مقاله پژوهشی

بررسی آلودگی برنج های مصرفی وارداتی به مایکوتوکسین و قارچ های مولد آن در شهر زابل

نویسندگان:

سعید امانلو*[1]، محمدرضا رضایی کیخا[2]، عباسعلی رمضانی[3]، لیلا میر[4]

۱- گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

۲- گروه شیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- گروه اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

۴- گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 12, No. 1, spring 2014

چکیده:

مقدمه: اثرات مضر مایکوتوکسین ها بر اندام های مختلف بدن انسان و حیوان شدید و زیان های اقتصادی ناشی از آن ها وسیع می باشد. آلودگی غلات و به ویژه برنج به انواع مایکوتوکسین به عنوان مسئله ای مهم در حوزه بهداشت مواد غذایی و سلامت عمومی جامعه مطرح است. با عنایت به جایگاه ویژه برنج در سبد غذایی خانوارهای ایرانی و مصرف بالای برنج و مشتقات آن ، تحقیق حاضر با هدف بررسی آلودگی برنج های وارداتی مصرفی شهرستان زابل از نظر آلودگی به مایکوتوکسین ها و قارچ های مولد آن انجام شد.

روش کار: در این پژوهش، تعداد ۱۲۳ نمونه برنج به روش غیراحتمالی آسان جمع آوری و پس از اندازه گیری رطوبت دانه های آن ها، نمونه ها از نظر آلودگی قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی، چهار نوع مایکوتوکسین رایج برنج شامل: آفلاتوکسین ، اکراتوکسین، زیرالنون و داکسی نیوالنول با استفاده از روش HPLC اندازه گیری شدند. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته ها: میانگین رطوبت دانه‌های برنج ۰/۵۳±۱۱/۵۹ بود. بررسی آزمایشگاهی نشان داد که از ۱۲۳ نمونه مورد آزمایش، تعداد ۳۴ نمونه (۲۷/۶ درصد) دارای آلودگی عمقی با تهاجم قارچ به بافت برنج می باشند. بیش ترین آلودگی به ترتیب مربوط به آسپرژیلوس نیجر (۷ نمونه، ۵/۷ درصد)، آسپرژیلوس فلاووس (۵ نمونه، ۴/۱ درصد) و پنی سیلیوم و کاندیدا هرکدام (۴ نمونه، ۳/۳ درصد) بود. در هیچ کدام از نمونه ها، آلودگی مایکوتوکسینی بیش از میزان مجاز مشاهده نشد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان داد که با وجود آلودگی قارچی نمونه ها، آلودگی به مایکوتوکسین در همه نمونه ها صفر یا نزدیک به صفر است. این نتایج با گزارشات سازمان استاندارد کشور در خصوص آلودگی مایکوتوکسینی برنج های وارداتی مطابقت دارد.

واژگان کلیدی: مایکوتوکسین‌ها، اکراتوکسین‌ها، زیرالنون، داکسی نیوالنول، بیماری قارچی، برنج

J Jahrom Univ Med Sci 2014; 12(1): 17-25

مقدمه:

محصولات کشاورزی از جمله دانه های روغنی، خشکبار، میوه-های خشک و بیش تر غلات مستعد آلودگی های قارچی هستند. سه قارچ عمده آلوده کننده برنج عبارتند از: آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم. این قارچ ها با حمله به محصولات کشاورزی باعث تغییر رنگ، کاهش بازار پسندی، شکنندگی، آسیب پذیری و آلودگی آن ها به سم قارچی می شوند [۱،۲]. با وجود مقاومت ذاتی برنج نسبت به عفونت های قارچی، این محصول در طول دوره کشت، داشت، برداشت و انبارداری در معرض تماس و آلودگی با عناصر قارچی می باشد. یکی از عوامل مهم و زمینه ساز آلودگی برنج، درصد رطوبت این محصول است. نتایج مطالعات مختلف حاکی از آن است که

