------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 1، ص19-25، 2006 ------

التواجد الطبيعي للفطريات في الحليب المجفف وخاصة المنتجة للافلاتوكسينات

ايثم سعدي الدباغ
فرع الصحة العامة
كلية الطب البيطري
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2003/1/11 ؛ تاريخ القبول 2003/6/8)

الملخص

أوضحت نتائج عزل الفطريات المتواجدة في 100 عينة حليب مجفف للأطفال وللكبار تم شرائها من الأسواق المحلية في مدينة الموصل خلال الفترة الواقعة بين شهر حزيران 2002 ولغاية شهر تشرين الأول 2002 وجود الفطريات *Aspergillus spp* و *Penicillium spp* بنسبة 41.42 % و47.14 % في حليب الأطفال وبنسبة 31.75 % و 55.55 % في حليب الكبار وعلى التوالي وبنسبة اقل للفطريات *Cladosporium herbarum* و *Geotrichium spp* و *Rhizopus stolonifer* و *Scopulariopsis spp* كما شكل فطر *Aspergillus flavus* أعلى نسبة بين أنواع جنس *Aspergillus* وكانت بنسبة 22.86% في حليب الأطفال وبنسبة 14.29% في حليب الكبار . كما أظهرت الدراسة أن سموم الافلا أنتجت من قبل (6) عزلات لفطر *A. flavus* (37.5%) في حليب الأطفال و (2) عزلات لفطر *A.flavus* (22.2%) في حليب الكبار وكانت كمية سموم الافلا B1 في حليب الأطفال والكبار (18) و(16) جزء بالبليون وعلى التوالي .

Incidence of Fungal Flora in Powdered Milk with Special Emphasis to Producing Aflatoxin

Aytham S. Al- Dabbagh
Department of Veterinary Public Health
College of Veterinary Medicine
Mosul University

ABSTRACT

Mycological investigation of (100) samples of powdered milk collected from different food stores in Mosul city. During the period from June 2002 to October 2002, reviled that *Aspergillus spp*., and *Penicillium spp* were occurred at the concentration of

41.42 %, 47.14% for the Infant milk and 31.75 %, 55.55 % for the Adult milk respectively. To a lower order were *Cladosporium herbarum, Geotrichium spp, Rhizopus stolonifer , Scopulariopsis spp . Aspergillus flavus* was occurred at a rate of 22.86 % and 14.29 % in infant and adult milk samples respectively. Aflatoxin were detected in (6) *A.flavus* isolates (37.5 %) infant milk and in (2) *A.flavus* isolates (22.2 %) in adult milk samples. Aflatoxin B1 was estimated to be 18 ppb and 16 ppb in infant and adult milk *A.flavus* isolates and aflatoxins produced by them were discussed.

المقدمة

تعد الفطريات واحدة من أهم مشاكل التلوث البيئي الغذائي في وقتنا الحاضر لانتشارها الواسع في الطبيعة ملوثة الهواء و الماء والتربة بالإضافة إلى المحاصيل الزراعية والمنتوجات الحيوانية التي تدخل كجزء في غذاء الإنسان (Jarvis et al., 1983) مشكلةً بذلك تهديدا جديا لصحة الإنسان من جراء استهلاكه السموم التي تنتجها بعض الفطريات خلال السلسلة الغذائية (Hsieh , 1981) .

وتعتبر سموم الافلا B1 و B2 من المئيضات الثانوية التي تنتجها فطريات*Aspergillus flavus* وسموم G1 و G2 و M1 التي تنتجها فطريات *Aspergillus parasiticus* (Frobish et al., 1986) كما ويمكن أن تتواجد سموم M1 في حليب الأبقار المستهلكة لسموم الافلا B1 في أعلافها (Vanegmond, 1989) وتعتبر مشكلة تلوث الحليب الخام بالفطريات شائعة (Yaseen, 2002; Sabreen and Haleem , 200), ومنها الفطريات المنتجة للسموم الفطرية *A.flavus* (Correa et al., 1997) و يعتبر خزن الحليب المجفف تحت ظروف مختلفة من حرارة ورطوبة قد يؤدي إلى نمو بعض الفطريات (Manosur et al., 1989) ومنها المنتجة لسموم الافلا (Van walbeek et al., 1986) .

