# تقويم كفاءة بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم سم الأفلاتوكسين $B_1$ في بعض ثمار الفاكهة المجففة

ازهار علي الحداد[1]، حليمة زغير حسين[2] ومحمد عامر فياض[1]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق؛

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق، البريد الالكتروني: muamer2010@yahoo.com

## الملخص

**الحداد، ازهار علي، حليمة زغير حسين ومحمد عامر فياض. 2016. تقويم كفاءة بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم سم الأفلاتوكسين $B_1$ في بعض ثمار الفاكهة المجففة. مجلة وقاية النبات العربية، 34(2): 148–155.**

أجريت هذه الدراسة بهدف اختبار كفاءة بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم الأفلاتوكسين $B_1$. تم الحصول على 35 عزلة من الفطر *Aspergillus flavus* من بعض الثمار المجففة، واختبرت قابليتها في إنتاج الأفلاتوكسين $B_1$ باستخدام بعض طرائق الكشف عن السم كالتعريض للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 365 نانومتراً وطريقة بخار الأمونيا وتحليل الكروماتوغرافي ذي الطبقة الرقيقة، كما استخدمت بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم السم المتمثلة باستخدام غاز الاوزون والأشعة فوق البنفسجية وأشعة المايكروويف والطبخ بالبخار وبالطريقة الاعتيادية. قدرت تراكيز سم الأفلاتوكسين $B_1$ بتقانة التحليل المناعي المرتبط بالإنزيم (إليزا). أبدت 24 عزلة للفطر *A. flavus* توهجاً ازرق اللون بنسبة 68.57% في حين لم تبد 11 عزلة للفطر التوهج نفسه عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية، كما أعطت العزلات المختبرة نفسها نتيجة موجبة لاختبار الأمونيا من خلال تغير لون مقلوب الطبق من الأبيض إلى الأحمر–الأرجواني، أما باقي العزلات فقد أعطت نتيجة سالبة للاختبار. تميزت العزلة $A_7ar_2$ بالإنتاج العالي للسم من بين أربع عزلات منتخبة للفطر *A. flavus* بعد تحليل الكروماتوغرافي ذي الطبقة الرقيقة وتقانة الاليزا، إذ بلغ تركيز السم فيها 138.28 مغ/كغ. تفوقت المعاملة بغاز الاوزون مع الماء وغاز الاوزون فقط بتركيز 99 و33 مغ/غ لمدة 15 و5 دقائق على باقي المعاملات الفيزيائية المتمثلة بأشعة المايكروويف والأشعة فوق البنفسجية والطبخ بالبخار وبالطريقة الاعتيادية.

**كلمات مفتاحية:** الأفلاتوكسين $B_1$، طرائق التحطيم الفيزيائية، الفاكهة المجففة.

## المقدمة

الفواكه المجففة هي ثمار تم إزالة غالبية محتواها المائي أما بشكل طبيعي بالتجفيف الشمسي أو باستعمال مجففات خاصة. ويعود استهلاك هذا النوع من الفواكه المجففة إلى الألف الرابعة قبل الميلاد (13). كما يعد تجفيف الفاكهة من الطرائق التقليدية في حفظ وخزن الثمار لفترة طويلة، وتتضمن الفواكه المجففة العديد من الثمار مثل الزبيب والخوخ والأجاص والتين والمشمش، ويباع حوالي النصف من إنتاج هذا النوع الغذائي في الأسواق المحلية لبلدان عديدة (27). تعد الفواكه المجففة مصدراً للعناصر المعدنية الأساسية مثل الكالسيوم والحديد والبوتاسيوم والنحاس والبورون والفيتامينات مثل A، C وK والألياف النباتية التي تكون نسبتها منخفضة أحياناً في الوجبات الغذائية اليومية (15، 28). تتعرض الفواكه المجففة إلى العديد من الكائنات الدقيقة كالبكتريا والفطور التي تؤدي دوراً كبيراً في عمليات الفساد وتحدث هذه الحالة في مراحل مختلفة قبل الجني وبعده وأثناء التخزين. وقد أكدت عدة دراسات تلوث الفواكه المجففة بالعديد من أنواع الفطور التي تعود إلى أجناس مختلفة مثل *Aspergillus*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Rhizopus*، *Mucor*، *Fusarium*، *Scopulariopsis* و *Ulocladium* وأن أكثر الأنواع الفطرية سيادةً في العديد من أنواع الفواكه المجففة تعود للأجناس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Alternaria* (4، 7). تعد الفواكه المجففة ركائز غذائية تدعم نمو الفطور وإنتاجها للمركبات والنواتج الايضية ومن ضمنها السموم الفطرية (Mycotoxin) وبهذا يحدث التلوث بالسموم الفطرية مما يشكل مصدر قلق رئيسي في العديد من دول العالم (30). إن أكثر السموم الفطرية شيوعاً في الفواكه المجففة هي Aflatoxin، Ochratoxin، Patuline، Strigmatocystin، Cyclopiazonic إذ تنتج هذه السموم من قبل أنواع معينة من الفطور مثل *A. flavus*، *A. parasiticus*، *A. ochraceus*، *Penicillium expansum* و *A. astus* (20). ونظراً لخطورة الأفلاتوكسينات مقارنة مع باقي الأنواع الاخرى ولتأثيراتها المتعلقة بالسمية الحادة والمزمنة إضافة إلى تأثيراتها المسرطنة للإنسان والحيوانات وانتقالها عبر السلسلة الغذائية، فقد أجريت العديد من التحريات والدراسات من قبل المنظمات والهيئات المعنية بالسلامة الغذائية كمنظمة الصحة العالمية (WHO) وهيئة سلامة الأغذية الأوروبية (EFSA) ومنظمة الأغذية والزراعة (FAO) حول السموم