* نویسنده مسئول، نشانی: زابل، خیابان شهید رجایی، مجتمع آموزشی دانشگاه علوم پزشکی زابل. کد پستی: ۹۸۶۱۶۱۵۸۸۱

تلفن تماس: ۰۹۳۹۸۷۹۷۹۱۲ دورنگار: ۰۵۴۲۲۲۵۴۵۴۳ پست الکترونیک: ama.myco@gmail.com

دریافت:۹۲/۵/۲۷ اصلاح: ۹۲/۷/۲۰ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۶

آلودگی با آفلاتوکسین و عفونت آسپرژیلوسی با میزان رطوبت موجود در برنج های انبار شده رابطه مستقیم دارد [۳].
بارندگی زیاد و مداوم در مناطق پر باران، محصول برنج را به ویژه در مناطق گرم، مستعد آلودگی و تهاجم قارچی و باکتری می‌کند. در فصول مرطوب با وجود تلاش کشاورزان برای خشک کردن محصول با کمک اشعه آفتاب، این فرایند به طور مطلوب انجام نشده و رطوبت دانه ها به میزان قابل قبولی کاهش نمی‌یابد. محصولات با رطوبت بالا برای انبارداری مناسب نمی باشند و نتیجه آن آلودگی و عفونت قارچی در زمان برداشت یا طی دوره انبارداری خواهد بود. بنابراین شرایط آب و هوایی و همچنین کیفیت انبارداری دو عامل مهم و تعیین کننده در آلودگی برنج به مایکوتوکسین‌ها می باشند [۴، ۳]. این آلودگی ها در شرائط مطلوب رشد منجر به تولید سموم قارچی می شوند. بر اساس برآوردهای سازمان جهانی بهداشت، سالیانه یک چهارم محصولات تولید شده تحت تأثیر سموم قارچی قرار می گیرند و میزان زیان های ناشی از حذف مواد غذایی آلوده و خسارات وارده به محصولات کشاورزی در آمریکا در هر سال ۱۰۰ میلیون دلار برآورد می شود. علاوه بر تاثیر نامطلوب روی محصولات کشاورزی، مایکوتوکسین ها روی تولیدات دامی نیز اثر مخرب دارند. زیان های اقتصادی شامل خسارات اقتصادی وارده به صنعت دامپروری، تلفات دام و طیور، کاهش میزان تخم‌گذاری، کاهش باروری، شیوع بیماری های دامی در دامداری ها و مرغداری ها، ضعیف شدن سیستم ایمنی دام ها، کاهش رشد و تولید مثل، افزایش ضریب تبدیل مواد غذایی و هزینه های برنامه ریزی جهت کاهش خطرات می باشد. علاوه بر این، شیر، تخم و گوشت این حیوانات نیز می تواند حاوی باقیمانده سموم قارچی باشد [۵]. این سموم ترکیبات مقاومی هستند که در چرخه طبیعت به مدت طولانی گردش کرده و از طریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان می شوند. هرچند مقادیر سموم مصرفی در انسان بسیار اندک است، ولی به دلیل خاصیت تجمعی مایکوتوکسین ها، در بلند مدت عوارض سمی آن ها بروز کرده و اختلالات متعددی از جمله سرطان، اختلالات کبدی، گوارشی، خونی و کلیوی ایجاد می کنند [۷، ۶].
از میان مایکوتوکسین‌های متعددی که آلوده‌کننده برنج می‌باشند، آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A بیش‌ترین تأثیر سمی را بر پستانداران داشته و با خاصیت هپاتوتوکسیک، تراتوژنیک و موتاژنیک منجر به اختلالاتی از قبیل هپاتیت، خونریزی، ادم، سرکوب سیستم ایمنی، کارسینومای کبدی و مسمومیت کلیوی می شوند. آژانس بین المللی تحقیقات سرطان در سال ۱۹۹۳ آفلاتوکسین B1 را در گروه 1 و فومانیزین B1 و B2 را در گروه B2 مواد کارسینوژن انسانی طبقه بندی کرده است [۸، ۵]. گستردگی جهانی مایکوتوکسین‌ها در برنج و غلات و سمی بودن آن ها برای انسان و حیوان، ضرورت تعیین مقدار این ترکیبات را در غلات اجتناب ناپذیر کرده است [۹]. طبق اسناد سازمان ملی استاندارد کشور مقدار بیشینه رواداری آفلاتوکسین B1 میزان ۵ نانوگرم بر گرم، مجموع انواع آفلاتوکسین ها ۳۰ نانوگرم بر گرم، اکراتوکسین ۵ نانوگرم بر گرم، داکسی نیوالنون ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم و زیرالنون ۲۰۰ نانوگرم بر گرم اعلام شده است. آلودگی غلات به ویژه برنج به مایکوتوکسین ها و طیف وسیع اثرات سوء آن ها بر اندام های مختلف بدن انسان و حیوان و همچنین زیان های اقتصادی حاصل، این آلودگی را به مسئله ای مهم در حوزه بهداشت مواد غذایی و سلامت عمومی جامعه تبدیل کرده است. تحقیقات متعدد انجام شده در کشور در خصوص موارد آلودگی مواد غذایی به انواع متفاوت مایکوتوکسین ها مهر تأییدی بر اهمیت موضوع می باشد [۱۲، ۱۱، ۱۰]. با توجه به موارد فوق و با عنایت به جایگاه ویژه برنج در سبد غذایی خانوارهای ایرانی و مصرف بالای برنج و مشتقات آن در جامعه، تحقیق حاضر با هدف بررسی برنج های وارداتی مصرفی شهرستان زابل از نظر آلودگی به مایکوتوکسین ها و قارچ های مولد آن انجام گرفت.