ونظرا لأهمية الحليب المجفف كمنتوج غذائي حيواني حيث يدخل ضمن مفردات البطاقة التموينية لأفراد الأسرة العراقية ومنهم الأطفال, تمت الدراسة للتعرف على أعداد وأنواع الفطريات خاصة المنتجة لسموم الافلا والملوثة للحليب المجفف .

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات : تم جمع (100) عينة من الحليب المجفف الصالحة للاستهلاك بواقع (50) عينة حليب أطفال (50) حليب كبار من السوق المحلية لمدينة الموصل للفترة الواقعة بين شهر حزيران 2002 ولغاية شهر تشرين الأول 2002 .

2- زرع العينات : اتبعت طريقة (Pitt and Hocking , 1997) في عمل التخافيف للحليب المجفف وذلك بأخذ 10 غم من الحليب المجفف وأضيف أليها 90مل من 0.1% ببتون (Kurtzman et al ., 1971) وتم عمل عدة تخافيف ثم مباشرة نقل 0.1 مل على وسط الدايكلوران 18% كلسيرول 18 % Glycerol (DG 18%) Dichloran ثم تم فرشها بواسطة ناشر زجاجي معقم, وحضنت الأوساط

تحت درجة 25 م لمدة 5 أيام . حسبت أعداد المستعمرات CFU في الأطباق التي أظهرت لحد 40 مستعمرة, وشخصت الفطريات المعزولة بالاعتماد على المفـاتيح التـصنيفية (Pitt and Hocking , 1997).

3- الكشف عن الفطريـات المنتجـة لـسموم الافـلا : اسـتخدم الوسـط *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (King et al., 1986) وذلك بإعطاء اللون الأصفر البرتقالي على ظهر الوسط بعد حضن الوسط مدة 42-48 ساعة تحت درجة حرارة 30 م .

4- تقدير سموم الافلا : تم تنمية عترات *A.flavus* المنتجة لسموم الافلا المعزولة من الحليب المجفـف على الرز وكما هو متبع في طريقة (Shot well et al., 1966) حيث نقع 100 غـم رز فـي دورق زجاجي لمدة 5 دقائق ثم تم تعقيم الرز في جهاز المؤصدة وتم نقل سبورات الاعفان المعزولـة إلـى الدورق الحاوي على الرز المعقم ثم وضع في حاضنة هزازة بمعدل (60 هزة في الدقيقـة) وتحـت درجة حرارة 27 م ولمدة أسبوع ونقل الرز الحاوي على العفن النامي إلى المؤصدة علـى درجـة 115 م ولمدة 10 دقائق فقط للقضاء على العفن ثم جفف الرز وطحن على شكل مسحوق ناعم . تـم تقدير سموم الافلا بالطريقة المحورة من قبل (Wiseman et al., 1967) حيث تم تحديد بقـع سـموم الافلا على صفائح السليكا جل(بسمك 0.02 ملم Merck) بالمقارنـة مـع سـموم الافـلا القياسـية (السويسرية fluka) بعد قشطها وإذابتها بالميثانول ثم قياسها بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 420 و 362 نانوميتر. والحساب بالقانون التالي :

$$\text{Ug Aflatoxin 5 ml} = D.M10^{6}/E*2000*0.2*10*L$$

D = الكثافة الضوئية المحددة M = الوزن ألجزيئي لسموم الافلا

E = معامل الامتصاص L = سمك الخلية (ملم)

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج هذه الدراسة أن هناك أنواع عديدة من الفطريات تتواجد في الحليب المجفف حيـث تراوح معدل العدد الكلي لتواجد الفطريات لكل غرام (14) في حليب الأطفال و(12.6) في حليب الكبار وشملت (6) أجناس و(9) أنواع من الفطريات الخيطية وكان جنسي *Aspergillus* , *Penicillium* هـما السائدان بنسبة 41.42 % , 47.14 % حيث تم عزلهما من (18) و(7) عينة حليب أطفال مجفف وبنـسبة 31.75 % و 55.55 % تم عزلهما من (16) و(6) عينة حليب كبار مجفف على التوالي. وكمـا شـكلت فطريات *A.flavus* أعلى نسبة من بين فطريات *Aspergillus* وكانت بنسبة 22.86 % تم عزلهمـا مـن (11) عينة حليب أطفال مجفف وبنسبة 14.29 % تم عزلهما من (7) عينة حليب كبار مجفف, وفطريـات *A.fumigatis* و *A.niga* بنسبة 14.28 % و 4.28 % في حليب الأطفال المجفف وبنسبة 9.52 % و 1.59 % في حليب الكبار المجفف , وتم عزل فطريات *A. Ochraceus* بنسبة 6.35 % فـي حليـب

