکولی گونه‌های قارچی و بررسی آلودگی به اکراتوکسین A در آردهای استفاده شده در نانوایی‌های شهر همدان می‌باشد.

روش‌کار: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، ۶۰ نمونه آرد از نانوایی‌های سطح شهر همدان جمع‌آوری گردید. ابتدا، با استفاده از روش‌های فنوتیپی مانند اسلاید کالچر قارچ‌ها تعیین هویت شدند. سپس، با استفاده از روش PCR و تعیین توالی محصولات PCR، جنس و گونه‌ی قارچ‌ها تایید شد. جهت شناسایی اکراتوکسین A از روش الایزا استفاده گردید. اطلاعات با نرم افزار GraphPad نسخه ۶ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه، ۲۸ نمونه آرد (۴۶/۶۶٪) فاقد آلودگی قارچی و ۳۲ نمونه آرد (۵۳/۳۳ ٪) دارای آلودگی قارچی بیش از حد مجاز (10^4 کلونی در گرم) بود. قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم دارای بیشترین فراوانی بودند. فراوانی قارچ‌ها در آردهای نان لواش، نان سنگک، نان بربری، نان تافتون تنوری، نان تافتون ماشینی، نان باگت و نان گرده به ترتیب ۵۰٪، ۴۶٪، ۳۵٪، ۳۱٪، ۲۶٪، ۱۸٪ و ۱۱٪ بود. از طرفی، بیشترین مقادیر اکراتوکسین A در آرد لواش (ppb۳/۹۸) و کمترین میزان آن در آرد گرده (ppb۰/۶۶) گزارش شد. همچنین، ارتباط معناداری بین گونه‌های قارچی و میزان تولید اکراتوکسین مشاهده شد، بطوری‌که گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم قارچ‌های تولید کننده اکراتوکسین بودند.

نتیجه‌گیری: درحالی‌که روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، حساسیت یکسانی را نشان ندادند، وجود اکراتوکسین در آردهای بررسی شده، ضرورت اصلاح در انبار گندم و آردهای نانوایی را نشان می‌دهد.

کلید واژه‌ها: اکراتوکسین، مایکوتوکسین، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

نحوه استناد به این مقاله: غفوری ش، حبیبی پور ر، بیات س. شناسایی مولکولی گونه¬های قارچی و بررسی آلودگی به اکراتوکسین A در آردهای توزیع شده در نانوایی‌های شهر همدان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛۴۳(۳):۲۶۷-۲۷۳

