الكشف عن سموم الأفلا والأوكرا والزيرالينون في حبوب الشعير من بعض مخازن مدينة مصراتة باستخدام تقنية الاليزا

وسيم بالة، أبراهيم دغمان و محمد الطويل
كلية العلوم، جامعة مصراته

الملخص Abstract

السموم الفطرية هي ملوثات شائعة في المنتجات الزراعية وتمثل تهديدا عاليا لصحة .الانسان. وقد بذلت جهود للحد من هذه السموم في المنتجات الزراعية وتأثيرها الضار على الصحة العامة. ولتحديد تواجد السموم الفطرية الأفلا والأوكرا والزيرالينون في عينات الشعير من بعض المخازن استخدمت طريقة الربط المناعي ELISA. أظهرت النتائج المتحصل عليها عن تواجد سموم الأفلا والأوكرا بالحدود المسموح بها محلياً واوروبياً في جميع عينات الشعير المختبرة، وسجلت أعلى نسبة تواجد لسم الأفلا في عينة الشعير(A6) بمنطقة زاوية المحجوب حيث بلغت 4.83mg/kg في حين سجلت عينة الشعير(A9) المأخوذة من منطقة الحامية أعلى نسبة تواجد للسم الفطري الأوكرا A بلغت 3.52 µg/kg فيما أظهرت النتائج عدم تواجد السم الفطري الزيرالينون بجميع عينات الشعير المختبرة.

المقدمة Introduction

تشكل الحبوب بأنواعها المختلفة منذ أمد طويل المصدر الغذائي الأساسي للإنسان والحيوان، وتتعرض للإصابة بفطريات مختلفة من وقت النضج الفسيولوجي الى أن تستخدم للزراعة او للاستهلاك البشري حيث يزيد عدد الفطريات المصاحبة للحبوب على مئة نوع بعضها يشكل مخاطر مرضية وبعضها الاخر يسبب مشاكل تعفن وافراز سموم أثناء التخزين قد تشكل مخاطر صحية على المستهلكين (Wiese., 1987). انتاج السموم الفطرية عمليه معقده تحدث نتيجة الايض الثانوي للفطريات، وتتداخل فيها عدة عوامل اهمها الصفات الوراثية التي يحملها الفطر لذلك فان عدد انواع الفطريات التي تنتج السموم محدود جداً، وتتميز بوزنها الجزيئي المنخفض نسبيا وغالبا ما يكون أقل من 500 دالتون وغير انتجينية ولها القدرة على الوصول الى الهدف ولا يمكن التخلص منها بسهوله عن طريق عملية الإخراج وتتجمع في الأنسجة وتقاوم المعاملات الحرارية (نخيلان، 2011).

سم الأفلا يعتبر أول سم فطري يتم عزله وتشخيصه بصورة رسمية، وتنتج سموم الأفلا من أنواع مختلفة من جنس *Aspergillus* منها *nomius, flavus, tamatii, parasiticus* حيث تحمل هذه الأنواع الجين المسؤول عن الإفراز ويعتبر النوعان *A. flavus, A. parasiticus* والمعروفان باسم *Aspergillus flavus* group أهمها وأوسعها انتشارا (Zinedine *et al.*, 2006; Ghali *et al.*, 2009).

لقد حددت المواصفة القياسية الليبية رقم 57-1 والصادرة سنة 2013 عن المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية الحدود القصوى لتركيز الكلي لأنواع الافلاتوكسين في الحبوب ومنتجاتها بحيث لا تتجاوز 20 ميكروجرام/كيلوجرام في الاعلاف.

سم الأوكرا تنتجه بعض أنواع من الفطريات التابعة للجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* وأحد أكثر السموم الفطرية الواسعة الانتشار والاخطر، ملوث للغذاء وتعتبر سموم الاوكرا من المجموعة الأولى للسموم الفطرية التي اكتشفت بعد الأفلاتوكسينات، حيث عزل الأوكرا لأول مره سنة 1965 في جنوب أفريقيا من فطر *A. ochraceus* (Van der Merwe *et al*., 1965) وأهم مركبات الأوكراتوكسين (A , B ,C) وأكثرهم شيوعا وخطورة سموم الأوكرا - A(Gareis and Scheuer., 2013).

