نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ص. ۹-۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 9, No. 1, Spring 2013, p. 1-9

مطالعه آلودگی کشمش‌های تولیدی در استان خراسان رضوی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین

المیرا حقیقی[۱]- معصومه مهربان[۲*]- سید علی مرتضوی[۳]- محبوبه سرابی جماب[۴]- ریحانه نوربخش[۵]- محمد آرمین[۶]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۳

چکیده

هدف از این پژوهش مطالعه آلودگی کشمش‌های تولیدی در استان خراسان رضوی به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و تعیین میزان آفلاتوکسین در آن‌ها بود. بدین منظور ۵۰ نمونه کشمش از ۵ شهر کاشمر، خلیل آباد، بردسکن، مشهد و قوچان (۱۰ نمونه از هر شهر) فراهم گردید. نتایج نشان داد که از ۵۰ نمونه کشمش مورد آزمایش ۶ نمونه (۱۲ درصد) فاقد آلودگی قارچی و ۴۴ نمونه (۸۸ درصد) آلودگی قارچی داشت. کمترین و بیشترین میزان آلودگی قارچی به ترتیب در نمونه‌های کشمش شهرهای قوچان و کاشمر مشاهده شد. بررسی قارچ‌های جداسازی‌شده از نمونه‌های آلوده زیر نور فرابنفش درمحیط کشت نارگیل آگار نشان داد که ۲۹ نمونه (۶۵/۹ درصد) تولیدکننده آفلاتوکسین و ۱۵ نمونه (۳۴/۰۹ درصد) فاقد توانایی تولید آفلاتوکسین هستند. حضور آفلاتوکسین در نمونه‌های کشمش دارای قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین با استفاده از روش کروماتوگرافی با کارآیی، بالا تأیید گردید، هر چند غلظت آفلاتوکسین در این نمونه‌ها کمتر از حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی ایران بود (۵ نانوگرم در گرم). هرچند با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که در حال حاضر خطر جدی سلامت عمومی جامعه را تهدید نمی‌کند، ولی با توجه به مصرف سرانه کشمش در کشور (۲۲ کیلوگرم در سال)، بهتر است این مساله به عنوان یک خطر در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: کشمش، آلودگی قارچی، قارچ‌های مولد آفلاتوکسین، خراسان رضوی

مقدمه

کشمش با نام علمی ویتیس وینیفرا[۷] از انواع خشکبار بوده و از خشک کردن میوه انگور حاصل می‌گردد. مصرف کشمش به صورت خام یا بعنوان یکی از اجزا تشکیل دهنده مواد غذایی جهت افزایش شیرینی و بهبود طعم بکار می‌رود. این فرآورده حاوی ترکیبات مغذی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۶۹).

خشکبار مهم‌ترین زیرمجموعه محصولات صادراتی غیر نفتی ایران است و بیش از نیمی از صادرات محصولات کشاورزی را تشکیل می‌دهد. ایران یکی از کشورهای عمده تولیدکننده کشمش و از صادرکنندگان این محصول می‌باشد به طوری که از نظر تولید و صادرات کشمش رتبه سوم را در جهان دارا می‌باشد (USDA, 2006, USDA, 2010). استان خراسان رضوی با سطح زیر کشت ۱۰۶۴۲ هکتار انگور آبی و ۲۳۳۲۲ هکتار انگور دیم از استان‌های مهم تولید کشمش در ایران است (دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۹). براساس آمار نامه سال ۸۶ سازمان جهاد کشاورزی، میزان تولید کشمش در کشور ۱۳۵۰۰۰ تن بوده که از این میزان سهم استان خراسان رضوی ۳۵۰۰۰ تن می‌باشد (دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۶).

کشمش با توجه به امکان آلودگی به انواع قارچها در مرحله قبل از برداشت، برداشت و فرآوری پس از آن و شرایط مساعد برای رشد آنها از جمله محصولاتی می‌باشد که مستعد تولید توکسین‌های قارچی است. آلودگی به مایکوتوکسین‌ها بویژه آفلاتوکسین علاوه بر خطراتی که از نظر بهداشت مواد غذایی برای مصرف کنندگان دارد، صادرات محصولات غذایی را همواره تهدید می‌نماید (USDA, 2006).

۱ و ۶- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
۲- استادیار گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاددانشگاهی
(*- نویسنده مسئول: Email: mehraban@acecr.ac.ir)
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی
۵- کارشناس اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی خراسان رضوی

7- *Vitis vinifera*

آفلاتوکسین‌ها بعنوان عوامل جهش‌زا، ناقص الخلقه زایی، سرطان‌زا و تضعیف‌کننده سیستم ایمنی، متابولیت ثانویه قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس[1]، آسپرژیلوس پارازیتیکوس[2]، آسپرژیلوس نومیوس[3]، آسپرژیلوس سودوتاماری[4]، آسپرژیلوس ژاوگینسیس[5]، آسپرژیلوس بومبیسیس[6]، آسپرژیلوس اوکراسئوروسوس[7] و امیریسلا ونزوئلانسیس[8] می‌باشند. چهار نوع آفلاتوکسین اصلی B_1،B_2،G_1و G_2 می باشند که B_1 سمی‌تر از سایر آفلاتوکسین‌ها است (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۰، Iamanaka *et al.*, 2007, Milanez *et al.*, 2002).

