Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره اول، فروردین ـ اردیبهشت ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

بررسی آلودگی نمونه‌های بادام‌زمینی جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی ایران به کپک *A. flavus* و آفلاتوکسین آن

***مرتضی خمیری[۱]، یحیی مقصودلو[۲]، لاوا کومار[۳]، فرید ولی‌یار[۳] و سعید حسنی[۴]**

[۱]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]محقق مؤسسه بین‌المللی ICRISAT، حیدرآباد، هندوستان،
[۴]استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۲۱

چکیده

آفلاتوکسین‌ها متابولیت ثانویه سمی، که به‌وسیله *Aspergillus flavus* و برخی دیگر از کپک‌ها در مواد غذایی از جمله بادام زمینی تولید می‌شوند. این ترکیبات دارای خاصیت سرطان‌زایی و جهش‌زایی بوده و موجب ضعف در سیستم ایمنی و تشکیل جنین ناقص در انسان و حیوانات می‌گردد. در این تحقیق تعداد ۱۵۶ نمونه از بادام‌زمینی‌های جمع‌آوری شده از بازار استان‌های شمالی کشور (گیلان، مازندران و گلستان) با استفاده از روش ELISA از نظر مقدار آفلاتوکسین B_1 (میکروگرم/کیلوگرم) و نیز با روش قرار دادن دانه‌ها در پلیت‌های دارای صفحات کاغذی مرطوب میزان حضور کپک *A. flavus* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که به‌طور متوسط ۵۸/۲۳، ۴۶/۶۷ و ۳۶/۹ درصد از نمونه‌های بادام‌زمینی به‌ترتیب مربوط به استان‌های گلستان، مازندران و گیلان، با آلودگی بین ۸ و ۱۰۰ درصد، آلوده به کپک *A. flavus* است. تنها یک مورد از نمونه‌ها دارای (۴۹۱ میکروگرم/کیلوگرم) آفلاتوکسین بوده است اما مقدار آن در مابقی نمونه‌ها در دامنه قابل قبول سم آفلاتوکسین (۵ میکروگرم/کیلوگرم) قرار داشته است. علاوه‌بر این آنالیزهای آماری نشان داد مقدار آلودگی به آفلاتوکسین در بین نمونه‌های برداشت شده از استان‌های شمالی دارای اختلاف معنی‌داری نیست ($P>0/05$). در خصوص درصد آلودگی به خود کپک اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان وجود نداشت ($P>0/05$). اما از نظر درصد آلودگی به کپک اختلاف معنی‌داری بین استان گیلان با استان‌های مازندران و گلستان وجود داشت ($P<0/05$). این تحقیق آلودگی بسیار زیاد نمونه‌های برداشت شده بادام زمینی از بازار استان‌های شمالی کشور به کپک *A. flavus* را نشان داد اما سم آفلاتوکسین در اکثر نمونه‌ها در محدوده قابل قبولی از مصرف قرار داشته است. این ممکن است به علت شرایط نامناسب برای تولید توکسین توسط کپک‌های حاضر برروی نمونه‌ها باشد. اما نگهداری دانه‌های آلوده به کپک در شرایط معمولی دارای ریسک بالایی برای ایجاد آفلاتوکسین بالا در آن خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، *Aspergillus flavus*، بادام‌زمینی، ELISA، استان‌های شمالی ایران

*- مسئول مکاتبه: khomeiri@gau.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی هستند که به‌وسیله برخی از کپک‌ها در موادغذایی تولید می‌شوند. وجود آفلاتوکسین تحت تأثیر فاکتورهای محیطی است، بنابراین گستردگی آلودگی در موقعیت‌های مختلف جغرافیایی، عملیات کشاورزی و حساسیت کالاهای کشاورزی به حمله کپک‌ها در طول برداشت، نگهداری و روش‌های فرایند متفاوت است (مهان و همکاران، ۱۹۹۵؛ کترینگ و همکاران، ۱۹۷٦؛ پتیت، ۱۹۸۵؛ اوگانسئو و همکاران، ۲۰۰٤).

در سال ۱۹٦۰ در عرض چند ماه بیش از صد هزار جوجه بوقلمون در بخشی از دامداری‌های انگلیس تلف شدند. بزودی مشخص شد که این تنها به جوجه بوقلمون‌ها محدود نمی‌شود بلکه جوجه اردک‌ها و جوجه قرقاول‌های بسیاری نیز از بین رفتند. تحقیقات دقیق نشان داد علت مرگ و میر مربوط به نوعی خوراک به نام خوراک بادام‌زمینی برزیلی بوده است. بررسی‌های بیشتر انجام شده نشان داد که ماهیت عامل ایجاد این مشکل سمی مترشحه توسط کپک‌ها است و به این صورت از سال ۱۹٦۱، *A. flavus* به‌عنوان عامل اصلی ایجاد ترکیب سمی آفلاتوکسین معرفی گردید (واسانتی و بت، ۱۹۹۸؛ گوراما و بولرمن، ۱۹۹۵).