روش کار:

در این پژوهش، تعداد ۱۲۳ نمونه برنج به روش غیر احتمالی آسان از مراکز فروش برنج سطح شهر جمع آوری شد. از محموله های برنج به روش طبقه ای و از قسمت میانی آن ها به مقدار ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم در پاکت کاغذی استریل نمونه برداری شد. پس از جمع آوری داده های مرتبط، نمونه ها در کیسه نایلونی نگهداری شدند.
برای اندازه گیری درصد رطوبت برنج، پس از آسیاب کردن نمونه ها، ۵ گرم از هر نمونه در آون مدل memert ساخت کشور آلمان در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت حرارت داده شد. سپس نمونه ها در دسیکاتور سرد و تفاوت وزن بوته چینی قبل و بعد از حرارت دادن محاسبه شد.
برای بررسی آلودگی قارچی نمونه ها، از هر نمونه ۱۵ دانه برنج که از نظر شکل ظاهری نشانه هایی از آسیب بافتی به صورت تغییر رنگ و شکنندگی بافت دانه داشته اند، انتخاب و پس از ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد، با آب مقطر استریل به منظور رفع بقایای هیپوکلریت سدیم چندین بار شسته شدند. این دانه ها در شرایط استریل در زیر هود آزمایشگاهی ابتدا به وسیله اسکالپل استریل خرد شده و سپس در پلیت های حاوی محیط کشت (YGC) کشت شدند [۱۳]. به منظور تفکیک بهتر دانه های برنج کشت شده در داخل محیط،

در هر پلیت پنج دانه برنج و در مجموع پانزده عدد از هر نمونه برنج در سه پلیت کشت داده شدند. برای تعیین هویت دقیق قارچ های ایزوله شده، کشت روی لام به روش ریدل انجام شد. پلیت ها به مدت حداکثر ۳۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در طی این مدت، با بازرسی مرتب پلیت ها، کلنی های قارچی شناسایی، شمارش و درصد آلودگی، تعداد کلنی های قارچی رشد کرده و همچنین نوع قارچ های آلوده-کننده تعیین شدند. شناسایی قارچ های آلوده کننده بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، ساختمان اسپورزایی و آزمایش های بیوشیمیایی بود [۱۵ و ۱۴]. فراوانی و شاخص های مرکزی داده‌های مربوط به میزان آلودگی، جنس و گونه قارچ های آلوده‌کننده مشخص شد. برای آزمون اختلاف میانگین آلودگی نمونه‌های مختلف و مقایسه با یکدیگر از آزمون مربع کای پیرسون استفاده شد.