لقد حددت المواصفة القياسية الليبية رقم 57-1 الصادرة سنة 2013 عن المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية الحدود القصوى لتركيز الاوكراتوكسين في الحبوب ومنتجاتها بنسبة 5 ميكروجرام في الكيلوجرام الواحد.

سم الزيرالينون ينتجه للفطر *Fusarium graminearum*، ويستعمل الرمز F-2toxin كمرادف لهذا السم (نخيلان، 2011).

لقد حددت المواصفة القياسية الليبية رقم 57-1 الصادرة سنة 2013 عن المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية الحدود القصوى لتركيز الزيرالينون في حبوب ومنتجاتها بنسبة 100ميكروجرام في الكيلوجرام الواحد.

أهداف الدراسة The aims of study

الكشف عن سموم الافلا، الاوكرا، والزيرالينون في عينات حبوب الشعير لعدد عشرة مخازن بعدة مناطق بمدينة مصراتة باستخدام الربط المناعي (ELISA) وتحديد تركيز ومطابقتها بالمواصفات المحلية والدولية .

الدراسات السابقة Literature of Reviews

هناك العديد من الدراسات التي أجريت للكشف عن وجود السموم الفطرية بالمنتجات الزراعية تشير الدراسة التي اجريت بدولة كينيا بمنطقتي Busia و Kisii غرب كينيا 2015 على عدد 102 عينة من الفول السوداني للكشف عن سموم الافلا بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC) فوجد ان كل العينات التي جمعت من منطقة Busia احتوت على نسب من الافلاتوكسين تراوحت من 0.1 الى 268 ميكروجرام/ كيلوجرام، وكذلك 97.06 % من عينات منطقة Kisii تراوحت تراكيز الافلاتوكسين فيها من 1.63 إلى 591.1 ميكروجرام / كيلوجرام (Nelson *et al*., 2015).

أجريت في العاصمة التايلاندية بانكوك دراسة في 2014 تم خلالها تجميع عدد 100 عينة شملت عدد 7عينات مشروبات كحولية محلية، و5عينات جبن ازرق مستورد، و18عينة من منتجات فول الصويا، 30عينة فول سوداني خام، و40 عينة مشتقات الفول السوداني للكشف عن السم الفطريAFB1 باستخدام تقنية (ELISA) حيث أشارت النتائج أن متوسط تركيز السم الفطري للعينات المختبرة (0.48، 0.95، 1.54، 6.83، 5.6 ميكروجرام/كيلوجرام) على التوالي . (Charoenponsook and Kavisaraasai., 2014)

العراق أظهرت دراسات سابقه تلوث محصول الذرة الصفراء بسموم الأفلاتوكسين والزيرالينون وأن الفطر *F. moniliforme* من مسببات الأمراض الرئيسية على المحصول في المخازن والحقل وهو مصدر لتلوث الذرة الصفراء بسم Zearalenone (الهيتي، 1977) ونظرا لخطورة مركبات Fumonisins (Mirocha *et al*., 1992). حددت العديد من الدول نسب التلوث المسموح بها في الأغذية والأعلاف .(Sydenham *et al*., 1991)

المواد وطرق البحث Materials and methods

جمع العينات

جمعت العينات من عدد عشرة مخازن متفرقة بمدينة مصراته .

استخلاص السموم

استخلص الافلاتوكسين والزيرالينون بإضافة 25 مل ميثانول 70% الى كأس يحتوي على 5 جرام من حبوب الشعير المطحونة جيدا. رج الخليط على جهاز هزاز لمدة 15 دقيقة، رشح المستخلص بورق الترشيح Whatman No1 (Patey *et al*; 1989).

استخلص الاوكراتوكسين بإضافة 5 مل من محلول بيكربونات الصوديوم (0.13 مولاري) و20 مل ميثانول 25% الى كاس يحتوي على 5 جرام من حبوب الشعير المطحونة جيدا. رج الخليط على جهاز هزاز لمدة 15 دقيقة. رشح المستخلص بورق الترشيح Whatman No1 (Alcaide and Aguilar., 2008; Zheng *et al*; 2005).

عزل وتركيز السموم

عزل سموم الافلا بإضافة 5 مل من راشح حبوب الشعير المطحونة الى كأس به 15 مل من الماء المقطر. مرر الخليط خلال عمود التجاذب المناعي (Immunoaffinity Column). غسل العمود بتمرير 10مل من الماء المقطر. لإزالة السم من العمود مرر 0.5 مل من الميثانول بتركيز 99.9%. استقبل المحلول في كأس صغير.