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-034.2.148155
© 2016 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

الفطرية وعلى مدى واسع من السنوات (11، 24، 26). نالت الطرائق الفيزيائية المستخدمة في تحطيم السموم الفطرية الاهتمام الأكبر من بين طرائق التحطيم الاخرى لمعالجة المواد الغذائية ولاسيما المعاملة بغاز الاوزون، إذ تعد من الطرائق الموصى بها لإزالة التلوث من الأغذية وتحطيم الأفلاتوكسين (14). ونظراً لتزايد الاستهلاك المباشر للفواكه المجففة بالعراق واستهلاك معظمها بشكل مباشر وبخاصة من قبل الأطفال ولتلوثها بالفطور المنتجة للسموم فقد هدفت هذه الدراسة إلى: (أ) التحري عن العزلات الفطرية التابعة للفطر *Aspergillus flavus* واختبار قابليتها على إنتاج سم أفلاتوكسين $B_1$؛ و (ب) تقويم تأثير بعض العمليات الفيزيائية كعمليات الطهو والتعرض لأشعة المايكروويف وفوق البنفسجية وكذلك الاوزون في تحطيم الأفلاتوكسين $B_1$.

## مواد البحث وطرائقه

**عزل الفطور المرافقة للفواكه المجففة وتنقيتها وتشخيصها**

عزلت الفطور المرافقة لثمار الفواكه المجففة وذلك بتقطيع الثمار وأخذ 5 قطع بطول 0.5–1 سم تقريباً وتطهيرها سطحياً بمحلول الفاست بتركيز 5% لمدة 3 دقائق، غسلت القطع بماء مقطر معقم للتخلص من أثر المادة المعقمة وتركت على ورق ترشيح ثم زرعت في أطباق بتري معقمة، قطر 9 سم، حاوية على وسط أكار مستخلص البطاطا والدكستروز Potato dextrose agar وبواقع 3 مكررات لكل عينة و3 مكررات أخرى تركت من دون تطهير سطحي. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25±1°س لمدة 5–7 أيام. شخصت الفطور النامية بعمل شرائح زجاجية لكل نوع منها وذلك بفحصها بمجهر ضوئي مركب نوع Olympus اعتماداً على الصفات الشكلية/المورفولوجية وشكل الأبواغ وحواملها والتراكيب الجنسية واللاجنسية التي تكونها وفقاً للمفاتيح التصنيفية (8، 17). حسبت النسب المئوية لظهور كل نوع من الفطور وتردده ثم حفظت العزلات العائدة للفطر *A. flavus* في الوسط المذكور نفسه بشكل مائل عند 4 °س إلى حين الاستعمال.

**الكشف عن الأفلاتوكسين $B_1$**

**طريقة الأشعة فوق البنفسجية** – اختبرت قابلية 35 عزلة للفطر *A. flavus* بعد إعطائها تسميات رمزية على إنتاج سم الأفلاتوكسين $B_1$ وذلك بأخذ قرص بقطر 5 مم تقريباً من كل عزلة ولقح في طبق بتري قطر 9 سم حاوي على وسط جوز الهند الصلب Coconut agar (COA) بثلاثة مكررات. وضعت الأطباق في الحاضنة عند 27±1 °س لمدة 5 أيام. فحص مقلوب الطبق تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 365 نانومتراً مع ملاحظة لون التألق باستعمال جهاز الـــ U.V. light نوع U.V.L.21 (29).

**طريقة بخار الأمونيا** – اختبرت قابلية 35 عزلة من الفطر *A. flavus* بعد تنميتها على وسط جوز الهند الصلب وذلك بوضع ورقة ترشيح في غطاء طبق بتري وتم إشباعها بمحلول الامونيا بتركيز 20%. وضعت الاطباق في الحاضنة عند 27±1 °س بصورة مقلوبة وفحصت بعد مرور ساعة و24 ساعة من التحضين مع ملاحظة تغير لون ظهر الطبق من الابيض إلى الأحمر – الأرجواني والذي يدل على إنتاج العزلات للأفلاتوكسين $B_1$ (19).

**طريقة الفصل الكروموتوغرافي** – استخدمت صفائح الكروماتوغرافي ذي الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (TLC) المصنعة من الالمنيوم والسيليكا جل G60 المجهزة من قبل شركة CHMLAB Group الاسبانية بأبعاد 20×20 سم. اذيب المستخلص الجاف لكل عينة من عزلات الفطر *A. flavus* باستعمال واحد مل كلوروفورم ورج بشكل جيد لضمان الإذابة الكاملة. أخذت 5 مايكروليترات من كل عينة باستعمال محقن دقيق وضع بشكل بقع على صفيحة الفصل من الجهة اليمنى مع ترك مسافة 1.5 سم بين بقعة وأخرى ومسافة 2 سم من الحافة السفلى والجوانب للصفيحة. وضع السم القياسي للأفلاتوكسين $B_1$ بتركيز 5 أجزاء بالمليون من الجهة اليسرى لصفيحة الفصل بالطريقة نفسها، تركت الصفيحة حتى تجف ثم وضعت في محلول الفصل المكون من نظام الفصل كلوروفورم: ميثانول 97 : 3 وبعد وصول محلول الفصل إلى مسافة 2 سم من الحافة العليا، أخرجت صفيحة الفصل وجففت بالهواء ثم فحصت بالأشعة فوق البنفسجية (UV) مع ملاحظة لون التألق. تم مطابقة معامل الترحيل RF وشدة التألق مع تلك الناتجة من السم القياسي للأفلاتوكسين $B_1$ (6).