حق تألیف برای مؤلف محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

گندم، مهمترین غلات می‌باشد که نقش بسیار مهمی در خوراک اولیه انسان دارد و به عنوان متداولترین ماده‌ی اولیه در تهیه خوراک بشر محسوب می‌شود و نان رایجترین ماده غذایی تهیه شده از غلات است (۱). این ماده غذایی به دلیل خصوصیات غنی خود، از نظر غذایی محل مناسبی برای رشد و تکثیر ارگانیسم‌های مختلف مانند قارچ‌ها می‌باشد (۲, ۳). این ارگانیسم‌ها در شرایط سخت قادر به زندگی می‌باشند و در بیشتر مواقع می‌توانند خود را با شرایط نامناسب نیز وفق دهند. این خصوصیت قارچ‌ها مربوط به تولید برخی متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که رشد ارگانسیم را افزایش افزایش می‌دهد (۴). از جمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه قارچی مایکوتوکسین‌ها و اکراتوکسین هستند که در آلودگی مواد غذایی نقش مهمی دارند (۵–۷). این نوع مایکوتوکسین به دنبال رشد برخی از گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم در غلات و آرد تولید می‌شود. مصرف این مواد غذایی در انسان عوارض زیادی به دنبال دارد (نظیر سمیت کلیوی، سمیت ژنتیکی، سرطانزایی، سمیت سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های مادرزادی) و همچنین، مانع ساخت و ساز پروتئین و اختلال در گلوکونئوژنز در کبد انسان می‌گردد (۸). از طرفی، وجود میزان بالای کربوهیدرات و پروتئین در آرد، آن را محیط مناسبی جهت ایجاد رشد قارچ‌های توکسین‌زا کرده است (۹). یکی از مهمترین مایکوتوکسین‌ها، اکراتوکسین A (OTA) است که به دنبال رشد برخی قارچ‌ها از جنس پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس تولید می‌شود. اکراتوکسین Aبا فرمول شیمیایی C20H18O6NC، مهم‌ترین توکسین گروه اکراتوکسین‌هاست (۹). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اکراتوکسینA توسط قارچ‌های *پنی سیلیوم وروکوزوم* و *آسپرژیلوس اوکراسئوس*، *آسپرژیلوس کربوناریوس* و *آسپرژیلوس نایجر* در مواد غذایی و نان و بویژه در مناطق با آب وهوای سرد و مرطوب تولید می‌شود (۱۰, ۱۱). اکراتوکسین که یک ماده محلول در چربی است براحتی دفع شده و در بافت های چربی تجمع می یابد. این ماده که یک نفروتوکسین بالقوه است، اولین بار در آفریقای جنوبی از قارچ *آسپرژیلوس اکراسئوس* جداسازی گردید (۱۲, ۱۳). با توجه به خطرات بالقوه اکراتوکسین A در سلامت جامعه، بسیاری از کشورها حد مجاز پایینی را برای حضور احتمالی این توکسین در مواد غذایی در نظر گرفته‌اند. اتحادیه مقررات اروپا حداکثر میزان مجاز اکراتوکسین در هرگرم غلات و فراورده‌های آن ۹ نانوگرم اعلام کرده است (۱۴، ۱۵). علاوه بر تولید مایکوتوکسین‌ها و سایر متابولیت‌های سمی، تغییرات عمده‌ای که در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌ها در غلات به وجود می‌آیند ارزش غذایی آن را بشدت کاهش می‌دهند و سبب آسیب به کیفیت ظاهری و خواص رئولوژیک آن می‌شوند (۱۶). لذا هدف از این مطالعه، شناسایی مولکولی گونه‌های قارچی و بررسی آلودگی به اکراتوکسین در آردهای توزیع شده در نانوایی‌های شهر همدان می‌باشند.