روش‌های مختلفی جهت تعیین مقدار آفلاتوکسین یا شناسایی قارچ‌های تولیدکننده آن مورد استفاده قرار می‌گیرند که شامل روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک[9]، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[10]، الایزا[11]، روش‌های مولکولی و استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی می‌باشند. بسیاری از این روش‌ها گرچه حساس، قابل اطمینان و کمی هستند ولی نیازمند استخراج با حلال، مهارت بالاو هزینه‌بر می‌باشند. از این رو می‌توان محیط کشت‌های اختصاصی را به عنوان روشی ساده جهت شناسایی قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین بکار برد (Abbas *et al.*, 2004).

Iamanaka و همکاران (۲۰۰۷) حضور آفلاتوکسین، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس را در ۴۳ نمونه کشمش سلطانی (۲۴ نمونه کشمش سلطانی سیاه و ۱۹ نمونه کشمش سلطانی سفید) وارداتی به برزیل را مورد بررسی قرار دادند. از ۱۰ ایزوله آسپرژیلوس فلاووس تولید کننده آفلاتوکسین B_1 و B_2 جداسازی شده، ۹ ایزوله آن از نمونه‌های کشمش سلطانی سفید و یک ایزوله از انجیر جداسازی شد اما آسپرژیلوس پارازیتیکوس در نمونه‌ها مشاهده نشد. نتایج نشان داد آفلاتوکسین B_1 در ۱۶ درصد از نمونه‌های کشمش سلطانی سفید وجود داشت که مقدار آن کمتر از ۲ نانوگرم در گرم گزارش شد.

القلیبی و شاتر (۲۰۰۴) آلودگی قارچی و میزان مایکوتوکسین‌ها را در ۶۰ نمونه از میوه‌های خشک یمن (کشمش، خرما و انجیر) مورد آزمایش قرار دادند. گونه‌های غالب جداسازی شده شامل آسپرژیلوس نایجر[12]، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس[13]، آسپرژیلوس اوکراسئوس[14]، پنی‌سیلیوم کریزوژنوم[15] و رایزوپوس استولونیفر[16] بود. همچنین نتایج نشان داد ۳۰ درصد از نمونه‌های کشمش آلوده به آفلاتوکسین B_1 بود و غلظت آن ۳۵۰-۱۳۰ نانوگرم در گرم گزارش گردید.

Macdonald و همکاران (۱۹۹۹) در آزمایشی که برای اندازه‌گیری اوکراتوکسین و آفلاتوکسین در چند واریته کشمش انجام دادند گزارش دادند که در تمامی واریته‌های کشمش میزان اوکراتوکسین بیش از ۰/۲ میکروگرم بر کیلوگرم می‌باشد این در حالی است که در هیچکدام از واریته‌ها آفلاتوکسینی یافت نشد.

Varga و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای که روی گروهی از مواد غذایی موجود در بازار مجارستان از جمله کشمش به منظور بررسی آلودگی مواد غذایی به توکسین‌های قارچی انجام دادند، کشمش را از آلوده‌ترین مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها گزارش نمودند و کشمش ایران را بعنوان آلوده‌ترین کشمش در بین نمونه‌های آزمایش شده معرفی کردند. این در حالی است که متاسفانه در ایران تحقیق جامعی در این خصوص صورت نگرفته است و حتی از میزان آلودگی انواع کشمش به قارچ‌های مولد توکسین در واریته‌های مختلف کشمش نیز اطلاعی در دسترس نمی‌باشد.

Romero و همکاران (۲۰۰۵) فلور کپکی کشمش را قبل و بعد از ضدعفونی کردن سطحی این محصول بررسی نمودند. بیشترین قارچ‌های ایزوله شده سویه‌های مختلف آسپرژیلوس بودند که حدود ۵۰/۲ درصد را به خود اختصاص داده بودند. البته این دانشمندان از روش‌های کلاسیک برای تشخیص کپک‌ها استفاده کردند.

Grigoryan و همکاران (۲۰۰۶) طی پژوهشی ۲۲ نمونه کشمش جمع آوری شده از کشور ارمنستان را از لحاظ فلور قارچی مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج به دست آمده، ۱۵ نمونه قارچ میکروسکوپی جداسازی و شناسایی شد که شامل ۵ جنس موکور، آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، تریکودرما و آلترناریا بود. در بین قارچ‌های جداسازی شده، آسپرژیلوس نایجر و موکور فلور غالب به حساب می‌آمدند. در برخی از نمونه‌های جداسازی شده میزان آلودگی با اسپورها بیشتر از ۱۰ cfu/gr بود. آنالیز مقایسه‌ای قارچ کشمش‌های ایرانی و تولیدات محلی ارمنستان نشان داد که آسپرژیلوس کربوناریوس بیشترین حضور (۶۲/۵ درصد) را در کشمش‌های ارمنی

1- *A. flavus*
2- *A. parasiticus*
3- *A. nomius*
4- *A. pseudotamarii*
5- *A. zhaoqingensis*
6- *A. bombycis*
7- *A. ochraceoroseus*
8- *Emericella venezuelensis*
9- Thin Layer Chromatography (TLC)
10- High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)
11- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
12- *A. niger*
13- *A. fumigatus*
14- *A. ochraceus*
15- *Penicillium chrysogenum*
16- *Rhizopus stolonifer*

دارد.

Zohri و همکاران (۱۹۹۳) فلور قارچی چند نمونه انجیر خشک، برگه زرد آلو، آلو و کشمش را از لحاظ فلور قارچی مورد بررسی قرار دادند. پس از آزمایشات میکروبی ۵۵ گونه میکروبی مربوط به ۲۳ خانواده جمع آوری شد. بیشترین قارچ‌های جداسازی شده از نمونه‌های مورد آزمایش شامل پنی‌سیلیوم کریزوژنوم، آسپرژیلوس نایجر، کلادوسپوریوم و آسپرژیلوس فلاووس بود. همچنین در این آزمایش نمونه‌های مختلف میوه خشک از لحاظ وجود مقادیر آفلاتوکسین، سیترینین، اکراتوکسین، پاتولینو زرالنون بوسیله کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی نمونه‌ها فقط اکراتوکسین یافت شد.