**طريقة التحليل المناعي** – اتبعت طريقة Criseo وآخرون (9) المعدلة، انتخبت أربع عزلات من الفطر *A. flavus* والأكثر إنتاجاً للسم بحسب الاختبارات السابقة إذ نميت على وسط زابكس الصلب Czapeks'dox agar لمدة 14 يوماً عند 27°س. قطع الوسط إلى قطع صغيرة مع إضافة 50 مل كلوروفورم لكل طبق بواقع 3 مكررات، ثم مزج الخليط بمازج كهرومغناطيسي نوع U.K.Biocote-Sturat لمدة 15 دقيقة عند حرارة الغرفة. رشح الخليط بورق ترشيح نوع Whatman N 0.1، وضع الراشح في قناني زجاجية وبخر بالحمام المائي حتى الجفاف عند 55°س لمدة 3–5 دقائق، تم حفظت القناني في المجمدة

عند −18°س. قدر تركيز السم باستخدام تقانة التحليل المناعي المرتبط بالإنزيم وبحسب تعليمات الشركة المصنعة لعدة الكشف (21).

**اختبار كفاءة بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم الأفلاتوكسين $B_1$**

**تحضير العينات** – أخذت 400 غ من عينات كل نوع من الفواكه المجففة بعد تعقيمها باستعمال محلول الفاست (هيبوكلوريت الصوديوم) بنسبة 20% لمدة 3 دقائق، غسلت العينات بماء مقطر معقم وتركت على ورق ترشيح داخل غرفة العزل. وضعت العينات في حاويات زجاجية سعة 1 كغ معقمة بالفرن ولوثت بعزلة الفطر *A. flavus* الأكثر إنتاجاً للسم أفلاتوكسين $B_1$. حضنت العينات عند حرارة الغرفة محاكاةً لطرائق خزن الفواكه المجففة في محلات الخزن في العراق لمدة 21 يوماً مع التحريك المستمر لسبعة أيام متتالية لضمان التوزيع المتجانس للفطر. حفظت العينات الملوثة بالعزلة الفطرية بعد انتهاء مدة الحضن بالثلاجة إلى حين إجراء التجارب اللاحقة.

**استخلاص الأفلاتوكسين** – اتبعت طريقة Wu وآخرون (27)، وذلك بأخذ 50 غ من الثمار المجففة الملوثة وبثلاثة مكررات لكل عينة وخلطت بخلاط كهربائي نوع (Gosonic GSB 825) بعد إضافة 150 مل من مذيب كلوروفورم: ماء (90:10) حجم : حجم، ولمدة 3−5 دقائق. رشح الخليط بوساطة ورق ترشيح نوع Whatman N0.1 باستخدام جهاز تفريغ هوائي نوع Value، ثم أعيد الاستخلاص باستعمال 75 مل من المذيب نفسه. جمع الراشح في قناني زجاجية وبخر في حمام مائي عند 55°س حتى الجفاف. حفظت العينة الجافة بالمجمدة عند −18°س لحين إجراء التجارب.

**استخدام طريقة الطبخ العادي** – عرضت عينات كل نوع من ثمار الفواكه المجففة الملوثة بالعزلة الفطرية الأكثر إنتاجاً للسم، لعملية الطبخ الاعتيادي، وضع 15 غ من العينات في كأس زجاجي سعة 250 مل مع إضافة 100 مل ماء مقطر. طبخت العينات عند 80°س لمدة 15 و30 دقيقة، استخلص السم حسب الطريقة السابقة وقدر تركيزه بتقانة الإليزا (22).

**استخدام طريقة الطبخ بالبخار** – استعمل جهاز المؤصدة نوع Jeiotech لمعاملة العينات الملوثة بالطريقة المذكورة سابقاً، وضع 15 غ من العينات في دورق زجاجي سعة 250 مل مع إضافة 100 مل ماء مقطر عند 100°س وضغط 1 باوند/إنش$^2$ وبمدة زمنية 15 و30 دقيقة. استخلص الأفلاتوكسين $B_1$ وقدر تركيزه باستخدام تقانة الإليزا (10).

**استخدام أشعة المايكروويف** – استخدم جهاز المايكروويف Nikai (NMO3850DGS) بقدرة 1000 واط لمعاملة 15 غ من عينات الفواكه المجففة الملوثة بالعزلة الأكثر إنتاجاً للسم وعند درجتي حرارة 80°س و100°س لمدة 5 و15 دقيقة لكل درجة حرارة وتم استخلاص الأفلاتوكسين $B_1$ وقدر تركيزه بتقانة الإليزا (27).

**استخدام الأشعة فوق البنفسجية** – عرضت 15 غ من العينات الملوثة بالعزلة الأكثر إنتاجاً لسم الأفلاتوكسين $B_1$ للأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز UV Light نوع Minera Light R51 بطولين موجيين 240 و365 نانومتراً لمدة 60 و120 دقيقة لكل طول موجي ثم استخلص سم الأفلاتوكسين $B_1$ وقدر تركيزه بتقانة الإليزا (5).

**استخدام غاز الاوزون** – استخدمت طريقتين لمعاملة العينات بالاوزون، الطريقة المائية والطريقة الجافة (24). ففي الطريقة المائية وضع 15 غ من عينات الفواكه المجففة الملوثة في دورق زجاجي سعة 250 مل مع إضافة 50 مل ماء مقطر وعرضت لغاز الاوزون بتركيز 33 مغ/غ لمدة 5 دقائق و99 مغ/غ لمدة 15 دقيقة باستخدام جهاز مولد الاوزون نوع Laisen Model LS-F6 بعد توصيل الدورق الحاوي على العينات بأنبوب الجهاز المولد، ثم تم استخلاص السم وفقاً لما ذكر أعلاه وقدر تركيزه باستخدام تقانة الأليزا. وفي الطريقة الجافة عرضت 15 غ من العينات الملوثة لغاز الاوزون بشكل مباشر بتركيز 33 مغ/غ لمدة5 دقائق و99 مغ/غ لمدة 15 دقيقة بعد ضخ الغاز في الدورق الحاوي للعينات الملوثة، ثم استخلص سم الأفلاتوكسين $B_1$ وقدر تركيزه بتقانة الإليزا.