اثرات سرطان‌زایی آفلاتوکسین‌ها در حیوانات آزمایشگاهی و اثرات سمی آن در انسان ثابت شده است (ایتون و گراپمن، ۱۹۹٤؛ براون و همکاران، ۱۹۹۸؛ ویلسون و آبرسمون، ۱۹۹۲؛ ویلسون و همکاران، ۱۹۸٦). مواردی از آفلاتوکسیکوز انسانی از کشورهایی چون اوگاندا، تایوان و هند گزارش شده است (کارکی و سینها، ۱۹۹۲؛ تانگتیراسونان، ۱۹۹۲). علائم شناخته شده این عارضه عبارت است از حالت تهوع، درد شکم، تورم ریوی، تشنج، بیهوشی و مرگ ناشی از تورم مغزی و چرب شدن کبد، کلیه و قلب. شرایط احتمالی افزایش آفلاتوکسیکوز در انسان عبارت از دسترسی محدود موادغذایی، شرایط محیطی که موجب افزایش حضور کپک‌ها در مزارع و موادغذایی می‌شود و فقدان سیستم منظمی برای تشخیص و کنترل آفلاتوکسین می‌باشد (ساد، ۲۰۰۵؛ واسانتی و بت، ۱۹۹۸). آفلاتوکسین در سال ۱۹۸۷ در لیست ترکیبات سرطان‌زای آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان ثبت شد (IARC، ۱۹۸۷). بنابراین به‌دلیل خاصیت شدید سرطان‌زایی آفلاتوکسین خصوصاً نوع B_1 در برخی از حیوانات، اثرات طولانی مدت مقادیر کم آن نیز در انسان نگران‌کننده است. تحقیقات اپیدمیولوژیک در برخی از کشورهای آسیایی و آفریقایی وجود ارتباط مثبت بین مصرف جیره غذایی دارای آفلاتوکسین و سرطان سلول‌های کبدی را نشان دادند (گروپمن و توماس، ۱۹۹۹). این ماده از متابولیت‌های ثانویه قارچ‌هایی مانند *A. flavus* و *A. Parasiticus* می‌باشد. بسیاری از محصولات کشاورزی از جمله غلات، دانه‌های روغنی و ادویه‌جات به آفلاتوکسین آلوده می‌شوند. آلودگی دانه‌ها و موادغذایی به افلاتوکسین علاوه‌بر اثرات نامطلوبی که بر مصرف‌کننده به‌جا می‌گذارد موجب کاهش رونق در تجارت جهانی برای صادرکننده است (هیل و همکاران، ۱۹۸۵؛ جلینک و همکاران، ۱۹۸۹؛ مهان و همکاران، ۱۹۸۲؛ ردی و همکاران، ۲۰۰۱؛ ویلسون، ۱۹۸۹). اگرچه آفلاتوکسین دارای اثرات ناخوشایندی در مصرف‌کننده موادغذایی واجد آن می‌باشد اما وجود مقدار محدودی از آن در موادغذایی بلامانع است FDA این مقدار را برای اکثر موادغذایی بجز شیر ۲۰ پی‌پی‌بی تعیین کرده است اما اتحادیه اروپا آن را در موادغذایی به ۵ پی‌پی‌بی محدود کرده است (رودریکس، ۲۰۰۷) و براساس استاندارد ایران مقدار آفلاوکسین B_1 در بادام‌زمینی نباید بیش از ۵ پی‌پی‌بی باشد (استاندارد ایران شماره ۳٤۱٦).

برای بررسی آلودگی پسته به آفلاتوکسین در ایران تحقیقات و گزارشات مختلفی وجود دارد (چراغعلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ محمدی مقدم، ۱۹۹۹؛ امین شهیدی، ۱۹۹٦)، اما در مورد آلودگی بادام‌زمینی کار چندان قابل توجهی انجام نشده است درحالی‌که بادام‌زمینی هم ارتباط مستقیمی با خاک داشته و هم تماس مستقیم با هوا دارد که از مسائلی است که می‌تواند ضرورت بررسی آن را

www.SID.ir

Archive of SID

نشان دهد. بادام‌زمینی یکی از آجیل‌های پرطرفدار در ایران است که اکثراً به‌صورت برشته و مستقیم مصرف می‌شود. به‌نظر می‌رسید به‌علت فروش این محصول به‌صورت فله میزان آلودگی آن به کپک‌ها زیاد بوده و مصرف آنها مخاطره‌آمیز باشد. لذا بر این اساس و با توجه به فراهم بودن شرایط مساعد رشد کپک‌ها به دلیل رطوبت بالای محیط (اسمیت، ۲۰۰۲) در استان‌های شمالی به‌خصوص استان گیلان که از مناطق مهم تولید بادام زمینی می‌باشد (مهدویان، ۲۰۰۵)، برای این مهم انتخاب و نمونه‌های مورد مطالعه از بازارهای این مناطق برداشت و شدت آلودگی در این مناطق مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و انواع آنها: تعداد ۱۵٦ نمونه ۱۰۰ گرمی از بادام‌زمینی به‌صورت خام و برشته از بازار استان‌های شمالی (گیلان، مازندران و گلستان) جمع‌آوری گردید. دانه‌های بادام‌زمینی در این استان‌ها را می‌توان به دو شکل در غلاف یا بدون آن یافت اما پراکندگی آن در استان‌های مختلف یکسان نبوده است لذا برخی از اشکال را نمی‌شد در یک استان یافت. علاوه‌بر این دانه‌های بادام‌زمینی رایج در این استان‌ها دارای منشاء تولید متفاوتی است (آستانه، چینی، گلستانی و عراقی) که از این نظر نیز دارای پراکندگی یکسانی نمی‌باشند. لذا همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است و با توجه به نمونه‌های برداشت شده، درصد آلودگی نمونه‌ها به *A. flavus* بدون در نظر گرفتن شکل دانه‌ها (از نظر غلاف‌دار بودن یا بدون آن) تعیین شدند درحالی‌که برای ارزیابی مقدار آفلاتوکسین، غلاف‌دار بودن دانه‌ها یا بدون آن به‌عنوان یک متغیر مورد توجه قرار گرفت. ٥٦ نمونه از دانه‌ها مربوط به استان مازندران ۸۰ نمونه از گیلان و ۲۰ نمونه از استان گلستان بود. ٦۰ نمونه از نمونه‌های استان گیلان به‌صورت برشته و بقیه آن به‌صورت خام بوده است (در جدول نشان داده نشده است).