Iamanaka و همکاران (۲۰۰۵) در تحقیقی ۱۱۷ نمونه میوه خشک شامل کشمش سلطانی سفید، سلطانی سیاه، خرما، آلو، انجیر و زردآلو را از لحاظ وجود قارچ‌های توکسین‌زا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آزمایشات انجام شده وجود قارچ‌های مولد توکسین از جمله آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس را در کشمش سلطانی سفید و انجیر خشک تأیید کرد و همچنین از نظر میزان آلودگی به قارچ مولد اکراتوکسین، کشمش‌های مورد آزمایش بیشترین درصد آلودگی را به خود اختصاص داده بودند.

Magnoli و همکاران (۲۰۰۴) طی آزمایشاتی ۵۰ نمونه کشمش جمع‌آوری شده از نقاط مختلف آرژانتین را از لحاظ فلور قارچی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنالیز داده‌های این پژوهش نشان داد که *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین قارچ جداسازی شده از کشمش سیاه بود. طبق آزمایشات سم شناسی انجام شده روی نمونه‌ها در بیشتر آنها اوکراتوکسین یافت شد. آزمایشات نشان داد که این توکسین توسط آسپژیلوس کربوناریوس تولید شده است.

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آفلاتوکسین، هدف از انجام این پژوهش شناسایی قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین و تعیین غلظت آفلاتوکسین در چند نوع کشمش تولیدی در شهرهای خراسان رضوی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری به صورت نمونه‌برداری خوشه‌ای تصادفی[1] از شهرهای عمده تولید کننده کشمش در استان خراسان رضوی شامل کاشمر، خلیل آباد، بردسکن، مشهد و قوچان (هر شهر ۱۰ نمونه) انجام گردید (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۲). نیمی از نمونه‌ها گوگردی و بقیه بدون گوگرد بودند. نمونه‌های مربوط به شهرهای کاشمر، خلیل آباد، بردسکن و مشهد، کشمش سبز پیکامی بوده و نمونه‌های مربوط به شهر قوچان کشمش پلویی بودند. نمونه‌های خریداری شده در فروردین ماه ۱۳۸۸ تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری گردید.

جداسازی کپک‌ها

پس از تهیه محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[2] (مرک، آلمان) و آماده‌سازی نمونه طبق استاندارد ملی به شماره ۳۵۶ و تهیه رقت‌های لازم یک میلی‌لیتر از نمونه مورد آزمون درون پلیت استریل ریخته شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵). سپس ۱۲ میلی‌لیتر از محیط کشت مذکور با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه شد. محیط کشت و نمونه به خوبی مخلوط شده و تا جامد شدن روی سطح صاف و خنک قرار گرفت. پس از جامد شدن محیط پلیت‌ها بطور وارونه به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. در پایان دوره گرمخانه‌گذاری پرگنه‌های کپکی رشد یافته بر روی سطح محیط کشت شمرده شدند (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۴، Abbas *et al*., 2004).

خالص‌سازی قارچ‌ها

تعدادی از قارچ‌ها پس از شمارش توسط آنس سوزنی به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار که قبلا در پلیت استریل ریخته و سرد شده بود در ۴ نقطه انتقال داده شد و به مدت ۷-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید.

بررسی پتانسیل آفلاتوکسین‌زایی روی محیط کشت کوکونات آگار

تهیه محیط کشت کوکونات آگار

برای تهیه محیط کشت، روش Davis و همکاران (۱۹۸۷) به طور جزئی اصلاح شد. بدین صورت که ۱۰۰ گرم نارگیل رنده‌شده با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داغ به مدت ۵ دقیقه توسط مخلوط کن هموژن گردید و از ۴ لایه صافی پارچه‌ای فیلتر شد. سپس pH توسط سود ۲ نرمال روی ۷ تنظیم گردید. پس از آن به میزان ۲۰ گرم در لیتر آگار به آن افزوده شد، مخلوط حرارت دید تا جوش آمد. سپس تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد و مجددا pH بررسی گردید تا در صورت لزوم روی ۷ تنظیم شود. مخلوط حاصل به مدت ۱۸ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شد. پس از سرد شدن تا حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۰/۰۱ درصد کلرامفنیکل که قبلا توسط صافی سرنگی (شرکت اورنج ساینتیفیک[3]، بلژیک) استریل شده بود، به عنوان عامل

1- Clustered Random Sampling

2- Potato Dextrose Agar

3- Orange Scientific

عامل ممانعت‌کننده رشد باکتری‌ها اضافه گردید و در محدوده دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد همچنانکه هم‌زده می‌شد، در پلیت‌های استریل ریخته شد (Cutuli *et al.*, 1991).

کشت و مشاهده فلورسنس

قارچ‌های خالص رشد کرده روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار با استفاده از آنس سوزنی آغشته به آنها به مرکز پلیت حاوی محیط کشت کوکونات آگار تلقیح شد و به مدت ۵-۲ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. مشاهده هاله فلورسنس در اطراف پرگنه قارچها زیر نور فرابنفش در طول موج ۳۶۵ نانومتر نشانگر توانایی قارچها در تولید آفلاتوکسین است (Lemke *et al.*, 1988).