## النتائج والمناقشة

**عزل الفطور المرافقة لثمار الفواكه المجففة وتشخيصها**

أشارت النتائج (جدول 1) إلى أن أكثر أنواع الفطور المعزولة من الفواكه المجففة ظهوراً وتردداً قبل التطهير السطحي وبعده هو الفطر *A. japonicus* إذ بلغت نسبته 28.34% و30.11% للظهور و31.09% و29.48% للتردد، على التوالي، تلته الأنواع الاخرى وكان أقلها ظهوراً وتردداً قبل التطهير السطحي هو الفطر *Curvularia* sp. بنسب 0.44% و0.12%، على التوالي. كما بينت نتائج العزل والتشخيص للفطور المرافقة لأنواع مختلفة من الفواكه المجففة تلوثها بأنواع مختلفة من الفطور تصدرها الجنس *Aspergillus* ثم الأجناس *Penicillium* و*Rhizopus* فضلاً عن وجود فطور الحقل المتمثلة بالجنسين *Alternaria* و*Curvularia*. توافقت هذه النتائج مع ما نشر سابقاً (3) عند عزل الفطور من 60 عينة فواكه مجففة متمثلة بالزبيب والتين والتمر إذ وجد تلوثها

بالأجناس *Aspergillus*، *Pencillium* و*Rhizopus* وفطور أخرى بنسب ظهور وتردد مختلفة تصدرها الجنس *Aspergillus* في عينات الفواكه المجففة المدروسة جميعها. وقد يعزى ذلك إلى كون الفواكه المجففة تعد ركائز غذائية للعديد من أنواع الفطور ومصدراً للكربون لاحتوائها على الكاربوهيدرات المتمثلة بالسكريات مثل الغلوكوز والفركتوز والسكروز وهذه توافقت مع دراسات سابقة أخرى (12، 25) عند عزل الفطور من 41 عينة زبيب محلي ومستورد في أرمينيا إذ أكدت تلوثها بأجناس عديدة مثل *Aspergillus*، *Pencillium* و*Alternaria* التي تعد من الأجناس السائدة في الفواكه المجففة كالزبيب والتين والتمر والمواد الغذائية الاخرى والأعلاف إلا أن أكثرها سيادةً في عينات الزبيب، الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* ولمجموعة Nigri مثل *A. carbonarius* و*A. japonicus* إضافة إلى الجنس *Mucor* الذي يعد من الملوثات الثانوية لعينات الزبيب. لوحظ أن أكثر الفطور مرافقةً لثمار الفواكه المجففة هي فطور الخزن ولا سيما أنواع الجنس *Aspergillus* spp. لانتشارها على نطاق واسع في الطبيعة إذ تعد من فطور التربة والمحمولة بالهواء كما أنها تترمم على مجموعة واسعة من الركائز الغذائية ويسبب بعضها أمراضاً للفواكه والخضر (7).

**اختبار قابلية عزلات الفطر *A. flavus* على إنتاج أفلاتوكسين $B_1$ باستعمال الأشعة فوق البنفسجية وبخار الأمونيا**

أظهرت النتائج قابلية عزلات الفطر *A. flavus* على إنتاج الأفلاتوكسين $B_1$ من خلال الفحص تحت الأشعة فوق بنفسجية بطول موجة 365 نانومتراً، بعد تنميتها على وسط جوز الهند الصلب حيث أبدت 24 عزلة للفطر *A. flavus* تألقاً أزرق اللون في حين لم تبد باقي العزلات ذلك. تمتاز الأفلاتوكسينات بقابليتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية (28). هذا ما أكده عباس وآخرون (1) عند استعمال أوساط مزرعية مختلفة من ضمنها وسط جوز الهند الصلب للكشف عن سم الأفلاتوكسين $B_1$ باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. فضلاً عن ذلك بينت نتائج الكشف عن الأفلاتوكسين $B_1$ باستعمال طريقة بخار الأمونيا مقدرة العزلات نفسها والبالغة 24 عزلة على إنتاج السم (جدول 2)، إذ شكلت 68.57% من المجموع الكلي للعزلات وذلك من خلال تغير لون مقلوب الطبق من اللون الأبيض إلى الوردي أو الأحمر–الأرجواني حيث كانت أقوى العزلات في إنتاج سم الأفلاتوكسين $B_1$ هي المعزولة من المشمش والتين والكشمش والآجاص اعتماداً على شدة ظهور اللون. إذ يعتمد الأساس الحيوي في اختبار الأمونيا على إنتاج مجموعه من الصبغات الصفراء ذات التراكيب الكيميائية المختلفة التي تعد مركبات وسطية في مسار تخليق الأفلاتوكسين، وأن هذه الصبغات تتحول إلى اللون الاحمر–الارجواني عند اتحادها مع محلول قاعدي كهيدروكسيد الامونيوم أو البوتاسيوم أو بيكاربونات الصوديوم (8). اتضح من هذه النتائج أن العزلات الأقوى إنتاجاً للسم أعطت نتيجة موجبة للاختبار بعد ساعة واحدة من الحضن عند حرارة 27 °س، أما العزلات الأقل إنتاجاً للسم فقد أعطت النتيجة الموجبة بعد 24 ساعة من الحضن عند درجة الحرارة نفسها، وقد يعود السبب في ذلك إلى اختلاف القابلية الوراثية للعزلات الفطرية على إنتاج الأفلاتوكسين (30).