روش تعیین مقدار آفلاتوکسین: مقدار آفلاتوکسین در نمونه‌ها با استفاده از روش ELISA غیررقابتی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. در این روش به‌طور خلاصه ابتدا در مرحله Coating، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول AFB1-BSA (سرم آلبومین گاوی با آفلاتوکسین B_1) با غلظت ۱۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ریخته شده و پس از اینکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت و ۳ بار آبکشی با PBS -Tween به هر چاهک ۱۵۰ میکروگرم از ۰/۲ درصد BSA اضافه شده و نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اینکوبه گردید. پلیت‌ها دوباره ۳ بار با PBS –Tween شستشو شدند. سپس به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکروگرم از محلول‌های استاندارد در عصاره استحصالی از بادام‌زمینی سالم و یا عصاره جدا شده از نمونه‌های مورد آزمایش ریخته شد و به همه آنها مقدار ۵۰ میکروگرم از آنتی‌بادی آفلاتوکسین B_1 جدا شده از خرگوش اضافه گردید. پس از یک ساعت اینکوباسیون و ۳ بار شستشو آنزیم آلکالین فسفاتاز گرفته شده از خرگوش به آن اضافه و پس از یک ساعت اینکوباسیون مجدد با PBS، شستشو شد (AOAC، ۱۹۹۵؛ کایران و همکاران، ۲۰۰۵). سپس به هر چاهک مقدار ۱۵۰ میکروگرم از سوبسترای آنزیم p– نیتروفنیل فسفات رقیق شده در دی‌اتانول آمین اضافه شد. پلیت‌ها مدت حدود یک ساعت در جای تاریک قرار داده شدند. سپس به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Plate Reader مقدار جذب نوری اندازه‌گیری شد. مقدار آفلاتوکسین با فرمول ۱ محاسبه گردید (دستورالعمل آزمایشگاهی موسسه ICRISAT ، ۲۰۰۵؛ ردی و همکاران، ۲۰۰۱؛ ویلسون و همکاران، ۱۹۸٦).

$$AFB1(\mu g) = A \times D \times E / \qquad (1)$$

AFB1= آفلاتوکسین B_1

A= غلظت AFB1 در عصاره استحصال شده از نمونه (نانوگرم بر میلی‌لیتر)

D= دفعات رقیق‌سازی با بافر

E=حجم حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری (میلی‌لیتر)

G= وزن نمونه (گرم)

روش تعیین درصد آلودگی *A. Flavus*: برای این بخش از آزمایش‌ها ۳٤ نمونه به‌صورت تصادفی از بازار

www.SID.ir

Archive of SID

استان‌های شمالی برداشته شد (جدول ۱). نمونه‌ها شامل دو دسته بوده است دسته اول نمونه خام و تعدادی نیز نمونه‌های برشته (در جدول نشان داده نشده است). نمونه‌های خام ابتدا با استفاده از هیپوکلرات سدیم ۳ درصد به‌صورت سطحی ضدعفونی شد برای این‌کار نمونه‌ها در محلول مورد نظر به‌مدت ۵ دقیقه خیسانده شد پس از آن در دو مرحله با آب مقطر سترون شستشو شد. درحالی‌که نمونه‌های برشته شده تنها با آب مقطر شستشو شدند.

سپس دانه‌های بادام‌زمینی به‌مدت ۷ روز برروی کاغذهای صافی مرطوب[1] در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. فیلترهای کاغذی پس از ٤ روز نیز دوباره مرطوب شدند. پس از آن درصد حضور *A.flavus* براساس خصوصیات شکلی این کپک با هیف‌ها و اسپورهای سبز رنگ یا سفید تعیین و ثبت گردید. برای شناسایی بیشتر و تائیدی تعدادی از اسپورهای *A. flavus* برداشته شده و برروی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA) کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد (کیران و همکاران، ۲۰۰۵؛ ردی و همکاران، ۲۰۰۱). از این محیط، کشت شیبداری تهیه و به‌صورت کشت خالص برای کارهای بعدی و مشاهدات میکروسکوپی ذخیره شد.