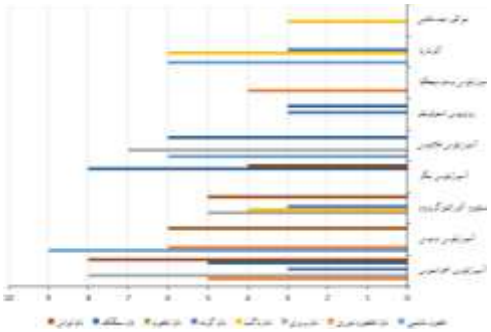
روش کار

در این مطالعه توصیفی– مقطعی، در یک دوره ۵ ماهه (از شهریور تا با بهمن ۹۷) استفاده از روش نمونه برداری آسان، تصادفی و در دسترس، ۶۰ نمونه آرد مختلف که شامل آردهای لواشی، سنگک، گرده، تافتون تنوری، تافتون ماشینی، بربری و باگت بود، از نانوایی‌های شهر همدان با حفظ اصول استریلیزاسیون، جمع آوری شد. شرایط انتخاب محل‌های نمونه-گیری بر اساس فاصله مکانی و موقعیت جغرافیایی نانوایی‌ها صورت گرفت. تمامی نمونه‌های برای انجام کارهای تشخیصی به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان منتقل گردید. برای شناسایی قارچ‌ها، حدود یک گرم از هر نمونه به داخل لوله‌های بزرگ حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد. بعد از ورتکس و اطمینان از مخلوط شدن آنها، لوله‌ها به مدت یک ساعت به صورت ساکن در حرارت آزمایشگاه نگه‌داری شد. بعد از انجام مراحل فوق، از مایع رویی به مقدار مشخص برداشت و در پلیت کشت داده شد. جهت کشت، از محیط های سابروز گلوکز آگار حاوی کلرامفنیکل (Quelab، کانادا)، چابک داکس آگار(Quelab، کانادا) و پوتیتو گلوکز آگار (Quelab، کانادا)، استفاده گردید. بعد از این مرحله پلیت‌ها در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگه‌داری و بصورت متوالی از نظر قارچ‌شناسی بررسی شد. با توجه به مورفولوژی کلنی‌های مختلف قارچی، تشخیص اولیه آنها انجام شد. برای بررسی میکروسکوپی، با استفاده از محلول لاکتوفنل کاتن بلو (Sigma-aldrich، آمریکا) رنگ آمیزی کلنی‌ها انجام شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶). برای شناسایی قارچ‌های تولید کننده اکراتوکسینA از کیت الایزا (Neogen، آمریکا) استفاده شد. به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر از محلول های استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به کمک سمپلر به حفره های میکروپلیت اضافه شد. ۲۵ میکرولیتر محلول کونژوگه اکراتوکسین A-HRP و ۲۵ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی به حفره‌های میکروپلیت اضافه شد و سپس به مدت یک ساعت به دور از نور و در دمای ۲۰–۲۵ درجه سلسیوس نگه داری شد. سپس مایع موجود در میکروپلیت خارج شده و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن به شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب رطوبت مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد. بعد از آن، همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو گردید (۲ بار) و هر بار بعد از تخلیه مایع شستشو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال

کاغذی قرار گرفت تا کاملاً باقیمانده آب شستشو خارج شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به حفره اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰–۲۵ درجه انکوبه گردید. در نهایت برای توقف واکنش محلول قطع واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد. میزان جذب هر نمونه با الایزا ریدر و در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. استخراج DNA با روش گریندر– فنل کلروفورم انجام شد. در ابتدا، جدایه‌های رشد کرده بر روی پوتیتو دکستروز آگار (Merck، آلمان)، در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری محتوی ۵۰ میلی لیتر محیط پوتیتو دکستروز بروس (Merck، آلمان)، تلقیح و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شد و توده قارچی بدست آمده با کاغذ صافی جدا و با آب مقطر شستشو داده شد. سپس، با خرد کردن میسیلیوم‌ها در بافر آبی، مایع رویی به لوله جدا کننده منتقل شد و به میزان هم حجم فنل کلروفورم (Sigma-aldrich، آمریکا) افزوده و سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی به لوله جدید منتقل و به میزان دوبرابر حجم از ۲– پروپانول (Sigma-aldrich، آمریکا) و ۳/۱ حجم از استات سدیم (Sigma-aldrich، آمریکا) به لوله اضافه شد و در دمای ۲۳– درجه سلسیوس فریزر به مدت ۲۰ دقیقه سرمادهی شد. سپس ۱۰ دقیقه رسوب‌گیری در میکروفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ انجام شد. رسوب تشکیل شده در انتهای لوله قابل مشاهده بود. برای حذف نمک و الکل یکبار شستشو با اتانول ۷۰ درصد (Merck، آلمان) انجام شد و رسوب انتهایی با افزودن ۲۰ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر در دمای ۲۰– درجه سلسیوس ذخیره شد (۱۷). **جهت انجام PCR از** توالی‌های F:GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC و R:ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC با طول ۳۰۰ جفت باز برای تکثیر ژن ITS استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده بعد از رقیق سازی با غلظت ۱۰ پیکومولار برای تهیه مخلوط PCR استفاده گردید. حجم نهایی واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل: ۱میکرولیتر از DNA الگو، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت۱۰ پیکومولار و ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqon، آلمان) استفاده شد. برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad C1001 (آمریکا) استفاده شد. مشخصات و چرخه‌های دمایی جهت تکثیر ژن های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. برنامه حرارتی به صورت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه ۳۵ سیکل ۹۴ درجه‌ای به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه تنظیم شد. سپس، ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR بر روی ژل اگارز ۱/۵درصد در بافر ۰/۵X الکتروفورز گردید. از مارکر bp ۱۰۰فرمتاز (Thermofisher، آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد (۱۸). قبل از انجام تجزیه و تحلیل آماری داده‌های پرت تصحیح شد و نرمال بودن و تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار GraphPadنسخه ۶ (GraphPad، آمریکا) انجام گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری χ^2 استفاده شد. داده‌های با $p\leq ۰/۰۵$، معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۶۰ نمونه، ۲۸ نمونه (۴۶/۶۶٪) فاقد آلودگی قارچی و ۳۲ نمونه (۵۳/۳۳٪) دارای آلودگی قارچی بیش از حد مجاز $۱۰^۴$کلونی در گرم در آرد بود. همچنین، از آرد لواش قارچ‌های *آسپرژیلوس اخراسئوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* بیشترین فراوانی را در آردهای مختلف داشتند. همچنین، روش فنوتیپی قادر به تشخیص گونه برخی قارچ‌ها نبود که در نمونه آردهای تافتون ماشینی، باگت و گرده پزی، *آلترناریا* و *فوزاریوم* بیشترین فراوانی را داشتند (نمودار ۱).