عزل الاوكراتوكسين باضافة 15 مل راشح حبوب الشعير المطحونة الي كأس به 5 مل من محلول الفوسفات الملحي (0.55 جرام من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين (NaH_2PO_4) مع 2.85 جرام من فوسفات الصوديوم الهيدروجينية (Na_2HPO_4) و9 جرام من كلوريد الصوديوم ($NaCl$) في لتر ماء مقطر). مرر الخليط خلال عمود التجاذب المناعي. غسل العمود بتمرير 10 مل من محلول الفوسفات

الملحي مع الميثانول بنسبة 10 / 90. ازيل الاوكراتوكسين بتمرير 1 مل ميثانول 99.9 % خلال العمود. استقبل في كأس صغير، وأخذ منه 100 ميكروليتر واضف الى كأس به 2.9 µ من بيكربونات الصوديوم.

لعزل الزيرالينون اضيف 5 مل من راشح حبوب الشعير المطحونة الى كأس به 15 مل من الماء المقطر. مرر الخليط خلال عمود التجاذب المناعي (Immunoaffinity Column). غسل العمود بتمرير 10 مل من الماء المقطر. عزل الزيرالينون بتمرير 0.5 مل ميثانول بتركيز 99.9% خلال العمود. استقبل في كأس صغير.

تقدير السموم الفطرية

تم تقدير السموم الفطرية لعينات حبوب الشعير باستخدام تقنية الربط المناعي (ELISA) بمختبر السموم الفطرية لمركز الرقابة على الأغذية والأدوية فرع مصراته. أجريت عملية تقدير لكل من الافلاتوكسين والاوكراتوكسين والزيرالينون بكواشف مصنعة من شرك ة R-Biopharm وهي RIDASCREEN® Aflatoxin Total، RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15، RIDASCREEN® Zearalenon، على التوالي تبعا للطريقة الموصي بها لكل كاشف.

النتائج Results

تم الكشف عن جميع السموم الفطرية المختبرة (الأفلا – الأوكرا – الزيرالينون) وتحديد تركيزها لعينات الشعير المختبرة لعدد عشرة مخازن بعدة مناطق بمدينة مصراتة باستخدام تقنية انزيم الربط المناعي (ELISA). حيث تشير النتائج عند الكشف عن السموم الفطرية في عينات الشعير جدول (1) الى تواجد كل من السم الفطري الأفلا و الأوكرا A في عينات الشعير بجميع أماكن اخذ عينات الشعير وسجلت أعلى نسبة تواجد لسم الأفلا في عينة الشعير من مخازن زاوية المحجوب (A6) حيث بلغت 4.83 µg/kg في حين سجلت عينة الشعير من مخزن منطقة الحامية (A9) أعلى نسبة تواجد للسم الفطري الأوكرا A حيث بلغت 3.52 µg/kg. كما يلاحظ من الجدول ان جميع عينات الشعير سجلت تواجد لسم الأفلا بنسبة أعلى من تواجد سم الأوكرا A في عينات الشعير. وان جميع عينات الشعير سجلت تواجد لكل من السم الفطري الأفلا والأوكرا A بنسب أقل من الحدود المسموح بها محلياً والتي حددتها المواصفات القياسية الليبية لعينات الشعير وأقل من الحدود المسموح بها بالمواصفات القياسية الأوروبية. وتشير النتائج كذلك ان جميع عينات الشعير لم تسجل اي تواجد للسم الفطري الزيرالينون عند حد الكشف الموصي به باستخدام تقنية انزيم الربط المناعي (ELISA).