آنالیز آماری: آنالیز واریانس با استفاده از رویه GLM (مدل خطی عمومی) برنامه SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون توکی و سطح معنی‌دار ۵ درصد صورت گرفت (SAS، ۲۰۰۱).

نتایج و بحث

میزان حضور کپک *A. flavu*: نتایج نشان داد که به‌طور متوسط در کل سه استان (مناطق شمالی کشور) ٤۲/۰۹ درصد از دانه‌های بادام‌زمینی به کپک *A. flavus* آلوده است. درصد آلودگی در سه استان گلستان، مازندران و گیلان به‌ترتیب ۵۸/۲۳، ٤٦/٦۷ و ۳٦/۸۹ بود (شکل ۱). میزان آلودگی بادام‌زمینی‌ها براساس منشاء آنها (آستانه، چینی و گلستانی) نیز تعیین گردید که مشخص شد مقدار آن به‌ترتیب ٤۰/۰۵، ٤۸/۳۹ و ۵۵/٤۳ درصد است. آنالیز واریانس با استفاده از رویه GLM برنامه SAS نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین درصد آلودگی به کپک *A.flavus* در بین سه استان گلستان، گیلان و مازندران وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۱- وضعیت نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی ایران.

منشاء	نوع	برای ارزیابی مقدار آفلاتوکسین			برای تعیین درصد آلودگی		
		گیلان	گیلان	مازندران	گلستان	مازندران	گلستان
آستانه	غلاف‌گیری شده	۳۰	۱۹	۱	آ. ن.[2]	۸	پ. ن.[1]
	در غلاف	۲٤				پ. ن.	۲
چینی	غلاف‌گیری شده	۱۰	۳	۱	۳	۲۲	٦
	در غلاف	۲				٦	٤
گلستانی	غلاف‌گیری شده	پ. ن.	۱	۳	۳	٤	٤
	در غلاف	پ. ن.				٤	پ. ن.
عراقی	غلاف‌گیری شده	۱۰	آ. ن.	آ. ن.	آ. ن.	٤	پ. ن.
	در غلاف	٤	آ. ن.	آ. ن.	آ. ن.	٦	٤
کل	غلاف‌گیری شده	۵۰	۲۳	۵	٦	۳۸	۱۰
	در غلاف	۳۰				۱٦	۱۰

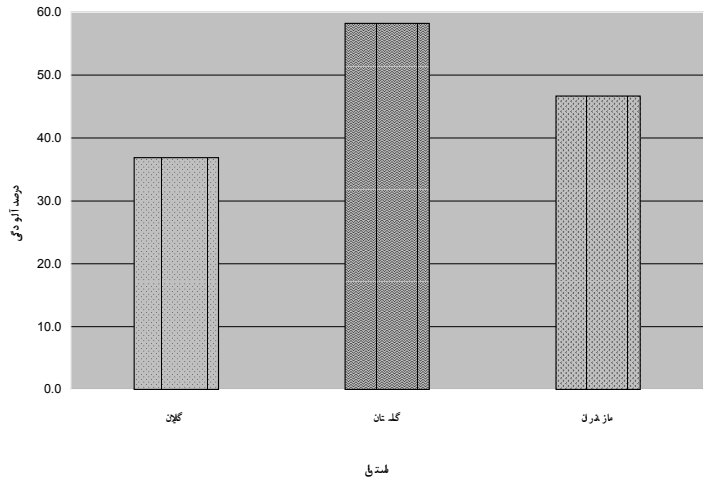
[1] پ. ن. = این شکل نمونه در بازار پیدا نشد.

[2] آ. ن. = این نمونه به‌دلیل کمبود مقدار در دسترس آن آزمایش نشد.

1- Bloutler plate

www.SID.ir

Archive of SID



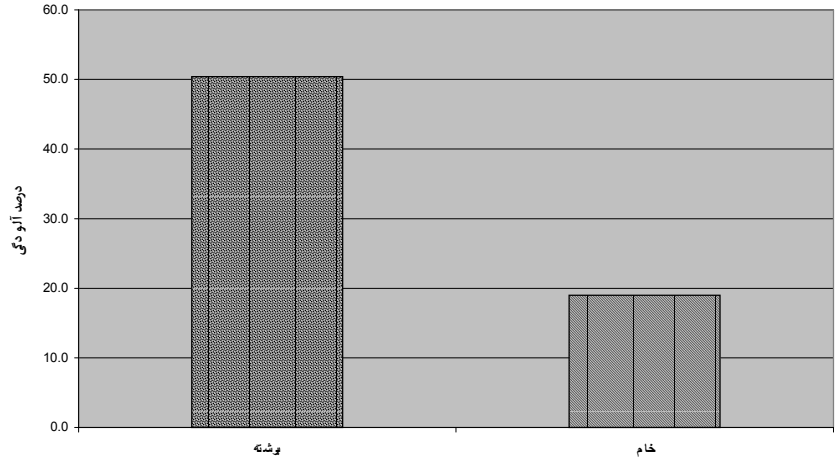
شکل ۱- میانگین آلودگی دانه‌های بادام‌زمینی به *A. flavus* در استان‌های شمالی.