نمودار۱: فراوانی قارچ‌های مختلف در آردهای جمع آوری شده

نتایج تعیین توالی بدست آمده از تکثیر ژن *ITS* نشان داد که قارچ‌های با شماره ذخیره سازی ۲ITS1–، ۳ITS1–، ۴ITS1–، ۵ITS1–، بترتیب *آسپرژیلوس فلاووس* با شماره دسترسی KU527785.1، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با شماره دسترسی KU321562.1 و *آسپرژیلوس تریکولا* با شماره دسترسی KY203999.1 بودند (شکل۱). روش فنوتیپی برای برخی از قارچ‌های جنس پنی‌سیلیوم، فوزاریوم، رایزوپوس و آلترناریا فاقد نتیجه بود و در نتایج تعیین توالی جنس و گونه‌ی آن‌ها گزارش گردید (جدول۲).

نتایج حاصل از شناسایی قارچ‌های تولید کننده اکراتوکسین

درصد فراوانی آلودگی به اکراتوکسین و مقدار اکراتوکسین در آرد لواش، سنگک، بربری و باگت به ترتیب ۶۵٪ و ۳/۹۸ نانوگرم/ گرم، ۵۰٪ و ۰۲/ نانوگرم/ گرم، ۴۲٪ و ۲/۱۹ نانوگرم/ گرم و ۴۰٪ و ۲/۶۸ نانوگرم/ گرم بود (جدول۲).

شکل ۱: الکتروفورز ژن ITS بر روی آگارز ۱/۵. L: مارکر ۱۰۰-جفت باز. N: کنترل منفی، چاهک۱: کنترل مثبت. چاهک ۲: آسپرژیلوس اکراسئوس. چاهک ۳: آسپرژیلوس وستردیجکی. چاهک ۴: آسپرژیلوس ترئوس. چاهک ۵: آسپرژیلوس وستردیکئی. چاهک ۶: آسپرژیلوس فلاووس. چاهک ۷: آسپرژیلوس نایجر. چاهک ۸: آپرژیلوس استینی. چاهک ۹: پنی‌سیلیوم اورانتیوگریسم .چاهک۱۰: پنی‌سیلیوم وروکوزوم. چاهک ۱۱: موکور هیمالست. چاهک ۱۲: آلترناریا آلترناتا .چاهک ۱۳: فوزاریوم آسپاراژی. چاهک ۱۴: رایزوپوس آریسا

جدول۱: مقایسه نتایج کشت و تعیین توالی برخی نمونه های قارچی منتخب و مجهول در آردهای نانوایی های استان همدان

شماره نمونه	جنس و گونه بر اساس روش کشت	جنس و گونه بر اساس روش تعیین توالی	اختلاف دو روش
۱	آسپرژیلوس اکراسئوس	آسپرژیلوس اکراسئوس	مشابهت دو روش
۲	آسپرژیلوس وستردیکئی	آسپرژیلوس وستردیکئی	مشابهت دو روش
۳	آسپرژیلوس (گونه نامشخص)	آسپرژیلوس استینی	حساسیت بالای تعیین توالی در شناسایی گونه
۴	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس	مشابهت دو روش
۵	آسپرژیلوس ترئوس	آسپرژیلوس ترئوس	مشابهت دو روش
۶	پنی‌سیلیوم اورانتیوگریسم	پنی‌سیلیوم اورانتیوگریسم	مشابهت دو روش
۷	پنی‌سیلیوم (گونه نامشخص)	پنیسیلیوم وروکوزوم	حساسیت بالای تعیین توالی در شناسایی گونه
۸	آسپرژیلوس نایجر	آسپرژیلوس نایجر	مشابهت دو روش
۹	رایزوپوس (گونه نامشخص)	رایزوپوس آریسا	حساسیت بالای تعیین توالی در شناسایی گونه
۱۰	فوزاریوم (گونه نامشخص)	فوزاریوم آسپاراژی	حساسیت بالای تعیین توالی در شناسایی گونه
۱۱	آلترناریا (گونه نامشخص)	آلترناریا آلترناتا	حساسیت بالای تعیین توالی در شناسایی گونه
۱۲	موکور هیمالست	موکور هیمالست	مشابهت دو روش