**جدول 1.** النسب المئوية لظهور الفطور المرافقة للفواكه المجففة وترددها

**Table 1.** Occurrence and frequency of fungi associated with dried fruits

| النسبة المئوية للتردد % Frequency | | النسبة المئوية للظهور % Occurrence | | |
|---|---|---|---|---|
| بعد التعقيم After sterilization | قبل التعقيم Before sterilization | بعد التعقيم After sterilization | قبل التعقيم Before sterilization | الفطريات Fungi |
| 5.85 | 4.54 | 8.98 | 7.48 | *Aspergillus flavus* |
| 29.48 | 31.09 | 30.11 | 28.34 | *A. japonicus* |
| 18.25 | 22.93 | 14.97 | 19.23 | *A. niger* |
| 11.01 | 10.55 | 7.65 | 9.10 | *A. terreus* |
| 10.75 | 5.36 | 11.64 | 8.66 | *Alternaria* sp. |
| - | 0.12 | - | 0.44 | *Curvularia* sp. |
| 10.13 | 7.69 | 13.97 | 10.70 | *Penicillium* sp. |
| 14.51 | 17.74 | 12.64 | 16.00 | *Rhizopus* sp. |

**جدول 2.** قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج الأفلاتوكسين $B_1$ بطريقة بخار الأمونيا

**Table 2.** Ability of some *A. flavus* isolates to produce aflatoxin B1 by ammonia vapor

| القابلية على إنتاج سم الأفلاتوكسين $B_1$** Ability of aflatoxin $B_1$ production** | رقم العينة Isolate No | اسم العزلة* Isolate code* | القابلية على إنتاج سم الأفلاتوكسين $B_1$** Ability of aflatoxin $B_1$ production** | رقم العينة Isolate No | اسم العزلة* Isolate code* |
|---|---|---|---|---|---|
| - | 8 | $A_8br_2$ | ++ | 7 | $A_7ar_2$ |
| - | 1 | $A_1ar_2$ | ++ | 7 | $A_7br_1$ |
| + | 5 | $F_5ar_1$ | + | 2 | $A_2ar1$ |
| ++ | 6 | $F_6br_1$ | + | 2 | $A_2br_2$ |
| + | 10 | $F_{10}ar_1$ | + | 3 | $A_3ar_2$ |
| + | 9 | $F_9br_2$ | + | 5 | $A_5ar_3$ |
| ++ | 10 | $C_{10}br_3$ | + | 1 | $A_1ar_1$ |
| ++ | 6 | $C_6ar_3$ | + | 2 | $A_2ar_1$ |
| + | 9 | $C_9ar_3$ | + | 1 | $A_1br_1$ |
| + | 7 | $C_7br_1$ | + | 3 | $A_3br_3$ |
| + | 7 | $C_7ar_1$ | + | 4 | $A_4br_2$ |
| ++ | 9 | $P_9br_1$ | - | 6 | $A_6br_1$ |
| + | 3 | $P_3br_2$ | - | 4 | $A_4br_1$ |
| + | 6 | $P_6ar_2$ | - | 10 | $A_{10}ar_3$ |
| + | 7 | $P_7ar_3$ | - | 3 | $A_3br_1$ |
| - | 9 | $P_9ar_2$ | - | 6 | $A_6ar_1$ |
| - | 8 | $P_8br_3$ | - | 8 | $A_8br_1$ |
| | | | - | 10 | $A_{10}ar_2$ |

* A = المشمش، F = التين، C = الكشمش، P = البرقوق، r = مكرر، a = بعد التعقيم السطحي، b = قبل التعقيم السطحي.

** ++ قوية القدرة على الإنتاج بعد 24 ساعة من الحضن، + ضعيفة القدرة على الإنتاج بعد 24 ساعة من الحضن، - عديمة القدرة على الإنتاج بعد 24 ساعة من الحضن.

* A=apricot, F= fig, C=currant, P=plum, r=replicate, a=after surface disinfection, b=before surface disinfection.

** ++=strong production 24 hr after incubation, +=weak production 24 hr after incubation, -= no production 24 hr after incubation

**إختبار قابلية بعض عزلات الفطر *A. flavus* على إنتاج الأفلاتوكسين $B_1$ باستخدام تقانة التحليل المناعي المرتبط بالإنزيم (الاليزا)**

أظهرت نتائج تقدير تركيز سم الأفلاتوكسين $B_1$ باستخدام تقانة الاليزا للأربع عزلات المنتخبة من الفطر *A. flavus* تفاوتاً في تركيز السم المنتج (جدول 3)، إذ تم الحصول على اكبر كمية من سم الأفلاتوكسين $B_1$ من العزلة $A_7ar_2$ بتركيز بلغ 138.28 مغ/كغ، ثم تلتها العزلات $C_{10}br_3$، $F_6br_1$ و $P_9br_1$ بتراكيز بلغت 51.66 و46.18 و22.79 مغ/كغ على التوالي، بعد تنميتها على وسط زابكس الصلب لمدة 14 يوماً عند 27°س. قد يعزى الاختلاف في تركيز السم إلى عوامل وراثية إذ وجد امتلاك العزلات المنتجة للسم لأربع جينات مسؤولة عن مسار التخليق الحيوي للأفلاتوكسين $B_1$ كما أن هناك جين أخر مسؤول عن تنظيم فعالية هذه الجينات يدعى بـــ Structural gene (7).