از نظر منشاء تولید نیز اختلاف معنی‌داری بین درصد آلودگی به این کپک وجود نداشت ($P>0/05$). اما نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در سطح ۵ درصد اختلاف بین درصد آلودگی به کپک *A. flavus* در بادام‌زمینی‌های برشته و خام گرفته شده از بازارهای استان گیلان بسیار معنی‌دار بود ($P<0/01$). مقدار آن در دانه‌های برشته بسیار بیشتر از درصد آلودگی دانه‌های خام بود (شکل ۲). این نتیجه نشان‌دهنده وجود آلودگی سطحی فراوان برروی نمونه‌های در حال فروش در بازار می‌باشد. پالانیامی و همکارانش (۱۹۹۰) نشان دادند درصد حضور قارچ‌ها براساس شرایط خشک کردن غلاف‌های بادام‌زمینی پس از برداشت، درصد رطوبت و نسبت غلاف رسیده به نارس متفاوت است. آنها در تحقیق خود نشان دادند به‌طور متوسط ۲۳ درصد از غلاف‌های رسیده آلوده به انواع کپک‌ها بوده است درحالی‌که درصد آلودگی غلاف‌های نارس به‌طور متوسط ٤٣/٨ درصد و مقدار متوسط آن برای کل نمونه‌های مورد آزمایش ۳۰/۱۵ درصد گزارش شد. از آنجایی‌که این محققین قبل از انجام کشت از روش ضدعفونی سطحی استفاده نمودند در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر مربوط به آن بخش از نمونه‌های برداشت شده از استان گیلان که آنها نیز قبل از انجام کشت ضدعفونی سطحی شده بودند دارای میزان آلودگی بالاتری بودند (۳۰/۱۵ درصد به ۱۹ درصد). البته باید توجه داشت که نتایج تحقیق حاضر تنها درصد حضور کپک *A. flavus* را تعیین نموده است درحالی‌که پالانیامی و همکارانش (۱۹۹۰) درصد آلودگی کلی کپک‌ها را تعیین نمودند. در تحقیقی که توسط چون و همکاران (۲۰۰۷) برروی ۸۵ نمونه از دانه‌ها و فراورده‌هایشان در کره‌جنوبی انجام شد مشخص گردید ۱۰/٦ درصد از نمونه‌های مورد آزمایش آلوده به آفلاتوکسین می‌باشند. از بین نمونه‌هایی که توسط این محقق آزمایش شدند نمونه‌های بادام‌زمینی برشته دارای بیشترین درصد آلودگی به آفلاتوکسین و در نتیجه عوامل تولیدکننده آن، کپک آسپرژیلوس، بوده است. این نتیجه می‌تواند بر نتایج تحقیق حاضر صحه گذاشته و آن را تأیید نماید.

نتایج حاکی از این است که شرایط نگهداری و فروش در سه استان شمالی اختلاف چندانی با هم ندارد اما از آنجایی‌که برای بررسی میزان آلودگی نمونه‌های خام، آنها به‌صورت سطحی با هیپوکلریت سدیم *سترون* شده بودند و بعد کشت شدند درحالی‌که نمونه‌های برشته بدون ضدعفونی کردن سطحی کشت و مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین، آلودگی قارچی مربوط به بخش خارجی است نه داخلی. لذا آلودگی مربوط به شرایط نگهداری است نه شرایط قبل از برداشت. این نتیجه لزوم تغییر روش عرضه این محصول کشاورزی را نشان می‌دهد. زیرا نسبت پائین آلودگی دانه‌های خام به دانه‌های برشته نشان می‌دهد داخل دانه‌ها اسپور چندانی از این کپک وجود ندارد این بدان معناست که میزان آلودگی خاکزاد دانه‌های مورد آزمایش بسیار پائین بوده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- میانگین آلودگی دانه‌های بادام‌زمینی خام و برشته به *A. flavus*.

مقدار سم آفلاتوکسین دانه‌های بادام‌زمینی: نتایج مربوط به این بخش نشان داد که بجز یک نمونه از استان گلستان که دارای ٤٩١ میکروگرم/کیلوگرم آفلاتوکسین بوده است هیچ‌یک از دیگر نمونه‌ها واجد مقادیر بالاتر از حد مجاز از نظر استاندارد ایران (۵ میکروگرم/کیلوگرم) نبوده‌اند. آنالیز واریانس با استفاده از رویه GLM برنامه SAS نشان داد که در مقدار آفلاتوکسین نمونه‌های گرفته شده از استان گیلان با دو استان مازندران و گلستان اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). اما مقدار آن بین دو استان مازندران و گلستان با همدیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین آنالیز واریانس نشان داد به‌طورکلی مقدار آفلاتوکسین موجود در نمونه‌های با منشاء مختلف با همدیگر اختلاف معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$) اما مقدار آفلاتوکسین نمونه‌های با منشاء آستانه با دیگر نمونه‌ها (چینی، گلستانی و عراقی) اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). ضمناً شکل بادام‌زمینی و نحوه فروش آن، در غلاف یا بدون آن، نیز می‌تواند عامل مورد توجهی واقع شود زیرا آنالیز واریانس داده‌ها اختلاف بسیار معنی‌داری بین میانگین مقدار آفلاتوکسین از این جهت را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۰۰۵$).