المناقشة Discussion

النتائج المتحصل عليها بالدراسة عند تقدير السم الفطري الأفلا لعينات الشعير تتفق مع الدراسة التي اجريت على حبوب القمح المستورد المجمعة من أسواق مدينة مصراتة حيث اظهرت أن أعلى نسبة للأفلاتوكسين كانت ppb3.2 و أقل نسبة للأفلاتوكسين كانت ppb1.5 وهذا مطابق للمواصفة القياسية الليبية رقم 597 الخاصة بالحدود القصوى للسموم الفطرية (الأفلاتوكسين) في الأغذية والأعلاف التى حددت الحد الأقصى المسموح به لتواجد

الافلاتوكسين الكلي في الحبوب ومنتجاتها حوالي ppb4 وتعزي هذه الى ان حبوب القمح المستورد من الخارج مرت بعملية تحليل قبل دخولها البلاد من مركز الرقابة على الأغذية والأدوية وايضا السبب التالي يعزي الى ان الحبوب مخزنة بصورة جيدة ولم تتعرض للظروف تخزين غير جيدة كارتفاع درجات الحرارة والرطوبة لأن هذه العوامل من الأسباب الرئيسية لنمو الفطريات المنتجة للسموم الفطرية (الحداد و الرمالي، 2016).

تختلف الدراسة مع الدراسة التي اجريت بدولة العراق عند الكشف عن سموم الأفلا في الذرة باستخدام تقنية الاليزا حيث تشير نتائج الدراسة الى تواجد سم الأفلا بعينات الذرة بمعدل أعلى من الحدود المسموح بها من منظمة الصحة العالمية (عبد والراوي، 2011).

والنتائج المتحصل عليها بالدراسة عند تقدير السم الفطري الأوكرا في عينات الشعير تتشابه مع الدراسة التي أجريت في دولة تونس سنة 2008 علي عدد 206 عينة شملت التوابل، والفواكة المجففة، الأرز، والذرة، حيت تراوح متوسط تركيز الأوكراتوكسين بها 3.5 ميكروجرام /كيلوجرام(Ghali *et al.*, 2008). ولقد أظهرت دراسة اخرى عن وجود سموم الاوكراتوكسينات في سلع وأعلاف مختلفة شملت عينات من القمح والشعير والذرة و الشوفان والشيلم دول أوروبا كالدانمارك و أميركا حيت أدت الي إصابة حيوانات المزرعة كالخنازير مسببة خسائر اقتصادية فادحة (محمد، 2008).

عدم وجود سم الزيرالينون ربما يرجع الى ان السم الفطري الزيرالينون في الغالب يفرز على المحاصيل الزيتية عن طريق فطر Fusarium ويفرز في درجات الحرارة المنخفضة.

جدول(1): تقدير سموم الأفلا والأوكرا والزيرالينون في عينات الشعير باستخدام تقنية ELISA

عينات الشعير/مصراتة	تقدير السم الفطري لعينات الشعير/ مصراتة µg/kg		
	الزيرالينون	الأوكراتوكسين	الأفلاتوكسين
A1	-	1.73	3.14
A2	-	2.58	3.49
A3	-	1.67	2.79
A4	-	1.57	2.43
A5	-	<0.05	3.69
A6	-	2.14	4.83
A7	-	1.83	3.26
A8	-	1.23	2.30
A9	-	3.52	4.01
A10	-	1.71	3.50

العينات	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
مكانها	**الحامية**	**الحامية**	**الكراريم**	**الكراريم**	**طمينة**	**الزاوية**	**الغيران**	**الغيران**	**الحامية**	**الميناء**

التوصيات Recommendations

تكمن أهمية الحبوب في كونها المصدر الرئيسي للغذاء ومن خلال النتائج المتحصل عليها لمعرفة مدى جودة التخزين لهذه الحبوب عن طريق الكشف عن السموم الفطرية حيث ان التلوث بالفطريات له اضرار خطيرة في حال تم افراز السموم الفطرية في هذه الحبوب وتم استهلاكه من قبل الانسان او الحيوان لذلك نوصي بما يلي :

1. مراعاة التخزين الجيد للحبوب بجميع أنواعها من خلال وجود تهوية جيدة مناسبة والمحافظة عليها من الرطوبة ومراعاة فترة التخزين الموصي بها لكل سلعة عند درجات حرارة المناسبة.
2. الاهتمام بدراسة الفطريات المنتجة للسموم الفطرية ومن بينها الأنواع الفطرية التابعة للجنس Pencillium و Aspergillus والتي تكون مسئولة على افراز السموم الفطرية أثناء فترة التخزين.
3. عمل دراسات مسحية على التلوث الفطري للأغذية خاصة الحبوب ومدى انتشار السموم الفطرية بها باستخدام التقنيات الحديثة للكشف عن السموم الفطرية مثل استخدام تقنية HPLC و ELISA.
4. يجب نشر الوعي بين المستهلكين بخطورة التلوث الفطري والسموم الفطرية لتجنب السلع الملوثة.