جدول ۲: میزان آلودگی آردهای شهر همدان به قارچ های مختلف حاوی اکراتوکسین نوع A

ردیف	نوع آرد	تعداد نمونه	نمونه های آلوده(٪)	مقدار اکراتوکسین (نانوگرم/گرم)	انحراف معیار
۱	آرد لواشی	۲۰	۱۳ (٪۶۵)	۳/۹۸	۱/۷۵
۲	آرد سنگکی	۱۰	۵ (٪۵۰)	۳/۰۲	۱/۴۳
۳	آرد بربری	۷	۳ (٪۴۲)	۲/۱۹	۰/۳۱
۴	آرد تافتون ماشینی	۸	۳ (٪۳۷)	۲/۰۱	۰/۴۵
۵	آرد تافتون تنوری	۴	۱ (٪۲۵)	۱/۷۸	۱/۳۰
۶	آرد باگت	۵	۲ (٪۴۰)	۲/۶۸	۳/۳۲
۷	آرد گرده	۶	۲ (٪۳۳)	۰/۶۶	۰/۱۵

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از آزمون χ^2 ارتباط معناداری بین گونه قارچ‌های مورد بررسی و تولید اکراتوکسینA دیده شد. بطوری‌که آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم دارای بیشتری فراوانی از نظر تولید توکسین در آردهای مختلف بودند.

بحث

گندم و فراورده‌های آن به دلیل داشتن ارزش غذایی بالا، نقش مهمی در تغذیه انسان دارند. این مواد با دارا بودن ویژگی‌های خاص، محل مناسبی برای رشد و تکثیر انواع قارچ‌ها می‌باشند. این در حالی است که، تولید توکسین‌های قارچی در آرد، کیفیت ظاهری و خوراکی آن را کاهش داده و سبب افت ارزش غذایی آن می‌گردد. در مطالعه حاضر، از۶۰ نمونه، ۲۸ نمونه (٪۴۶/۶۶) فاقد آلودگی قارچی و ۳۲ نمونه (٪۵۳/۳۳) دارای آلودگی قارچی بیش از حد مجاز 10^4کلونی در گرم بود و قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم دارای بیشترین فراوانی را نشان دادند. در مطالعات صورت گرفته توسط Torović در سال ۲۰۱۸ در صربستان (۸) و Elaridi و همکاران در سال ۲۰۱۹ لبنان، نشان داده شد که فراوان‌ترین قارچ آلوده کننده آردهای انبار شده، گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم می‌باشد. آن‌ها همچنین بیان کردند که شرایط نامناسب در نگهداری غلات می‌تواند زمینه آلودگی غلات را فراهم کند که در نهایت آلودگی آرد را نیز به دنبال دارد. نتایج مطالعه حاضر به نوعی تایید کننده این موضوع می‌باشد که توان بالای زیستی و سازش پذیری با شرایط سخت محیطی در آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم سبب افزایش فراوانی این گونه‌ها در آرد شده است. همچنین، ذخیره نامناسب و انبارداری غیراستاندارد گندم و آرد در محیط‌های دارای رطوبت بالا، زمینه رشد تصاعدی این قارچ‌ها فراهم کرده و سبب انتقال این توکسین‌های قارچی به آرد و سایر محصولات وابسته به غلات نیز می‌شود. نتایج این مطالعه نشان دادکه، فراوانی قارچ‌ها در آردهای لواش، سنگک، بربری، تافتون تنوری، تافتون ماشینی، باگت و گرده به ترتیب ۵۰٪، ۴۶٪، ۳۵٪، ۳۱٪، ۲۶٪، ۱۸٪ و ۱۱٪ بود. از طرفی، با توجه به نتایج الایزا، بیشترین مقادیر اکراتوکسینA در آرد لواش (ppb۳/۹۸) و کمترین میزان آن در آرد گرده (ppb۰/۶۶) گزارش شد. مطالعه Morassi و همکاران در سال ۲۰۱۸ در برزیل (۱۹) نشان داد که میزان آلودگی به قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم در برخی نان‌ها ۱/۵ برابر بیشتر از استاندارد جهانی است. از طرفی، این دو گونه بیشترین میزان تولید اکراتوکسینA را به خود اختصاص داده بودند. گذشته از این، Spahiu و همکاران در سال ۲۰۱۸ در بوسنی (۲۰) مقدار کم توکسین‌های قارچی و اکراتوکسین A را در آردهای مختلف گندم گزارش دادند. آن‌ها همچنین نشان دادند که میزان آلودگی به اکراتوکسینA در آرد گندم در سال ۲۰۱۸ در مقایسه با سال ۲۰۱۶ بیشتر شده است. بررسی‌های Huybrehts و همکاران در سال ۲۰۱۸ در امارات نشان داد که آلودگی قارچی در آردهای جدا شده از مناطق مختلف، متفاوت است. از طرفی، آن‌ها