الكبار المجفف.والفطريات الأخرى التي عزلت هي من جنسي *Geotrichium* بنسبة 12.69 % و 2.86 % في حليب الأطفال والكبار المجفف على التوالي . كما عزلت من حليب الأطفال المجفـف الفطريـات *Cladosporium herbarium* 2.86 % *Rhizopus stolonifer* 1.44 % و *Scopulayiopsis* 4.28 % (الجدول 1).

الجدول 1: الفطريات المعزولة من حليب الأطفال والكبار المجفف وعدد المستعمرات والعينات المعـزول منها

الفطريات	حليب أطفال مجفف			حليب كبار مجفف		
	عدد المستعمرات	التكرار %	عدد العينات المعزول منها	عدد المستعمرات	التكرار %	عدد العينات المعزول منها
Aspergillus flavus	160	22.86	11	90	14.29	7
A. fumigates	30	4.28	3	10	1.59	1
A. nigar	100	14.28	4	60	9.52	7
A. ochraceus	-	-	-	40	6.35	1
Cladosporium herbarium	20	2.86	1	-	-	-
Geotrichium spp	20	2.86	2	80	12.69	2
Penicillium spp	330	47.14	7	350	55.55	6
Rhizopus stolonifer	10	1.44	1	-	-	-
Scopulariopsis spp	30	4.28	3	-	-	-
المجموع	700	100	32	630	100	24

أن اغلب هذه الفطريات قد تم عزلها من الحليب الخام حيث عزل (19) نوع مـن الفطريـات مـن ضمنها (6) أنواع سائدة تعود لجنس *Aspergillus* و *Geotrichium* و *Penicillium* عزلت مـن (39) عينة من مجموع (270) عينات حليب خام (Skrinjar et al., 1995) .

ويعتبر الحليب من المنتوجات الغذائية التي تنمو عليها هذه الفطريات لتوفر الظروف الملائمة لنمـو الفطريات ومنها الحرارة, الرطوبة، درجة الحموضة pH وتغذية ونسبة الأوكسجين وفعالية المـاء (aw) (Pitt and Hocking, 1997) وعلى الرغم من أن الحليب المجفف اقل منتوجات الحليب تلوثا بالفطريات مقارنة بالقشدة والاجبان (Abouzeid et al., 1996) الانه نتيجة لاختلاف القياسات الصحية من بلد إلـى أخر واختلاف نوع الحليب الخام المصنع وطريقة معاملته بالحرارة الجافة والرطبة أثناء مراحـل عمليـة التصنيع والإنتاج والتعبئة بالإضافة إلى طرق النقل والخزن (Bullerman, 1979) .

فان وجود فطريات في الحليب المجفف يمكن أن يحدث حتى لو أفرغت الأكيـاس أو العلـب مـن الهواء وكان هنالك نسبة أوكسجين 0.5% وهذا يعطي دلالة كبيرة على أصحية وجـود الفطريـات فـي

الحليب حتى لو كانت نسبة الأوكسجين قليلة جدا (Hesseltine et al., 1985) . فوجود فطر *A.flavus* و *Penicillium* بصورة سائدة وعالية في حليب الأطفال والكبار المجفف (جدول 1) دلالة على سوء خزن هذه المنتوجات وليس نتيجة تلوث أولـي للحليـب الخـام (Skrinjar et al., 1983) ووجـود فطريـات *Cladosporium* و *Rhizopus* بنسب قليلة دلالة على أن الحليب مجفف حيث أن هذه الفطريات تنمو في مستوى فعالية ماء (a w) اقل من (0.9) (Pitt, 1975).