**اختبار كفاءة بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم سم الأفلاتوكسين $B_1$**

اشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود فروقات معنوية في تراكيز سم الأفلاتوكسين$B_1$ بين معظم المعاملات ومعاملة الشاهد (جدول 4)، إذ تفوقت المعاملة بغاز الاوزون بتركيز99 و33 مغ/غ مع الماء لمدة 15 و5 دقائق وغاز الاوزون فقط بالتراكيز والمدد الزمنية نفسها معنوياً على معاملة الشاهد ومعظم المعاملات في عينات الفواكه المجففة جميعها، على الرغم من تسجيل معاملة الطبخ بالبخار ولمدة 30 دقيقة أعلى نسبة مئوية لاختزال السم في عينات الزبيب فقط والتي بلغت 80.22%.

**جدول 3.** تركيز سم الأفلاتوكسين $B_1$ في بعض عزلات الفطر *Aspergillus flavus* بالميلي غرام/كغ مقدر بتقانة الإليزا (النتائج تمثل معدل قراءة 3 مكررات).

**Table 3.** Concentration of aflatoxin $B_1$ produced by some isolate of *A. flavus* mg/kg as determined by ELISA (Results represent means of 3 replicates)

| تركيزالأفلاتوكسين$B_1$ (مغ/كغ) Concentration of aflatoxin $B_1$ (mg/kg) | رمز العزلة Isolate code |
|---|---|
| 138.28 | $A_7ar_2$* |
| 46.18 | $F_6br_1$ |
| 51.66 | $C_{10}br_3$ |
| 22.79 | $P_9br_1$ |

**جدول 4.** تأثير كفاءة بعض الطرائق الفيزيائية في تحطيم سم الأفلاتوكسين $B_1$ (القيم في الجدول تمثل معدل ثلاثة مكررات).

**Table 4.** Effect of some physical methods in detoxification of aflatoxin $B_1$ (Values in the table represent means of three replicates).

| Fig التين | | Currant الكشمش | | Apricot المشمش | | Plum الآجاص | | Raisin الزبيب | | المعاملات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R** | C* | R** | C* | R** | C* | R** | C* | R** | C* | Treatments |
| - | 348.84 | - | 348.84 | - | 355.88 | - | 362.12 | - | 392.80 | الشاهد (ثمار مجففة معاملة بعزلة الفطر الفارزة للسم) Control |
| 3.22 | 337.63 | 3.22 | 337.63 | 1.21 | 351.58 | 1.37 | 357.18 | 9.76 | 354.48 | الطبخ الاعتيادي/15 دقيقة Regular cooking/15 min |
| 4.84 | 331.96 | 4.84 | 331.96 | 7.35 | 329.75 | 4.53 | 345.73 | 15.59 | 343.35 | الطبخ الاعتيادي/30 دقيقة Regular cooking/30 min |
| 6.70 | 325.47 | 6.70 | 325.47 | 12.23 | 312.38 | 8.84 | 330.13 | 13.08 | 341.46 | الطبخ بالبخار/15 دقيقة Cooking with vapor/15 min |
| 12.49 | 305.28 | 12.49 | 305.28 | 17.16 | 294.84 | 14.4 | 310.00 | 80.22 | 77.70 | الطبخ بالبخار/30 دقيقة Cooking with vapor/30 min |
| 23.00 | 268.64 | 23.00 | 268.64 | 44.36 | 198.03 | 19.03 | 293.22 | 42.08 | 227.54 | أشعة المايكروويف 80°س/5 دقيقة Microwave cooking 80˚C/5 min |
| 29.10 | 247.35 | 29.10 | 247.35 | 48.01 | 185.04 | 26.55 | 265.98 | 44.22 | 219.11 | أشعة المايكروويف 80°س/15 دقيقة Microwave cooking 80˚C/15 min |
| 35.35 | 225.53 | 35.35 | 225.53 | 52.91 | 167.61 | 33.27 | 241.67 | 50.62 | 193.98 | أشعة المايكروويف 100°س/5 دقائق Microwave cooking 100˚C/5 min |
| 43.79 | 196.10 | 43.79 | 196.10 | 55.83 | 157.20 | 40.75 | 214.57 | 54.39 | 179.16 | أشعة المايكروويف 100°س/15 دقيقة Microwave cooking 100˚C/15 min |
| 18.10 | 285.72 | 18.10 | 285.72 | 27.97 | 256.35 | 12.54 | 316.72 | 37.98 | 243.64 | أشعة فوق بنفسجية 240 نانومتراً/ 60 دقيقة Ultra Violet light at 240 nm/60 min |
| 20.75 | 276.48 | 20.75 | 276.48 | 27.04 | 259.66 | 15.97 | 304.83 | 40.38 | 234.21 | أشعة فوق بنفسجية 240 نانومتراً/ 120 دقيقة UV light at 240 nm/120 min |
| 14.01 | 299.99 | 14.01 | 299.99 | 20.06 | 284.52 | 2.27 | 335.81 | 35.37 | 253.88 | اشعة فوق بنفسجية 365 نانومتراً/ 60 دقيقة UV light at 365 nm/60 min |
| 15.85 | 293.58 | 15.85 | 293.58 | 25.59 | 264.82 | 12.14 | 318.19 | 37.31 | 246.26 | اشعة فوق بنفسجية 365 نانومتراً/ 120 دقيقة UV light at 365 nm/120 min |
| 49.41 | 176.48 | 49.41 | 176.48 | 63.28 | 130.69 | 56.95 | 155.91 | 69.36 | 120.36 | غاز الاوزون 33 مغ/غ/5 دقائق Ozone 33 mg/g/5 min |
| 53.20 | 163.27 | 53.20 | 163.27 | 64.83 | 125.17 | 62.76 | 134.88 | 75.67 | 95.57 | غاز الاوزون 99 مغ/غ/15 دقيقة Ozone 99 mg/g/15 min |
| 58.45 | 144.97 | 58.45 | 144.97 | 72.23 | 98.86 | 73.47 | 96.09 | 76.62 | 91.84 | غاز الاوزون 33 مغ/غ + ماء/5 دقيقة Ozone 33 mg/g + water/5 min |
| 63.65 | 126.83 | 63.65 | 126.83 | 74.07 | 92.30 | 74.09 | 93.85 | 79.07 | 82.24 | غاز الاوزون 99 مغ/ غ + ماء/ 15 دقيقة Ozone 99 mg/g + water/5 min |
| 8.63 | | 8.63 | | 11.11 | | 8.18 | 13.49 | | 90.83 | اقل فرق معنوي عند مستوى احتمالي 5% LSD at P= 0.05 |