با استفاده از روش الایزا مقدار اکراتوکسینA در آرد گندم را ۰/۷۷ میکروگرم/کیلوگرم گزارش دادند. تفاوت در نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر و بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که اختلاف آب و هوایی نقش مهمی در توزیع فراوانی قارچ‌های توکسین‌زا دارد. قارچ‌ها در شرایط آب و هوایی مرطوب با سرعت بیشتری به رشد و تکثیر می‌پردازند و به دنبال آن، مقدار بیشتری توکسین نیز تولید می‌کنند. در این مطالعه، برخی گونه‌های قارچی با روش‌های معمول فنوتیپی قابل تشخیص نبودند که بعد از انجام PCR جنس و گونه‌ی آن‌ها مشخص گردید. این امر نشان دهنده حساسیت بالای روش مولکولی نسبت به روش‌های فنوتیپی معمول است و همچنین، اختلاف بین نتایج ما و سایر مطالعات را توجیح می‌کند. Schaarschmidt و Hassek در سال ۲۰۱۸ در آلمان (۲۱) با بررسی عوامل مختلف در آلودگی‌های غلات و آرد به قارچ‌های مختلف، روش سنجش آلودگی قارچی را موثرترین عامل در تفاوت گزارشات اپیدمیولوژیک معرفی کردند. آن‌ها نشان دادند که استفاده از روش‌های مولکولی و روش‌هایی مانند کروماتوگرافی، دارای حساسیت و اختصاصیت بسیار مناسبی در مقایسه با روش‌های فنوتیپی مانند کشت، می‌باشد. مطالعات Rahi و همکاران در سال ۲۰۱۸ در برزیل (۲۲) و Modhو همکاران در سال ۲۰۱۷ در آلمان (۲۳) اهمیت روش مورد استفاده در شناسایی قارچ‌های توکسین‌زا و توکسین‌های قارچی را مطرح کردند. این محققان مشخص کردند که روش‌های مولکولی مانند PCR در کنار روش‌های معمول مانند الایزا، کمک زیادی به بهبود نتایج و شناسایی قارچ‌های توکسین‌زا می‌کند. در مطالعه حاضر، جهت شناسایی گونه‌های قارچی، تعیین توالی بعد از انجام PCR به عنوان دقیق‌ترین روش ژنوتیپی با کمترین خطا مورد استفاده قرار گرفت که اختلاف نتایج تعیین توالی با نتایج حاصل از کشت و بررسی‌های فنوتیپی گزارش شد. مطالعات Demirel و همکاران در سال ۲۰۱۴ ترکیه(۷) و Heهمکاران در سال ۲۰۱۸ در چین (۴) نشان داد که، استفاده از تعیین توالی ژن‌های اختصاصی و همچنین روش‌های نانومولکولار، یکی از بهترین راه‌های شناسایی جنس و گونه‌های مختلف قارچی در آلودگی‌های مختلف عنوان شد. همچنین، Wang و همکاران در سال ۲۰۱۷ در چین (۲۴) تایید کردند که روش الایزا یکی از بهترین روش‌ها برای شناسایی توکسین‌های قارچی است که با بهینه کردن آن، می‌توان حساسیت و اختصاصیت الایزا را افزایش داد. گرچه در مطالعه حاضر، به دلیل محدودیت‌های زمانی امکان بررسی سایر مایکوتوکسین‌ها با روش‌های مختلف میسر نبود، اما، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، سایر مایکوتوکسین‌ها در غلات مختلف و محصولات وابسته بررسی شوند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دادکه مقدار آلودگی قارچی با توجه به الگوی فصلی و دمایی می‌تواند دستخوش تغییر قرار بگیرد. همچنین، مشخص گردید که روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی از حساسیت یکسانی جهت شناسایی جنس و گونه‌های مختلف قارچی برخوردار نیستند و روش PCR به مراتب حساس‌تر می‌باشد. از طرفی، با توجه به مشاهدات ما، آلودگی آردهای مختلف در سطح شهر همدان بالا گزارش شد که به منظور رسیدن به نتیجه نهایی، انجام مطالعات تکمیلی نیاز می‌باشد. برای کنترل این آلودگی‌ها نیز، اندازه‌گیری مقادیر مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی، وضع مقررات بهداشتی برای تعیین حد مجاز مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی، اتخاذ تدابیر لازم و پیشگیرانه برای جلوگیری از آلودگی‌های قارچی در مواد غذایی و توجه به اجرای روش‌های حذف و یا کاهش میزان مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی بهتر است صورت گیرد و ضرورت پیگیری مسئولین ذیربط در کلیه مراحل، با هدف به حداقل رساندن آلودگی های قارچی جدی می باشد.

قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه خانم شمیمه غفوری دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان می‌باشد که با کد ۱۷۱۳۰۵۰۷۹۷۱۰۰۵ به تصویب معاونت محترم پژوهشی و کمیته اخلاق دانشگاه رسیده است. لذا نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود از این دانشگاه را به دلیل همه حمایت‌ها اعلام می‌دارند.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مؤلفان

خانم ش. غ.، آقای دکتر ر. ح. و سایر همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. Doolotkeldieva TD. Microbiological control of flour-manufacture: dissemination of mycotoxins producing fungi in cereal products. Microbiology insights. 2010 Jan;3:MBI-S3822. doi: 10.4137/mbi.s3822.
2. Demirel R, Sariozlu NY. Mycotoxigenic moulds and mycotoxins in flours consumed in Turkey. J Sci Food Agric. 2014 Jun;94(8):1577-84. doi: 10.1002/jsfa.6460. Epub 2013 Nov 18. PMID: 24166184.
3. Rizzello CG, Lavecchia A, Gramaglia V, Gobbetti M. Long-Term Fungal Inhibition by Pisum sativum Flour Hydrolysate during Storage of Wheat Flour Bread. Appl Environ Microbiol. 2015 Jun 15;81(12):4195-206. doi: 10.1128/AEM.04088-14. Epub 2015 Apr 10. PMID: 25862230; PMCID: PMC4524146.
4. Rizzello CG, Lavecchia A, Gramaglia V, Gobbetti M. Long-Term Fungal Inhibition by Pisum sativum Flour Hydrolysate during Storage of Wheat Flour Bread. Appl Environ Microbiol. 2015 Jun 15;81(12):4195-206. doi: 10.1128/AEM.04088-14. Epub 2015 Apr 10. PMID: 25862230; PMCID: PMC4524146.
5. Yun TS, Park SY, Yu J, Hwang Y, Hong KJ. Isolation and identification of fungal species from the insect pest Tribolium castaneum in rice processing complexes in Korea. The plant pathology journal. 2018 Oct;34(5):356. doi: 10.5423/PPJ.OA.02.2018.0027.
6. Alborch L, Bragulat MR, Castellá G, Abarca ML, Cabañes FJ. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. Food microbiology. 2012 Oct 1;32(1):97-103. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.014.
7. Demirel R, Sariozlu NY. Mycotoxigenic moulds and mycotoxins in flours consumed in Turkey. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014 Jun;94(8):1577-84. doi: 10.1002/jsfa.6460.
8. Torovic L. Aflatoxins and ochratoxin A in flour: a survey of the Serbian retail market. Food Addit Contam B. 2018;11(1):26-32. doi: 10.1080/19393210.2017.1391335.
9. Reddy L, Bhoola K. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. Toxins. 2010;2(4):771-9. doi: 10.3390/toxins2040771.
10. Yang X, Liu S, Huang C, Wang H, Luo Y, Xu W, et al. Ochratoxin A induced premature senescence in human renal proximal tubular cells. Toxicology. 2017;382:75-83. doi: 10.1016/j.tox.2017.03.009.
11. Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015;55(13):1860-9. doi: 10.1080/10408398.2012.724480.
12. Amézqueta S, Schorr-Galindo S, Murillo-Arbizu M, González-Peñas E, López de Cerain A, Guiraud JP. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. Food Control. 2012;26(2):259-68. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.01.042.
13. Sorrenti V, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. Toxins (Basel). 2013 Oct 11;5(10):1742-66. doi: 10.3390/toxins5101742. PMID: 24152986; PMCID: PMC3813909.
14. Caridi A, Sidari R, Pulvirenti A, Meca G, Ritieni A. Ochratoxin A adsorption phenotype: an inheritable yeast trait. J Gen Appl Microbiol. 2012;58(3):225-33. doi: 10.2323/jgam.58.225. PMID: 22878740.
15. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. Toxins. 2016;8(7):191. doi: 10.3390/toxins8070191
16. Fazekas B, Tar AK, Zomborszky-Kovacs M. Ochratoxin a contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. Acta Vet Hung. 2002;50(2):177-88. doi: 10.1556/AVet.50.2002.2.7.
17. Luque MI, Andrade MJ, Rodríguez A, Bermúdez E, Córdoba JJ. Development of a Multiplex PCR Method for the Detection of Patulin-, Ochratoxin A- and Aflatoxin-Producing Moulds in Foods. Food Analytical Methods. 2013;6(4):1113-21. doi: 10.1007/s12161-012-9516-1.
18. Abastabar M, Mirhendi H, Hedayati MT, Shokohi T, Rezaei-Matehkolaei A, Mohammadi R, et al. Genetic and Morphological Diversity of the Genus Penicillium From Mazandaran and Tehran Provinces, Iran. Jundishapur J. Microbiol. 2016;9(1):e28280-e. doi: 10.5812/jjm.28280.
19. Morassi LLP, Bernardi AO, Amaral ALPM, Chaves RD, Santos JLP, Copetti MV, et al. Fungi in cake production chain: Occurrence and evaluation of growth potential in different cake formulations during storage. Food Res Int. 2018;106:141-8. doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.075.
20. Huybrehts B, Hoxha R, Gjergji T, Shandro-Zeqiri M, Muharremi H, Haziri I, et al. Level of ochratoxin A in cereal-flours in the Prishtina region. Phytopathologia Mediterranea. 2018;57:341-50. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-22889.
21. Schaarschmidt S, Fauhl-Hassek C. The Fate of Mycotoxins During the Processing of Wheat for Human Consumption. Compr Rev Food Sci F. 2018;17(3):556-93. doi: 10.1111/1541-4337.12338.
22. Omori AM, Ono EYS, Bordini JG, Hirozawa MT, Fungaro MHP, Ono MA. Detection of Fusarium verticillioides by PCR-ELISA based on FUM21 gene. Food Microbiol. 2018 Aug;73:160-167. doi: 10.1016/j.fm.2018.01.020. Epub 2018 Jan 19. PMID: 29526201.
23. Modh H, Scheper T, Walter J-G. Detection of ochratoxin A by aptamer-assisted real-time PCR-based assay (Apta-qPCR). Engineering in Life Sciences. 2017;17(8):923-30. doi: 10.1002/elsc.201700048.
24. Wang T, Li P, Zhang Q, Zhang W, Zhang Z, Wang T, et al. Determination of Aspergillus pathogens in agricultural products by a specific nanobody-polyclonal antibody sandwich ELISA. Sci Rep. 2017;7(1):4348. doi: 10.1038/s41598-017-04195-6.