المراجع References

- **المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية (2013).**الحدود القصوى للسموم الفطرية (الافلاتوكسين) في الاغذية، الاصدار الاول م .م. ق .ل /57-1.
- **المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية (2013).**الحدود القصوى للسموم الفطرية (الاوكراتوكسين) في الاغذية، الاصدار الاول م .م. ق .ل /57-1.
- **المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية (2013).**الحدود القصوى للسموم الفطرية (الزيرالينون) في الاغذية، الاصدار الاول م .م. ق .ل /57-1.
- **الهيتي، اياد عبدالواحد (1977).** الفطريات التي تهاجم حاصل الذرة الصفراء في المخازن ، تشخيصها، تأثيرها، مقاومتها، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
- **محمد، عطا محمد (2008).** السموم والتسممات الفطرية، مقالة، المكتبة الأكاديمية، القاهرة.

- **عبد، علي ؛ الراوي، علي (2011).** الكشف عن تلوث الفشار بسموم الأفلا باستخدام اختبار التجادب المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA **.........**
- **نخيلان، عبدالعزيز. مجيد (2011).** السموم الفطرية، دار دجلة للنشر والتوزيع، الطبعة الاولى .
- **Alcaide, F. J. and Aguilar, S. A. (2008).** Validation Study of Immunochemical ELISA assay for Ochratoxin –A quantification in dessrt wines from sun-dried grapes. V:23. P:53-60.
- **Charoenponsook and Kavisarasai. (2014.).** Determination of aflatoxin B1 in food product in the Thailand. academic journal V:13. P: 4761 – 4765 .
- **Gareis, M and Scheuer, R(2013).** Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. Food Add it. Contam., 17, 799-808.
- **Ghali, R. K. Hmaissia, K. Ghorbel, H. Maarofi, and Hedii, K. H (2008).** HPLC determination of mycotoxin in high consumption tunissia foods. *Journal of Food Control* V :19. P: 716-720.
- **Ghali, R. I. Belonaerb, S. Hdiri, H. Ghorbel, K. Maarofi and Hedii, A (2009).** Simultaneous HPLC determination of Aflatoxins B1. B2, G1, and G2 in Tunisia Sorghum and Pistachios. *Journaln of Food Composition and Analysis* V: 22, P: 751-755.
- **Mirocha, J. C. C. G. Mackintosh. U. A. Mirza. W. Y. Xle. and J. Chen.(1992**). Occurrence of Fumonisin in forage grass in Newzealand App. & Environ. Micr. P.3196 – 3198.
- **Nelson , G. ; menza W. ; muturi , M. ; Margaret ; kamau and Lucy, M .(2015**). Incidence Types and levels of aflatoxin in different peanuts varieties produced in Busia and Kisii central Districts , Kenya , open journal of medical microbiology. V:5. P:209 -221.
- **Patey, A. L. ; Sharman, M. ; Wood, R. ;Gilbert, J. (1989)** Determination of aflatoxin Concentrations in Peanut butter by Enzyme-Linked immune sorbent assay (ELISA) Study of three commercial ELISA kits, Journal – Association of Official Analytical Chemists 72(6) P: 965 -969 , Norwich, U.K .
- **Sydenham, E. W. G. S. Shephard, P. G. Thiel. W.F.O. Marasas and S. Stochenstrom (1991).** Fumonisin contamination of commercial corn based human food stuffs. J. Agric. Food Chem. V: 39. P :2014 – 2018

- **Van Der Merwe, K, J. Steyn, P, S and Fourie, L., Saeger, S (1965).** Mycotoxin. Part 2. The constution of ochratoxin A, B, and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. J. Chem. P: 7083-7088.
- **Wiese, M. V. (1987).** Compendium of Wheat Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. P:112.
- **Zheng, Z. Hanneken, J. Houchins, D. King, R. S. Lee, P. and Richard, J. L. (2005).** Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, V:2. P:265-272.
- **Zinedine, A. C. Brera, S. Elakhadari, C. Catano, F. Debenqch, S. A. Ngilina, B. Desantis, M. Faid, M. Benlemlih, V. Minarglia, M.(2006).** Nutural occurrence of mycotoxins in cereals and spice commercialzed in Marocco. Journal of Food Control. V:17. P:868-874.