تحقیق چون و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد ۱ نمونه از بادام‌زمینی خام، ٤ نمونه از بادام‌زمینی برشته، ۲ نمونه کره بادام‌زمینی، ۱ نمونه پسته و یک نمونه از دیگر آجیل‌ها (۱۰/٦ درصد از نمونه‌ها) آلوده به آفلاتوکسین بودند که بیشترین میزان آفلاتوکسین (۲۸ میکروگرم/کیلوگرم) در نمونه‌هایی از بادام‌زمینی برشته گزارش شد. لیپی گورنگوسون و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی که برروی نمونه‌های ذرت و بادام‌زمینی در تایلند نشان دادند که به‌طور متوسط ٦۷/۹ درصد از نمونه‌های بادام‌زمینی دارای آفلاتوکسین با میانگین ۱۰۲ میکروگرم/کیلوگرم می‌باشند که براساس مقررات این کشور ٤٦/٤ درصد از نمونه‌ها واجد مقدار آفلاتوکسینی بیشتر از حد مجاز (۲۰ میکروگرم/کیلوگرم) بوده‌اند. اگرچه نتایج آنها در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر دارای شدت آلودگی بسیار بالاتری است و نشانی از شرایط نامناسب حاکم بر یکی از مراحل کشت تا نگهداری دارد اما نشان‌دهنده شرایط بسیار مناسب و پتانسیل قوی موجود در دانه‌های بادام‌زمینی برای تولید آفلاتوکسین است. بنابراین نگهداری دانه‌های آلوده به کپک در شرایط معمولی دارای ریسک بالایی برای ایجاد آفلاتوکسین بالا در آن خواهد بود.

همان‌طور که در جدول ۲ و شکل ۱ مشاهده می‌شود بیشترین مقدار سم مربوط به نمونه‌های گرفته شده از استان گلستان و نیز دارای منشاء گلستانی است. با توجه به این که درصد آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان گلستان نیز از دو استان دیگر بیشتر بوده است، لذا ارتباط مستقیم بین آنها را می‌توان دید. در این تحقیق

www.SID.ir

Archive of SID

اگرچه مقدار آلودگی به کپک *A. flavus* بالا بوده است اما میزان آفلاتوکسین در نمونه‌ها دارای مقادیر قابل توجهی نبوده است. عدم توانایی سنتز آفلاتوکسین توسط نژادهای حاضر برروی دانه‌های بادام‌زمینی را می‌توان دلیل این پدیده دانست. علاوه‌بر این توانایی تولید آفلاتوکسین توسط کپک‌های تولیدکننده در موقعیت‌های مختلف متفاوت است و ممکن است در برخی از شرایط قدرت سنتز خود را از دست بدهند یا از مقدار آن کاسته شود (مهان و همکاران، ۱۹۹۵؛ واسانتی و بت، ۱۹۹۸).

از آنجایی‌که آفلاتوکسین یک سم سرطان‌زا است بهتر آن است که هیچ مقدار از آن در موادغذایی انسان وجود نداشته باشد بعضی کشورها این حد را صفر تعیین کرده‌اند، اتحادیه اروپا حد قابل قبولی را برای آفلاتوکسین B_1 و برای مجموع آفلاتوکسین‌ها اعلام داشته است پاره‌ای از کشورهای دیگر قوانین و مقررات خاص خود را دارند (مورفی و همکاران، ۲۰۰۶؛ ویلد و همکاران، ۲۰۰۲) براساس استاندارد ایران مقدار قابل قبول آفلاتوکسین B_1 در دانه‌های بادام‌زمینی ۵ پی‌پی‌بی اعلام شده است (استاندارد شماره ۳٤۱٦ ایران) لذا اگرچه میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های مورد آزمایش این تحقیق در دامنه قابل قبولی قرار داشتند اما درصد آلودگی به خود کپک *A. flavus* بالا بوده و این می‌تواند به‌عنوان یک عامل بالقوه خطرناک برای تشکیل آفلاتوکسین در آنها باشد.

علی‌رغم بالا بودن درصد آلودگی به کپک *A. flavus* میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های مورد آزمایش این تحقیق بسیار پائین و در اکثر موارد صفر بوده است. این نتیجه در هیچ مقاله دیگری گزارش نشده است پیشنهاد می‌شود با در نظر گرفتن عوامل مختلف مؤثر در تولید آفلاتوکسین در دانه‌های بادام‌زمینی برای یافتن دلایل قاطع طرح‌های تحقیقاتی جدیدی نگارش و انجام شود.

مقدار بسیار بالای آفلاتوکسین در یکی از نمونه‌ها و آلودگی شدید به خود کپک *A.. flavus* نیاز به بررسی منظم و اعمال روش‌های کنترل دقیق میزان آفلاتوکسین در انواع موادغذایی به‌خصوص آجیل‌ها را تأکید می‌کند. اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند به‌عنوان مبنایی برای آنالیز خطر آفلاتوکسین در بادام‌های زمینی عرضه شده در بازارهای کشور برای حفظ آفلاتوکسین در پائین‌ترین حد ممکن باشد. نگهداری و عرضه مواد غذایی به‌خصوص محصولاتی که به حمله کپک‌ها حساسیت دارند در شرایط باز و بدون بسته‌بندی (به‌صورت فله) کاری غیرعلمی و نامناسب است که تغییر رویه فروش و استفاده از بسته‌بندی مناسب و غیرقابل نفوذ از مهمترین آنهاست که پیشنهاد می‌شود.