فقد تم عزل فطريات من أجناس *Aspergillus* و *Cladosporium* و *Penicillium* و *Rhizopus* من قبل (Elgohary, 1996; Manosur et al., 1989) من 75 و 455 عينة شملت (14)(22) نـوع مـن الإضافات والمنتوجات الغذائية على التوالي ومن قبل (Ismail and Saad, 1997) من 50 عينـة حليـب مجفف تم عزل فطريات من أجنـاس *Alternaria* و *Aspergillus* و *Emexicella* و *Fusarium* و *Penicillium* وجود فطريات *Geotrichium* فيعني وجود تلوث في مكائن تصنيع معامل الالبان الـذي صنع فيه الحليب المجفف (Eisenberg and Cichowicz, 1997) أن اغلـب أجنـاس هـذه الفطريـات المذكورة أعلاه تشكل ضررا لصحة الإنسان خاصة الأطفال من خلال السموم الفطرية التي تنتجها فوجود *A. fumigates* في الحليب المجفف قد يؤدي إلى حدوث حالات سريرية للأطفال مثل الربو (Austwick, 1965) ووجود فطر *A. flavus* قد يؤدي إلى أنتاج سموم الافلا خلال خزنه بتوفر درجة الحرارة المثلى 27 م (Applebaum et al., 1982) فقد قام (Elgohary, 1996) بعزل فطر *A. flavus* المنـتج لـسموم الافلا بنسبة 6.6 % من الحليب المجفف .

وأشارت نتائج هذه الدراسة أن (37.5 %) من الفطر *A. flavus* منتجة لسموم الافلا عزلت من (6) عينات حليب أطفال مجفف وان (22.2 %) عزلت من (2) عينات حليب كبار مجفف (الجدول 2).

الجدول 2: سموم الافلا المنتجه من قبل عازلات فطر *A.flavus* المعزولة من الحليب المجفف

حليب الأطفال المجفف			سموم الافلا (جزء بالبليون ppb)						
المعزولة	المنتجة	المنتجة %	B1	28	8	10	45	11	6
16	6	37.5	B2	0	0	0	0	0	0
حليب الكبار المجفف			سموم الافلا (جزء بالبليون ppb)						
المعزولة	المنتجة	المنتجة %	B1	12	20	-	-	-	-
9	2	22.2	B2	0	0	-	-	-	-

وهي نتيجة مقارنة لما وجده (saad and Zaky, 1995) في دراستهم عن حليب الأطفال المجفف فقد عزل *A. flavus* المنتجة لسموم الافلا بنسبة 33.3 % .

ولقد تراوحت مقدار سموم الافلا B1 بين (6-45) وبمعدل (18) جـزء بـالبليون لـ ـ (6) عتـر *A.flavus* المعزولة من حليب الأطفال وبين (12-20) وبمعدل (16) جزء بـالبليون لـ ـ (2) *A. flavus* المعزولة من حليب الكبار المجفف (جدول 2), حيث تعتبر هذه السموم من المئيـضات العاليـة ألـسميه والتي تؤدي إلى حدوث تأثيرات سرطانية وتشوهات خلقية في الإنسان (Oisen et al., 1988) وعلما أن الحد المسموح لتواجد سموم الافلا في منتجات الحليب كما ورد في دائرة الغذاء والـدواء FDA هـو 5. جزء بالبليون (George, 1989) .

وهكذا بينت هذه الدراسة أن تلوثا في الحليب المجفف بالفطريات خاصة المنتجة لسموم الافلا فـي حليب الأطفال أكثر مقارنة بحليب الكبار المجفف خلال الإنتاج والتصنيع , فيجب عمل الجهـود لتـوفير حليب مجفف صحي وتوفير ظروف صحية للخزن بخزن الحليب المجفف بأكيـاس محـورة غازيـا أي تحتوي على نسبة CO_2 أكثر من 60% وتخزن بدرجة حرارة اقل من 4 م (Hesseltine et al., 1985) وبالإضافة إلى الاهتمام بالتحليل الدوري لمنتجات الحليب ومنها الحليب المجفف .

المصادر الأجنبية

Abouzeid, A.M., Hassan, A.A. and. Ragheb, R.R., 1996. Mycological studies on hard (Roume) and skim milk soft cheese (Kareish) with quantitative evaluation of the existing Mycotoxins. Vet. Med. J.Giza. 44. pp.113-121.

Applebaum, R.S., Brakett, R.E., Wieserman, D.W. and Marth, E.H., 1982. Response of Dairy cows to dietary Aflatoxin feed in take and yield, toxic content and quality of milk of cows treated with pure and impure Aflatoxin. J.Dairy Sci. 65:pp.1503-1508.