اندازه‌گیری آفلاتوکسین توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (شرکت سیکام[1]، آلمان)

نمونه‌های کشمش با ۱/۵ برابر وزن خود آب مخلوط شد و توسط دستگاه اسلاری[2] (اپندروف، آلمان) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه به شکل خمیری یکنواخت درآمد. جهت عمل استخراج ۷۵ گرم نمونه اسلاری شده (۳۰ گرم ماده خشک + ۴۵ گرم آب) با ۵ گرم نمک کلرید سدیم و ۱۲۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد کاملا مخلوط شده و توسط کاغذ صافی ۱۱۳/۱ واتمن صاف گردید. ۲۰ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده با ۱۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفاته (PBS) با pH=۷/۴ کاملا مخلوط و از کاغذ صافی GFF عبور داده شد و پس از آن ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول صاف شده از ستون ایمیونر برداشته و از ستون ایمونوآفینیتی عبور داده شد. در ستون آفلاتوکسین موجود در محلول صاف شده به آنتی آفلاتوکسین متصل می‌شود. سپس ۲ میلی‌لیتر حلال متانول و۲ میلی‌لیتر آب به این ستون اضافه گردید تا آفلاتوکسین از ستون خارج شود. سپس محلول حاصل در ظرفی جمع‌آوری شد و توسط همزن ورتکس هم زده شد. سپس محلول حاصل از صافی سر سرنگی ۰/۴۵ میکرمتر (میلی پور، فرانسه) عبور داده و محلول حاصل جهت تزریق به دستگاه آماده گردید.

جهت تعیین مقدار آفلاتوکسین از یک سیستم حلال ایزوکراتیک شامل ۶۰ میلی‌لیتر آب ، ۲۰ میلی‌لیتر متانول و ۲۰ میلی‌لیتر استونیتریل استفاده شدکه بر حسب نسبت تعریف شده در نرم افزار دستگاه، تنظیم شده و توسط پمپ با دبی جریان[3] مشخص وارد ستون گردید. ستون مورد استفاده برای آفلاتوکسین، حاوی ترکیبات سیلیکاته(Sio_2) بر پایه اکتا دسیل سیلان[4] به نام ستون C_{18} (جنسیس[5]، آمریکا) بود.

به منظور افزایش شدت فلورسنس، از مشتق سازی آفلاتوکسین با ید استفاده گردید. بدین ترتیب که ید و محلول خروجی ستون با هم مخلوط شده و وارد دتکتور شناسایی آفلاتوکسین از نوع فلورسنس گردید (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۰).

طرح آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، از طرح پایه کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C (نسخه ۱/۴۲، دانشگاه میشیگان) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان p=۰/۰۵ مقایسه شد. نمودارها بوسیله نرم‌افزار EXCEL (نسخه XP ۲۰۰۳، میکروسافت) رسم گردید.

نتایج و بحث

آلودگی قارچی نمونه‌های کشمش

از بین ۵۰ نمونه کشمش مورد آزمایش ۶ نمونه (۱۲ درصد) شامل ۵ نمونه کشمش گوگردی و یک نمونه غیرگوگردی همگی از شهر قوچان، فاقد آلودگی قارچی و ۴۴ نمونه (۸۸ درصد) آلودگی قارچی داشتند. با توجه به این که طبق استاندارد ملی شماره ۳۱۲۲ هیچگونه آلودگی قارچی نباید در نمونه‌های کشمش مشاهده گردد، ۸۸ درصد نمونه‌های کشمش مورد آزمایش از نظر آلودگی قارچی غیر قابل قبول بودند.

درصد آلودگی قارچی نمونه‌های کشمش در شهرهای مشهد، قوچان، خلیل آباد، بردسکن و کاشمر به ترتیب ۱۰۰، ۴۰، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد بود (جدول ۱).

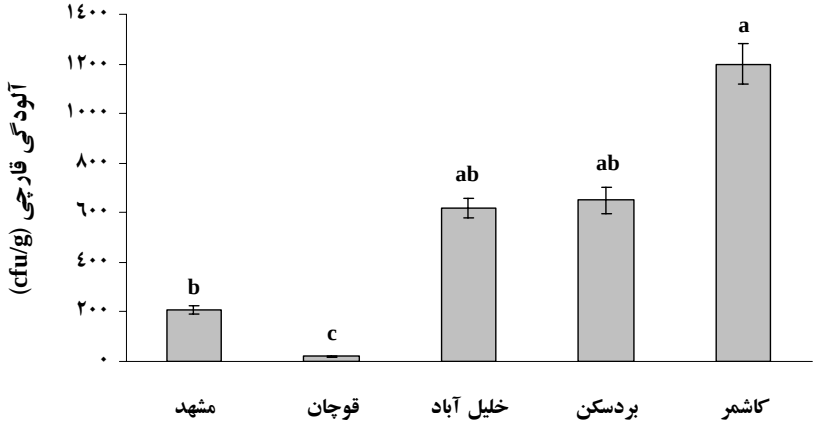
بررسی آلودگی قارچی کشمش در شهرهای مختلف

نتایج آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری آلودگی قارچی نمونه‌های مربوط به شهرهای مختلف حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف موجود در میان آلودگی قارچی در نمونه‌های مورد آزمایش بود ($P<0/05$). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵٪ نیز به خوبی این مطلب را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۱ مشخص است، میزان آلودگی قارچی در نمونه‌های مربوط به شهر قوچان به طور معنی‌داری پایین‌تر از نمونه‌های سایر شهرهاست.