جدول ۲- مقدار متوسط آفلاتوکسین در نمونه‌های بادام‌زمینی جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی ایران.

نوع/ استان	گیلان	مازندران	گلستان
کل	۰/۰۹۲ [1]	۰/۰۳۷	۰/۲٤
غلاف‌گیری شده	۰/۱٤	۰/۰۵	۰/٤۹
در غلاف	۰/۰۱	۰	۰
برشته	۰/۱	۰/۰٤	۰/۲٤
خام	۰/۰۸	پ. ن. [2]	پ. ن.

[1] براساس میکروگرم/ کیلوگرم

[2] پ. ن.= این شکل نمونه در بازار پیدا نشد.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم تا ضمن سپاس و ستایش از درگاه ایزد منان و تشکر از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همکارانشان از همکاری‌های ارزشمند و بی‌دریغ جناب آقای Reddy و همکارانشان در آزمایشگاه تشخیص آفلاتوکسین در موسسه تحقیقات بین‌المللی ICRISAT (پاتانچرو- حیدرآباد، هند) که بحق نقش شایان توجهی در انجام این پروژه ایفا نمودند، تشکر و سپاسگزاری نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1.Amin Shahidi, M. 1996. Study of afatxigenic aspergilli in Iranin native pistachios and toxigenic potential of Aspergillus in them. (MS dissertation). Tehran University.

2.AOAC official methods of analysis. 1995. Oils and fats. AOAC International, Virginia, USA.

3.Brown, R.L., Cleveland, T.E., Bhatnagar, D., and Cary, J.E. 1998. Recent advances in preventing mycotoxin contamination. In Sinha, K.K. and Bhatnagar, D. (eds.), Mycotoxin in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

4.Cheraghali, A.M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., and Zamanian, F. 2007. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. Food and Chemical Toxicology, 45 (5):812-816.

5.Chun, H.S., Kim, H.J., Ok, H.E., Hwang, Jin-B., and Chung, Duck-H. 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea .Food Chemistry .102 385–391

6.Eaton, D.L., and Groopman, J.D. 1994. The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press. NewYork, Pp. 383 - 426.

7.Gourama, H., and Bullerman, L.B. 1995. Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus, Aflatoxigenic fungi of concern in food and feed. Journal of Food Protection, 58:1305-1404.

8.Groopmann J.D., and Kensler Thomas, W. 1999. CRC Critical Reviews in Toxicology 1999 Chapter 19 113-124.

9.Hill, RA., Wilson, DM., McMillian, WW., Widstrom, RJ., Cole, Sanders, TH., and Blankenship, PD. 1985. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In Lacey, J., (ed.) Trichthecense and other mycotoxins. John Wiely & Sons Ltd., US.

10.Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1994. Peanuts -specification and methods of test, Isiri Number, 3416.

11.International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs, Vol. 1–42. IARC Scientific Publication, (Suppl. 7), IARC, Lyon.

12.International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), 2005. Aspergilus flavusseed infection and aflatoxin estimation by ELISA and aflatoxin management options in groundnut (a practical manual). pp. 18-22.

13.Jelinek, CF., Pohland, A.E., and Wood G., 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds. Journal of Association of Official Analytical Chemists. 72, 223-230.

14.Karki, T.B., and Sinha B.P., 1992. Mycotoxin contamination of foods and feeds in Nepal, In: Semple, R.L., Frio, A.S., Hicks, P.A. and Lozare, J.V. (eds.) Mycotoxin prevention and control in foodgrains(ebook)

15. Ketring, D.L., Benedict, C.R., and Yeager, M. 1976. Growing season and location effect on water uptake and drying re of peanut seeds from genotype resistant to invasion by *A. flavus* LKex.Fr. Agronomy Journal, 68: 661-665.

16.Kiran, D.R., Narayana, K.J.P., and Vijayalakshmi, M. 2005. Aflatoxions B1 production in chilies (*Capsicum annum L.*) kept in cold stores. African Journal of Biotechnology, 4: 791-795.

17.Lipigorngoson, S., Limtrakul, P., Suttajit, M., and Yoshizawa, T. 2003. In-house direct cELISA for determining aflatoxin B1 in Thai corn and peanuts. Food Addit Contam., 20(9):838-45.

18.Mahdaviyan, S.M. 2005. Peanut stripper set (a report of an invention). Manager of Jahad-Keshavarzy ministry, Astane Ashrafiye, Gilun, Iran Pp 3-9.

19.Mehan, V.K., McDonald, D., and Gibbons, R.W. 1982. Seed colonization and aflatoxin production in groundnut genotyes inoculated with different strains of *Aspergillus flavus*. Oleagineux, 37:185-191.

20.Mehan, V.K., Reddy, SV., Nahdi, S., McDonald, D., and Jayanthi, S. 1995. Aflatoxin- producing potential of various strains of *Aspergillus flavus* from groundnut fields in different soil types. IAN 15: 42-43.