Austwick, P.K.C., 1965. Pathogenicty. In The Genus Aspergillus, byk. B. Raper and D.I.Fennell. Baltimore: Williams and Wilkins pp.82-126.

Bullerman, L.B., 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health J.Food port. 42: pp.65-86.

Correa, B., Glhardo, M., Costa, E.O. and Sabino, M., 1997. Distribution of molds aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk . Rev.Microbiol.28: pp.279-283.

Elgohary, A.H., 1996. Aflatoxin in some food stuffs with special Reference to public Health Hazard in EGYPT. Indian Journal of Animal Sciences. 66: pp.468-473.

Eisenberg W., Vand Cichowicz, S.M., 1977. Machinery mold–indicator organism in Food. Food Tech. nol.31: pp.52-56.

Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain .J.Food Port. 49: pp.781-785.

George, C., 1989. Actions and interactions of alfatoxin in animal feed,regulatory review.Veterinary and Human Toxicology. 31: pp.603-606.

Hesseltine, C.W., Featherston, C.l., Lombard, G.L. and Dowell, V.R., 1985. Anaerobic growth of molds isolated from Fermentation starters used foods in Asian Countries Mycologia 77: pp.390-400.

Hsieh, P.H., 1981. Metabolisim and transmission of mycotoxins Proc. Of the Int. workshop symp.on mycotoxins, pp.151-165.

Ismail, M.A. and saad, N.M., 1997. Studies on the mycological quality of milk powder, J.Food Sci.34: pp.488-493.

Jarvis, B., seiler, D.A.L., ould, A.J.L. and williams, A.P., 1983. Observation on the enumeration of moulds in Foods and Feeding Stuffs.J.Appl.Bacteriol.55:pp325-336.

King, A.D.Jr., Pitt, J.I. and Beuchat, L.I., 1986. Method for the mycological Examination of Food. 2nd ed. Plenum press, new york, U.S.A.

Kurtuzaman, C.P., Rogers, R. and hesseltine, C.W., 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. Appl.Microbiol.21: pp.870-874.

Mansour, N., Darwish and Eldaly, E., 1989. Mycological contamination of some meat additive Vet.Med., J.Giza .37: pp.5-32.

Oisen, J.H., dragest, L and Autrup, H., 1988. Cancer risk and occpational exposure to alfatoxin in Denmark .Br.J.cancer.58: pp.392-396.

Pitt, J.I., 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin In water Relations of Foods, ed/R.B. Duckworth. London: Academic press, pp.273-307.

Pitt, J.I. and Hocking., 1997. Fungi and food spoilage.Blackie Academic and professional .London, U.K. 593 p.

Saad, N.M and Zaki, Z.M., 1995. incidence of alfatoxigenic Molds and alfatoxins in infants milk powder. Assiut Vet. Med.J.32(64): pp.157-163.

Sabareen, M.S. and Haleem, A.A., 2000.Microbiological Evaluation of Sheeps and Goats milk in Assiut Government. Assiut Vet.Med.J.42: pp.36-46.

Shotwell, D.L., Hessitine, C.W., Stubble field, R.D. and Sovenson, W.G., 1966. production of alfatoxin on rice. Appl Microbiol .14: pp.425-428.

Skrinjar, M., Dane, V.M. and Dimic, G.,1995.Investigation on the presence of Toxogenic fungi and alfatoxins in raw milk . Acta Alimentaria.24(4): pp.395-402.

Skrinjar, M., Zakula, R. and Stojanovic, E., 1983. Isolation and determination of moulds in raw milk Mijekerstvo 33: pp.227-230.

Van Egmond, H.P., 1989. Alfatoxin M1:occurrence toxicity, regulation in mycotoxins in Dairy products, ed.H.P.Vanegmond London:Elsevier Applied science. pp.11-55.

Van Walbeek, W., Scott, P.M. and Thatcher, F.S, 1986. Mycotoxins from food borne fungi and J.Microbiol.14: pp.131-137.

Wiseman, H.G., Jacobson, W.C. and Hermeyer, W.C., 1967. Note on removal of pigments from chloroform extract of alfatoxin culture with copper carbonate. J. Assoc. off chem.50: pp.982-983.

Yassen, H.A.L., 2002. Microbiological Evaluation of Cows and buffalos milk in Basrah..Bas.J.Vet.Res.1: pp.9-13.