* Concentration of aflatoxin $B_1$ (mg/kg)

** % of reduction

* تركيز الأفلاتوكسين $B_1$ (مغ/كغ)

** % للاختزال

حققت المعاملة بغاز الاوزون مع الماء وغاز الاوزون فقط بتركيز 99 و33 مغ/غ لمدة 15 و5 دقائق لكل منهما أعلى نسب مئوية لاختزال سم الأفلاتوكسين $B_1$ في عينات الزبيب إذ بلغت 79.07 و76.62% و75.67 و69.36%، على التوالي، ثم تلتها المعاملة نفسها في عينات الفواكه المجففة الأخرى. توافقت هذه النتائج مع ما أثبته Wang وآخرون (24) عند معاملتهم رز ملوث بسم الأفلاتوكسين $B_1$ بغاز الاوزون مع الماء بتركيز 48 مغ/لتر، اذ أدت إلى اختزال السم بنسبة 78.1% في حين بلغت النسبة المئوية لاختزال السم 52.4 % عند المعاملة بغاز الاوزون فقط. كما أوضحت النتائج الكفاءة العالية للمعاملة بغاز الاوزون بطريقتيها في تحطيم سم الأفلاتوكسين $B_1$، إلا أن المعاملة بغاز الاوزون مع الماء كان لها دور اكبر في التحطيم. قد تعزى مقدرة الاوزون في تحطيم الأفلاتوكسين $B_1$ إلى تفاعل الاوزون مع السم إذ يعمل على تحطيم الروابط المزدوجة بين ذرتي الكاربون 8 و9 مما يؤدي إلى تكوين مركب وسطي غير مستقر يدعى Aflatoxinmonozonide الذي سرعان ما يتحول إلى مركب أكثر استقراراً يدعى Aflatoxinozonide وباستمرار التفاعل تتحطم الروابط المزدوجة الاخرى في المركب الأخير وتنفتح حلقة الفيورإن الطرفية فيتكون مركب الديهايد ثنائي يدعى AFB1-dialdehyde الأقل سمية وتطفيراً (2). وقد يعود سبب ارتفاع نسبة اختزال السم عند المعاملة بغاز الاوزون مع الماء إلى فاعلية الجذور الحرة مثل الهيدروكسيل OH والهيدروبيروكسيل $HO_2$ وبيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ الناتجة من التحلل المائي للأوزون (24). اتضح أن لأشعة المايكروويف دوراً مؤثراً في تحطيم السم بعد المعاملة بغاز الاوزون، وقد يعود السبب في ذلك إلى تأثير الطاقة الحركية لهذه الأشعة في حلقة الفيوران للأفلاتوكسين $B_1$ وتحطيم الروابط المزدوجة أو فقدإن الحلقة نفسها إذ يحدث هذا ايضاً عند وجود الماء كعامل أساس ومن ثم تحرر الجذور الحرة ذات الفعالية العالية في تحطيم السم (18، 23). كما بينت النتائج أن للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 240 نانومتراً تأثيراً اكبر في تحطيم السم من طول موجة 365 نانومتراً وقد يعزى ذلك إلى مقدرتها على ازالة الروابط المزدوجة الطرفية في حلقة الفيورإن (16). اما معاملة الطبخ بالبخار وبالطريقة الأعتيادية ليس لها دور في تحطيم الأفلاتوكسين $B_1$ إلا أن زيادة المدة الزمنية للمعاملة أدت إلى زيادة الخفض في تركيز السم، وقد يعود سبب الخفض في تراكيز السم إلى مقدرة عملية الطبخ على احداث تحطيم جزئي للسم (22).


## Abstract

**Al-Haddad, A.A., H.Z. Hussain and M.A. Fayyadh. 2016. Evaluation of some physical means efficiency in degrading Aflatoxin $B_1$ in some dry fruits. Arab Journal of Plant Protection, 34(2): 148-155.**

This study aimed to evaluate the efficiency of some physical means in degrading Aflatoxin $B_1$. Thirty five isolates of *Aspergillus flavus* were obtained from different dry fruits and their capacity to produce Aflatoxin $B_1$ was determined by different methods such as Ultra Violet light at 365 ηm, ammonia vapor and thin layer chromatography (TLC). Some physical methods were used to test their ability in degrading Aflatoxin $B_1$ by some physical means such as regular cooking and cooking with vapor, use of ozone, UV light or microwave cooking. Concentration of aflatoxin $B_1$ was determined by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Twenty four isolates showed blue fluorescence which represent 68% of total isolates, whereas 11 isolate did not show fluorescence after exposure to UV light. The same isolate showed positive response to ammonia vapor test as plates bottom color changed from white to red-purplish. Results of ELISA and TLC showed that $A_7ar_2$ isolate produced the highest concentration of $B_1$ toxin which reached 138.28 mg/kg. It was also found that treatment with Ozone + water and Ozone alone were more effective in detoxification of $B_1$ toxin compared with microwave and regular cooking methods.