21.Moammadi Mohadam, M. 1999. Evaluation of sensevity of Iranian pistachios to A. flavus and study of aflatoxin B1 contents (MS dissertation). Tarbiat Modarres University.

www.SID.ir

Archive of SID

22. Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., and Bryant, C.M. 2006. Food Mycotoxins: An Update, Journal of Food Science 71(5):R51.
23. Ogunsanwo, B.M., Faboya, O.O.P., Idowu O.R., Lawal O.S., and Bankole S.A. 2004. Effect of roasting on the aflatoxin contents of Nigerian peanut seeds. African Journal of Biotechnology 3 (9): 451-455.
24. Palaniami, A., Manickam, A., and Neelakantan, 1990. Fungal flora and aflatoxin production in relation to post-harvest practices in groundnut. Madras Agric.J. 77(1): 26-31.
25. Pettit, RE. 1985. Incidence of aflatoxin in groundnuts as influenced by seasonal changes in environmental conditions- a review. Agrometeorology of groundnut, Proceedings of an International symposium, 21-26 Aug 1985, ICRIST, Patancheru, India.
26. Reddy, S.V., Mayi, D.K., Reddy, M.U., Thirumala-Devi, K., Reddy, DVR. 2001. Aflatoxions B1 in different grades of chilies (*Capsicum annum*) in India as determined by indirect competitive-ELISA. Food Additives and Contaminants. 18, 553- 558.
27. Rodricks J.V. 2007. Calculated Risks: The Toxicity and Human Health Risks of Chemicals in our Environment, 2nd Edition, Cambridge University Press, and Cambridge, UK.
28. Saad, N., (Creator of webpage), 2005. Aflatoxins: occurrence and health risks, available at: http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html.
29. SAS. 2001. SAS user's guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC.
30. Smith, A.F. 2002. Peanuts: the illustrious history of the Goober pea. Chicago: University of Illinois press, 272Pp. Illinois, USA.
31. Tangthirasunan, T. 1992. Mycotoxin economic aspects, In: Semple, R.L., Frio, A.S., Hicks, P.A. and Lozare, J.V.(eds.) Mycotoxin prevention and control in foodgrains (ebook).
32. Vasanthi, S., and Bhat, R.V. 1998. Mycotoxin in foods–occurrence, health and economic significance and food control measures. Indian Journal of medical Research, 108, 212- 224.
33. Widstrom, N.W., McMillian, W.W., Wilson, D.M., Richard, J.L., Zummo, N., and Beaver, R.W. 1994. Preharvest aflatoxin contamination of maize inoculated with *Aspergilus flavus* and *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 128: 119-123
34. Wild, C.P., and Turner, P.C. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions, Mutagenesis vol.17 (6): 471–481.
35. Wilson, D.M. 1989. Analytical methods for aflatoxin in corn and peanuts. Archives Environmental Contamination and Toxicology. 18: 303-314.
36. Wilson, D.M., and Abramson, D. 1992. Mycotoxins, In: Sauser, DB.(eds), Storage of cereal grains and their products. Amer Assn of cereal chemists, 615Pp. NewYork, USA.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(1), Apr -May 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Determination of aflatoxin contamination and *Aspergillus flavus* infection of groundnuts from northern provinces of Iran

[*]M. Khomeiri[1], Y. Maghsoudlou[2], P. Lava Kumar[3], F. Waliyar[3] and S. Hasani[4]
Asisstant Prof, Dept. of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Associate Prof., Dept. of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics ICRISAT, India, [4]Asisstant Prof, Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

Aflatoxins are the toxic secondary metabolites produced by *Aspergillus flavus* and related fungi in foods such as groundnut. They are carcinogenic, mutagenic, teratogenic and immunosuppressive agents that cause adverse affects on human and animal health. In this study 156 groundnut samples collected from markets in Northern provinces of Iran (Gilan, Mazandran and Golestan) were examined for aflatoxin B1 concentration (µg/kg) by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and *A. flavus* seed infection in groundnuts was determined by blotter plate method. This revealed *A. flavus* seed infection in 58.23%, 46.67% and 36.9% of groundnut samples collected from Golestan, Mazandran and Gilan, respectively, with the percent seed infection between 8 and 100%. Only one sample conatined 491 µg/kg of aflatoxin and in the remaining samples the toxin concentration was within the acceptable limit of 5µg/kg. There was no significant variation in toxin concenration ($P>0.05$) between groundnut samples collected from different provinces. There was no significant difference in *A. flavus* seed infection in samples from Golestan and Mazandran ($P>0.05$), but there was significant difference in samples from Gilan with samples from Golestan and Mazandran ($P<0.05$). This study revealed high *A. flavus* seed infection in groundnut samples from markets, but aflatoxin concentration was within the limits in most of the samples probaly due to unfavorable conditions for toxin production. However, seed predisposed to *A. flavus* poses potential risk for high aflatoxin contamination under congenial storage conditions.

***Keywords*:** Aflatoxin; *Aspergillus flavus*; Groundnut; ELISA; Northern prorvince of Iran

*- Corresponding Author; Email: Khomeiri@gau.ac.ir

www.SID.ir