1- Sykam co.
2- Slurry
3- Flow rate
4- Octa Desil Silan
5- Genesis

جدول۱- درصد فراوانی آلودگی قارچی در نمونه‌های کشمش شهرهای مختلف استان خراسان رضوی

نوع کشمش	مشهد	قوچان	خلیل آباد	بردسکن	کاشمر
غیرگوگردی	۱۰۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
گوگردی	۱۰۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



شکل ۱- میانگین آلودگی قارچی در نمونه‌های کشمش شهرهای مختلف

میزان آلودگی قارچی در نمونه‌های مربوط به شهر کاشمر به طور معنی‌داری بالاتر از نمونه‌های مشهد و قوچان بدست آمد، اما با شهرهای خلیل آباد و بردسکن اختلاف معنی‌داری نداشت.

شناسایی قارچ‌های ایزوله شده

قارچ‌های آلوده کننده نمونه‌های کشمش در محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار، به لحاظ رنگ کلنی و شکل ظاهری و با تهیه لام و مشاهده زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرارگرفتند. مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ‌های ایزوله شده از۴۴ نمونه آلوده کشمش، نشان داد که احتمالا بیشترین آلودگی مربوط به جنس آسپرژیلوس و نیز به میزان کمی پنی‌سیلیوم است.

در بیشتر قارچ‌های ایزوله شده، کلنی‌هایی به رنگ زرد طلایی طی اولین روزها دیده شدکه به‌تدریج تیره شده و کلنی‌هایی به رنگ سبز تیره مشاهده گردید. در مرکز این کلنی‌ها شعاع‌هایی به شکل پرتو دیده شد. در زیر میکروسکوپ کنیدی‌برهای مستقیم و ساده مشاهده گردیدکه در انتها به تورمی کروی شکل که همان وزیکول بود ختم می‌شد و بر روی سطح خارجی آن، تعداد زیادی استریگما (سلول اسپورزا) به صورت شعاعی در تمام سطح آن در یک ردیف مشاهده شد (پیغامی، ۱۳۷۶، Kavangh, 2005). همچنین کنیدی‌های تک سلولی و کروی به صورت زنجیر متصل به استریگما دیده شد. مشخصات ذکر شده مشابه کلیدهای تشخیصی جنس آسپرژیلوس بوده که بارنت و هانتر (۱۳۶۸) و الکسوپلوس و همکاران (۱۳۸۴) ذکر کردند.

در مطالعه‌ای که توسط Askun و همکاران (۲۰۰۷) در کشور ترکیه در زمینه بررسی آلودگی قارچی کشمش انجام شد، مشخص گردید که اکثر گونه‌های قارچی ایزوله شده مربوط به جنس‌های آسپرژیلوس و پنسیلیوم بودند.

Iamanaka و همکاران (۲۰۰۷) نیز در برزیل آلودگی میوه‌های خشک وارداتی از جمله کشمش را مورد بررسی قرار دادند. ۹ ایزوله آسپرژیلوس فلاووس تولید کننده آفلاتوکسین B_1 و B_2 از نمونه‌های کشمش جداسازی شد اما آسپرژیلوس پارازیتیکوس در نمونه‌های کشمش مشاهده نشد.

تحقیقی دیگر توسط Alghalibi و Shater (۲۰۰۴) در زمینه آلودگی قارچی و تولید مایکوتوکسین در میوه‌های خشک یمن انجام شد. گونه‌های غالب جداسازی شده شامل آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس، پنی‌سیلیوم کریزوژنوم و رایزوپوس استولونیفر بود.

ارزیابی پتانسیل آفلاتوکسین‌زایی

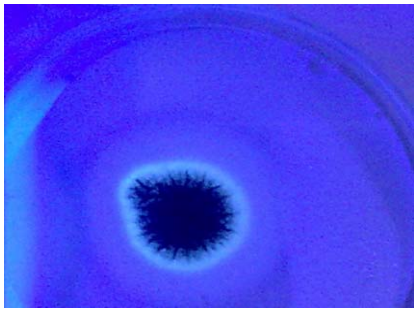
قارچ‌های ایزوله شده از نمونه‌های آلوده جهت بررسی تولید آفلاتوکسین به محیط کشت نارگیل آگار انتقال داده شد (شکل ۲) و پس از طی ۴ روز زیر نور فرابنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳).

تولید نور فلورسنس به دلیل ماهیت طبیعی آفلاتوکسین‌ها

می‌باشد. فلورسنس طبیعی آفلاتوکسین‌ها ناشی از ساختار حلقوی پنتاهیدروسیکلیک اکسیژنه آنها می‌باشد. حضور ترکیباتی در محیط کشت، سبب تحریک خاصیت فلورسنس گشته و در گسترش روش‌های شناسایی این ترکیبات کمک می‌نماید (۱۷، ۱۹و۲۰).

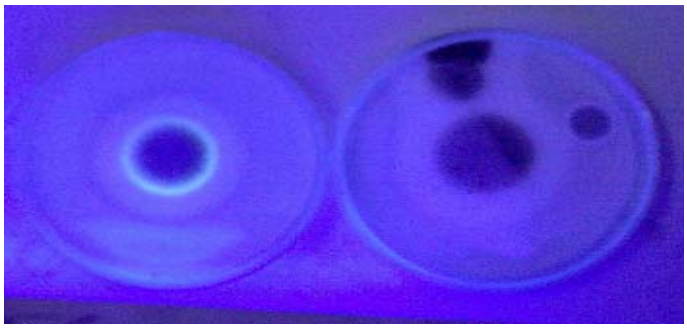
شکل ۲- رشد قارچ روی محیط آگار نارگیل

در این پژوهش بر اساس جدول ۲ از بین ۴۴ نمونه آلوده، ۲۹ نمونه (۶۵/۹ درصد) آفلاتوکسین مثبت بوده و تعداد ۱۵ نمونه (۳۴/۰۹ درصد) فاقد توانایی تولید آفلاتوکسین بودند (شکل ۴).