**Keywords:** Aflatoxin B1, physical degradation, dry fruits



***Corresponding author: Azhar Ali Al-Haddad, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Bagdad University, Iraq, email: muamer2010@yahoo.com***


## المراجع

## References


4. **Almeida, A.P., J. Alaburda, V. Ruvieri and M. Sabino.** 2006. Ochratoxin A in raisins samples marketed in São Paulo, Brazil. Revista do Instituto Adolfo Lutz 65:171-175.
5. **Atalla, M.M., N.M., Hassanein, A.A. El-Beih and Y.A. Youssef.** 2004. Effect of fluorescent and UV light on mycotoxin production under different relative humidities in wheat grains. International Journal of Agriculture & Biology, 6: 1006-1012.
1. **Abbas, H.K., W.T. Shier, B.W. Horn and M.A. Weaver.** 2004. Cultural methods for aflatoxin detection. Journal of Toxicology-Toxin Reviews, 23: 295-315.
2. **Alfredo, D.P.** 2008. Evaluation of aflatoxin-related products from ozonated corn. PhD Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. Louisiana State University. 108 pp.
3. **Alghalibi, S.M.S. and A.R.M. Shater**. 2004. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen republic. Assiut University Bulletin for Environmental Researches, 7: 19-27.

6. **Barkai-Golan, R. and N. Paster.** 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. World Mycotoxin Journal, 1: 147-159.
7. **Barnett, H.L. and B.B. Hunter.** 1972. Illustrated genera of imperfect fungi, 3rd ed. Burgess Publishing Company, USA. 241 pp.
8. **Bhatnagar, D., K.C. Ehrlich and T.E. Cleveland.** 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. Applied Microbiology Biotechnology, 61: 83-93.
9. **Criseo, G., A. Bagnara and G. Bisignano.** 2001. Differentiation of aflatoxin producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. Letters in Applied Microbiology, 33: 291-295.
10. **Diedhiou, P.M., F. Ba, A. Kane and N. Mbaye.** 2012. Effect of different cooking methods on aflatoxin fate in peanut products. African Journal of Food Science and Technology, 3: 53-58.
11. **Fung, F. and R. Clark.** 2004. Health effects of mycotoxins: toxicological overview. Journal of Toxicology, 42: 217-243.
12. **Hakobyan, L., K. Grigoryan and A. Kirakosyan.** 2010. Contamination of raisin by filamentous fungi-potential producers of Ochratoxin A. Potravinarstvo, 4: 28-33.
13. **Hui, Y.H., J. Barta, M.P. Cano, T. Gusek, J.S. Sidhu and N.K. Sinha (eds).** 2006. Handbook of fruits and fruit processing. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 81 pp.
14. **Inan, F., M. Pala and I. Doymaz.** 2007. Use of ozone in detoxification of aflatoxin $B_1$ in red pepper. Journal of Stored Products Research, 43: 425-429.
15. **Kim, Y., S.R. Hertzler, H.H. Byrne and C.O. Mattern** 2008. Raisins are a low to moderate glycemic index food with a correspondingly low insulin index. Nutrition Research, 28: 304-308.
16. **Liu, R., M. Chang, Q. Jin, J. Huang, Y. Liu and X. Wang**. 2011. Degradation of aflatoxin $B_1$ in aqueous medium through UV irradiation. European Food Research and Technology, 233: 1007-1012.
17. **Klich, M.A.** 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Ponsen and Looijen: Wageningen, The Netherlands. 116 pp.
18. **Mobeen, A.K., A. Aftab, A. Asif and A.S. Zuzzer.** 2011. Aflatoxin $B_1$ and $B_2$ contamination of peanut and peanut products and subsequent microwave detoxification. Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 1: 1-3.
19. **Saito, M. and S. Machida.** 1999. A rapid identification method for aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience, 40: 205-208.
20. **Schumacher, D.M., M. Metzler and L. Lehmann.** 2005. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. Archives of Toxicology, 79: 110–121.
21. **Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology.** 2011. Afltoxins $B_1$ ($AFB_1$) Elisatestkit. National Biological Industrial Park of Marine life. Binhai Road Dapeng. China 2:1-6 (www.lsybt.com)
22. **Simionato, E.M.R.S. and C.M. de Sylos.** 2004. Effect of cooking on the levels of aflatoxin $B_1$ and ochratoxin A in rice. Brazilian Journal of Food Technology, 7: 167-171.
23. **Singh, R.P. and D.R. Heldman.** 2001. Introduction to Food Engineering, (3rd edition). San Diego, CA: Academic Press.
24. **Wang, S., H. Liu, J. Lin and Y. Cao.** 2010. Can ozone fumigation effectively reduce aflatoxin B1 and other mycotoxins contamination on stored grain?. 10th International Working Conference on Stored Product Protection. Julius-Kühn-Archiv, 425: 582-588.
25. **Willamson, G. and A. Carughi.** 2010. Polyphenol content and health benefits of raisins. Nutrition Research, 30: 511-519.
26. **Wilson, D.M. and J.K. King.** 1995. Production of aflatoxins $B_1$, $B_2$, $G_1$ and $G_2$ in pure mixed cultures of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Food Additives and Contaminants, 12: 521-525.
27. **Wu, X., G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt and R.L. Prior.** 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 4026-4037.
28. **Yabe, K., Y. Ando, M. Ito and N. Terkado.** 1987. Simple method for screening Aflatoxin-Producing molds by UV photography. Applied and Environmental Microbiology, 53:230-234.
29. **Yazdani, D., M.A. Zainal-Abidin, Y.H. Tan and S. Kamaruzamani.** 2010. Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates. African Journal of Biotechnology, 9: 7654-7659.
30. **Zimmerli, B. and R. Dick.** 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants, 13: 655-668.



**Received: April 10, 2015; Accepted: February 25, 2016**

**تاريخ الاستلام: 2015/4/10؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2016/2/25**