شکل ۳ – هاله فلورسنس در ایزوله آفلاتوکسین مثبت

در مطالعه‌ای که توسط Alghalibi و Shater (۲۰۰۴) صورت گرفت ۶ نمونه کشمش از مجموع ۲۰ نمونه آلوده به آفلاتوکسین B_1 گزارش گردید. همچنین Iamanaka و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تنها ۳ نمونه از ۱۹ نمونه (۱۶ درصد) کشمش سلطانی سفید آلوده به آفلاتوکسین B_1 بوده و میزان آلودگی از حد مجاز (۲ نانوگرم در گرم) بیشتر نبود. آنها در کشمش سلطانی سیاه آفلاتوکسین مشاهده نکردند.



شکل ٤– تصویرمشاهده شده زیرنورUV سمت چپ آفلاتوکسین مثبت و سمت راست آفلاتوکسین منفی

جدول۲– تعداد نمونه‌های کشمش آلوده به قارچ و آلوده به قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین با استفاده از روش کشت

شهر و نوع کشمش	تعداد نمونه‌های آلوده	تعداد نمونه‌های آفلاتوکسین مثبت
مشهد (سبز)	۵	۴
مشهد (سبز گوگردی)	۵	۲
قوچان (پلویی)	۴	۰
خلیل آباد (سبز)	۵	۴
خلیل آباد (سبز گوگردی)	۵	۳
بردسکن (سبز)	۵	۴
بردسکن (سبز گوگردی)	۵	۲
کاشمر (سبز)	۵	۵
کاشمر (سبز گوگردی)	۵	۵

بیشتر روش‌هایی که اخیرا به منظور شناسایی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، هر چند از حساسیت بالایی برخوردارند، نیازمند مرحله استخراج آفلاتوکسین توسط حلال بوده و هزینه‌بر و زمان‌بر می‌باشند. از این رو استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی آفلاتوکسین‌ها به عنوان روشی ساده و اقتصادی برای شناخت اولیه قارچ‌های آفلاتوکسین‌زا در آزمایشگاه‌های فاقد امکانات لازم جهت شناسایی شیمیایی آفلاتوکسین، محسوب می‌شوند (Aresecularante *et al.*, 1969).

Almeida و همکاران (۲۰۰۰) جهت جداسازی فلور قارچی و شناسایی آفلاتوکسین در نمونه‌های ذرت به ترتیب از محیط‌های کشت سیب زمینی دکستروز آگار و نارگیل آگار استفاده نمودند. در این مطالعه از مجموع ۶۶ نمونه، ۱۰ ایزوله آسپرژیلوس فلاووس جدا گردید که ۶ ایزوله توانایی تولید آفلاتوکسین را داشت.

Lemke و همکاران (۱۹۸۷) از محیط کشت عصاره نارگیل جهت کشت آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس به عنوان روشی مناسب برای شناسایی آفلاتوکسین استفاده کردند.

نتایج بدست آمده از نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش با نتایج مطالعات Lin و Dianese (۱۹۷۶)، Davis و همکاران (۱۹۸۷) و Milanez و همکاران (۲۰۰۲) که از محیط کشت نارگیل جهت شناسایی سریع آفلاتوکسین تولید شده توسط نژادهای آسپرژیلوس استفاده کردند، مطابقت داشت. در این تحقیقات، ایزوله‌هایی که تولید نور فلورسنس آبی یا آبی سبز اطراف کلنی‌ها کردند، تحت عنوان آفلاتوکسین مثبت در نظر گرفته شد.

تایید نتایج با روش HPLC

جهت تایید نتایج بدست آمده زیر نور فرا بنفش، تعدادی از نمونه‌های آفلاتوکسین مثبت توسط روش HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۳ نتایج حاصل از آنالیز HPLC تولید آفلاتوکسین در نمونه‌های کشمش را نشان می‌دهد. میزان آفلاتوکسین B_1 در تمامی نمونه ها بجز نمونه کشمش گوگردی کاشمر کمتر از ۰/۱ نانوگرم در گرم بود. میزان آفلاتوکسین B_1 در کشمش گوگردی کاشمر ۰/۶۴ نانوگرم در گرم بدست آمد. آفلاتوکسین G_2 فقط در نمونه‌های کشمش بردسکن به میزان ۰/۵۶ نانوگرم در گرم دیده شد (شکل ۵). بطور کلی غلظت انواع آفلاتوکسین در نمونه‌های کشمش از حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی ایران (۵ نانوگرم در گرم) کمتر بود. Iamanaka و همکاران (۲۰۰۷) نیز آلودگی به آفلاتوکسینB_1 را در کشمش سلطانی سفید وارداتی به برزیل گزارش نمودند که میزان آلودگی از حد مجاز بیشتر نبود. Alghalibi و Shater (۲۰۰۴) میزان آفلاتوکسین B_1 در نمونه‌های کشمش یمن را ۳۵۰-۱۳۰ نانوگرم در گرم گزارش کردند. در فرانسه نیز، Lemetayer and Herry (۱۹۹۲) گزارش نمودند که آفلاتوکسین B_1 در کشمش‌هایی که از مغازه‌ها و سوپر مارکت‌ها در طول سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۸۹ جمع آوری شده بود، تشخیص داده شد. Ozay و همکاران (۱۹۹۵) حضور آفلاتوکسین در کشمش در ترکیه را ثبت نمودند. در مصر، Abdel-Sater & Saber (۱۹۹۹) حضور آفلاتوکسین B_1 در یک نمونه کشمش را ۵۵۰ نانوگرم در گرم تشخیص دادند. از سوی دیگر، Stoloff (۱۹۷۶) هیچ آفلاتوکسین قابل تشخیصی را در ۱۰۸ نمونه کشمش مورد آزمایش در ایالات متحده آمریکا مشاهده نکرد.

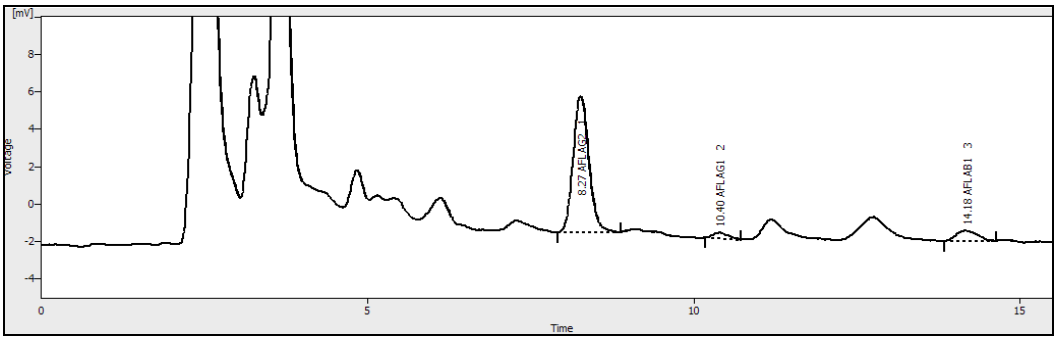
همچنین نتایج حاصل از آنالیز HPLC نشان داد که هاله فلورسنس ایجاد شده اطراف قارچ‌های آفلاتوکسین مثبت جداسازی‌شده از نمونه‌های کشمش زیر نور فرا بنفش با طول موج بالا (۳۶۵ نانومتر) در محیط کشت نارگیل آگار، حضور آفلاتوکسین را مشخص کرد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق در رابطه با آلودگی آفلاتوکسین در کشمش بیانگر این است که در صد آلودگی در کشمش‌های مورد مطالعه بالا بود.

جدول ۳- میزان آلودگی نمونه‌های کشمش به آفلاتوکسین‌ها با استفاده از روش HPLC

نمونه‌ها	آفلاتوکسین (نانوگرم/گرم)			
	B_1	B_2	G_1	G_2
کشمش سبز مشهد	کمتر از ۰/۱	کمتراز۰/۱	-	-
کشمش سبز خلیل آباد	کمتر از ۰/۱	کمتراز۰/۱	-	-
کشمش سبز بردسکن	کمتر از ۰/۱	-	کمتر از ۰/۱	۰/۵۶
کشمش سبز کاشمر	کمتر از ۰/۱	-	۰/۵۵	-
کشمش سبز کاشمر(گوگردی)	۰/۶۴	کمتر از ۰/۱	کمتر از ۰/۱	-



شکل ۵- کروماتوگرام مربوط به آندازه‌گیری آفلاتوکسین در نمونه‌ی کشمش سبز بردسکن

با توجه به اینکه طبق استاندارد ملی ایران هیچگونه آلودگی قارچی نمی‌بایست در نمونه‌های کشمش مشاهده گردد، ۸۸٪ نمونه‌های کشمش از نظر آلودگی قارچی غیرقابل قبول بود. از نظر میزان آلودگی قارچی،در نمونه‌های شهر قوچان کمترین آلودگی و در نمونه‌های شهر کاشمر بیشترین آلودگی قارچی مشاهده شد. مشاهده هاله فلورسنس اطراف نمونه‌های مثبت زیر نور فرا بنفش تأیید، و اندازه‌گیری توسط HPLC مشخص کرد که با وجود حضور آفلاتوکسین در نمونه‌های کشمش، میزان آن کمتر از حد استاندارد بود.

با توجه به نتایج این تحقیق و اهمیت آلودگی کشمش به آفلاتوکسین و اثرات سوء آن بر سلامت مصرف‌کنندگان و خطرات گسترده این متابولیت‌ها، لزوم توجه و پیگیری در کلیه مراحل تولید، توزیع و نگهداری با هدف به حداقل رساندن آلودگی قارچی ضروری است و با توجه به توانایی قارچ‌های ایزوله شده از نمونه‌های این تحقیق در تولید آفلاتوکسین، حضور و رشد قارچ‌ها در نمونه‌های کشمش هشدار دهنده می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی جهاددانشگاهی واحد مشهد و همکاری آزمایشگاه اکرودیته صنایع غذایی پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی در اجرای این پایان نامه، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

آلکسوپولوس، سی. جی.، میمس، سی. دبلیو.، و بلک ول، ام.، ۱۳۸۴، اصول قارچ شناسی. ترجمه: صارمی، ح.، پیغامی، ا. و پژوهنده، م. انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد.

بارنت، اچ. ال.، و هانتر، بی.، ۱۳۶۸، قارچ‌های ناقص. ترجمه میناسیان، و. و علیزاده، ع. مرکز انتشارات و چاپ دانشگاه شهید چمران، اهواز.

پیغامی، ا.، ۱۳۷۶، قارچ شناسی تکمیلی. انتشارات احرار تبریز، صفحه ۴۱۶.

دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی.، ۱۳۸۶، آمارنامه کشاورزی جلد اول محصولات زراعی- باغی. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت امور برنامه‌ریزی و اقتصادی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات.

دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی.، ۱۳۸۹، نتایج طرح آمارگیری نمونه‌ای محصولات باغی سال ۱۳۸۷. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت امور برنامه‌ریزی و اقتصادی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۶۹، ویژگی‌ها و روش آزمون کشمش سبز. استاندارد شماره ۳۱۲۲. چاپ اول.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۷۲، روش نمونه‌برداری خشکبار. استاندارد شماره ۱۰۳۶. چاپ دوم.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۷۴، روش شمارش و شناسایی آلودگی قارچی (کپک‌ها و مخمرها) در مواد غذایی. استاندارد شماره ۹۹۷. چاپ دهم.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۷۵، آماده کردن نمونه‌های مواد غذایی و شمارش میکروارگانیسم‌های مختلف. استاندارد شماره ۳۵۶. چاپ دهم.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۸۰، اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G به طریق کروماتوگرافی مایع با کارآیی عالی و خالص سازی با ستون ایمونوافینیتی. استاندارد شماره ۶۸۷۲ چاپ اول.

Abbas, H. K., Shier, W. T., and Horn, B. W., 2004, Cultural methods for aflatoxin detection. *Journal of Toxicology*,

23 (2,3):295-315.

Abdel-Sater, M. A., and Saber, S. M., 1999, Mycoflora and Mycotoxins of some Egyptian dried fruits. *Bull. Fac. Sci. Assiut*, 28(1-D):91-107.

Alghalibi, S., and Shater, A. R. M., 2004, Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res,* 7(2):19-27.

Almeida, A. P., Correa, B., Mallozzi, M. A. B., Sawazaki, E., and Valente Soares, L. M., 2000, Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:321-326.

Areseculerante, S. N., Silva, L. M., Wijesundera, S., and Bandunatha, C. H. S. R., 1969, Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Applied Microbiology*, 18(1):88-94.

Askun, T., Eltem, R., and Taskin, E., 2007, Comparison of rose-bengal chloramphenicol agar and dichloran glycerol agar (DG18) for enumeration and isolation of molds from raisins. *Journal of Applied Biological Sciences,* 1(2):71-74.

Atanda, O. O., Akpan, I., and Enikuomehin, O. A., 2006, Palm kernel agar: An alternative culture medium for rapid detection of aflatoxin in agricultural commodities. *African Journal of Biotechnology*, 56(10):1029-1033.

Cutuli, M. T., Cuellar, A. Camara, J. M. Mateos, A., and Suarez, G., 1991, Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains isolated from trout feed. *Mycopathologia,* 113:121-125.

Davis, N. D., Iyer, S. K., and Diener, U. L., 1987, Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7):1593-1595.

Fente, C. A., Ordaz, J. J., Vazquez, B. I., Franco, C. M., and Cepeda, A., 2001, New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin–producing Aspergillus strains. *Applied and Environmental Microbiology,* 67(10):4858-4862.

Grigoryan, K., Hakobyan, L., Sarkisyan, M., and Hayrapetyan, H., 2006, Mycobiota of raisin from Armenian market and factors influencing its development. *Toxicology Letters*. 164(1): S276.

Herry, M. P., and Lemetayer, N., 1992, Aflatoxin contamination in oil seeds, dried fruits and spices. *Microbiologic*, 10:261-266.

Iamanaka, B.T., Menezes, H.C., Vicente, E., Leite, R. S. F., and Taniwaki, M. H., 2007, Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*, 18:454-457.

Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Vicente, E., and Fungaro, M. H. P., 2005, Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 12:1258–1263.

Kavangh, K., 2005, Fungi: Biology and application. John Wiley and Sons, Ltd , England. Pp:267.

Lemke, P. A., Davis, N. D., Lyer, S. K., Creech, G. W., and Diener, U. L., 1988, Fluorometric analysis of iodinated aflatoxin in minicultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3:119-125.

Lin, M. T., and Dianese, J. C., 1976, A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 1466-1469.

Macdonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., and Shepherd, M. J., 1999, Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants*. 16: 253-260.

Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C. A. R., and Dalcero, A. M., 2004, Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*. 39(4):326-331.

Milanez, V. T., Schoenlein-Crusius, I. H., and Okino, L. K., 2002, Evaluation of Brazilian terrestrial Aspergillus strains for mycotoxin production. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(1):7-11.

Ozay, G., Aran, M., and Pala, M., 1995, Influence of harvesting and drying technique on mycoflora and mycotoxins of figs. *Nahrung*, 39:156-165.

Romero, S. M., Comerio, R. M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., and Fernández Pinto, V., 2005, Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 104:43–49.

Stoloff, L., 1976, Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. In: Mycotoxins and other fungal food problems. Rodrichs, J.V. (Ed.). Adv. Chem. Ser. No. 149 Amer. Soc. pp. 23-50.

United States Department of Agriculture., 2006, Grain Fungal Diseases and Mycotoxin Reference. Retrieved on May 11, 2009, from http://archive.gipsa.usda.gov/pubs/mycobook.pdf

United States Department of Agriculture., 2010, Raisins: World markets and trade. Retrieved on September 10, 2010, from http://www.fas.usda.gov/htp/2010_Raisins.pdf

Varga, J., Kocsube, S., Koncz, Z., and Teren, J., 2006, Mycobiota and ochratoxin A in raisins purchased in Hungary. *Acta alimentaria*. 35: 289-294.

Zohri, A. A., and Abdel-Gawad, K. M., 1993, Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. *Journal of Basic Microbiology*. 33:279-288.