نمونه های ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرمی جمع آوری شده از محموله های برنج فروشگاه های سطح شهر بعد از بررسی آلودگی قارچی، از نظر نوع محصول به چهار دسته اصلی طبقه بندی و در هم ادغام شدند، به طوری که برای هر دسته مقدار ۴ تا ۵ کیلو گرم برنج گردآوری شد. این برنج های مخلوط سپس آسیاب شده و از نظر آلودگی مایکوتوکسینی به روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی (HPLC) مورد بررسی قرار گرفتند. دستگاه HPLC مورد استفاده در این تحقیق از نوع HPLC Agilent Technologies 1200 Series ساخت کشور آلمان بود.

اندازه گیری آفلاتوکسین ها:

روش اندازه گیری آفلاتوکسین ها در این تحقیق، روش HPLC مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ شامل سه مرحله استخراج، تشخیص و تعیین مقدار بود. جداسازی با استفاده از ستون فاز معکوس، تشخیص به روش کبراسل و تعیین مقدار با کمک آشکارساز فلورسانس، مقایسه سطح زیر منحنی استاندارد با نمونه مجهول و لحاظ ضریب رقت انجام شد. در این خصوص، پس از آسیاب کردن نمونه ها، مقدار ۵۰ گرم از نمونه برنج آسیاب شده همراه با ۵ گرم نمک Nacl و ۲۰۰ میلی لیتر حلال متانول ۸۰ درصد به مدت سه دقیقه مخلوط شدند. پس از عبور دادن عصاره به دست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ ، مقدار ۲۰ میلی لیتر از آن با ۱۳۰ میلی لیتر آب مخلوط و از کاغذ صافی با الیاف شیشه ای و قطر چشمه های ۱/۶ میکرومتری گذرانده شد. ۷۵ میلی لیتر از این عصاره از ستون ایمونوافینیتی آماده شده مخصوص آفلاتوکسین ها با سرعت ۳-۲ میلی لیتر در دقیقه معادل یک قطره در ثانیه عبور داده شد و سپس با گذراندن ۱۵۰۰ میکرولیتر متانول از ستون، تا آخرین قطره آن در یک ویال تمیز جمع آوری شد. محتویات ویال با ۱۵۰۰ میکرولیتر آب رقیق و با ورتکس به خوبی مخلوط شد. محلول های استاندارد کاری با حجم ۲۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون با لحاظ تغییرات جرم سم استاندارد بر حسب نانوگرم روی محور طول ها و تغییرات سطح زیر منحنی روی محور عرض ها رسم شد. سپس عصاره نهایی نمونه با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد و میزان آلودگی با استفاده از منحنی کالیبراسیون و مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه مجهول و با لحاظ ضریب رقت محاسبه شد. برای شناسایی آفلاتوکسین از آشکارساز فلورسانس با طول موج تهییج ۳۶۵ نانومتر و نشر ۴۳۵ نانومتر استفاده شد.

اندازه گیری اکراتوکسین:

روش اندازه‌گیری اکراتوکسین در این تحقیق مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲۳۸ انجام گرفت. مراحل جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار با روش HPLC به ترتیب با استفاده از ستون فاز معکوس، کبراسل، آشکارساز فلورسانس با طول موج تهییج ۳۳۳ و نشر ۴۷۷ نانومتر و مقایسه سطح زیر منحنی استاندارد با نمونه مجهول و با لحاظ ضریب رقت انجام شد. برای این منظور، پس از آسیاب کردن نمونه های برنج، مقدار ۲۵ گرم از نمونه های آسیاب شده همراه با ۱ گرم نمک Nacl و ۱۰۰ میلی لیتر حلال استخراج اکراتوکسین به مدت سه دقیقه مخلوط شدند. عصاره به دست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و ۱۰ میلی لیتر از عصاره صاف شده با ۵۰ میلی لیتر محلول PBS رقیق شد. سپس محلول رقیق شده از کاغذ صافی با الیاف شیشه ای ۱/۶ میکرومتری عبور داده و مقدار ۵۵ میلی لیتر از عصاره از ستون مخصوص اکراتوکسین با سرعت ۳-۲ میلی لیتر در دقیقه معادل یک قطره در ثانیه گذرانده شد. سم متصل شده به آنتی بادی درون ستون از طریق گذراندن ۱۵۰۰ میکرولیتر متانول– اسید استیک (به نسبت ۹۸ به ۲) از داخل ستون شسته شده، درون ویال تمیز جمع آوری و با ۱۵۰۰ میکرولیتر آب رقیق شد. برای اندازه‌گیری، ابتدا محلول های استاندارد کاری با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون رسم شد. سپس عصاره نهایی نمونه با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و میزان آلودگی با استفاده از منحنی کالیبراسیون و مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه مجهول و با احتساب ضریب رقت محاسبه شد.

اندازه گیری زیرالنون:

اندازه گیری زیرالنون مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲۳۹ انجام شد. پس از آسیاب کردن نمونه های برنج، مقدار ۲۵ گرم از نمونه برنج آسیاب شده همراه با ۱ گرم نمک Nacl و ۱۰۰ میلی لیتر حلال استخراج زیرالنون به مدت سه دقیقه مخلوط شدند. عصاره بدست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و ۱۰ میلی لیتر از عصاره صاف شده با ۶۵ میلی لیتر آب رقیق شد. محلول رقیق شده از کاغذ صافی با الیاف شیشه ای ۱/۶ میکرومتری عبور داده شد. سپس ۶۵ میلی لیتر از عصاره رقیق شده از ستون ایمونوافینیتی دارای آنتی بادی های ویژه زیرالنون با سرعت یک قطره در ثانیه گذرانده شد. سم متصل به آنتی بادی در درون ستون، توسط عبور ۲۰۰۰ میکرولیتر متانول از داخل ستون شسته، تا آخرین قطره وارد ویال شده و با ۲۰۰۰ میکرولیتر آب رقیق و توسط ورتکس مخلوط شد. جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار به ترتیب با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس، آشکارساز اشعه ماورابنفش با طول موج ۲۷۵ نانومتر و یا آشکارساز فلورسانس با طول موج تهییج ۲۷۵ نانومتر و نشر ۴۵۰ نانومتر، مقایسه سطح زیر منحنی های استاندارد زیرالنون با نمونه مجهول و با لحاظ ضریب رقت انجام شد. برای اندازه گیری، ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول های استاندارد کاری زیرالنون مندرج به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون رسم شد. سپس عصاره نهایی نمونه با حجم ۱۵۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و میزان آلودگی با استفاده از منحنی کالیبراسیون و مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه مجهول و با لحاظ ضریب رقت محاسبه شد.

اندازه گیری داکسی نیوالنول:

اندازه گیری داکسی نیوالنول در این تحقیق مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۲۱۵ انجام شد. برای این کار، پس از آسیاب کردن نمونه های برنج، مقدار ۲۵ گرم از نمونه برنج آسیاب شده همراه با ۱ گرم نمک Nacl و ۱۰۰ میلی لیتر حلال استخراج DON به مدت ۳ دقیقه مخلوط شدند. عصاره به دست آمده را از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و ۵ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده از ستون های DONSPE عبور و داخل ویال جمع آوری شد. برای شستشوی ستون، ۲/۵ میلی لیتر محلول استونیتریل ۸۴٪ از ستون عبور داده شده و در همان ویال جمع آوری شد (محتویات ویال به حجم ۷/۵ میلی لیتر رسید). ویال در دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد بن ماری و در مجاورت فشار هوا (پمپ خلاء) به طور کامل خشک شد. سپس یک میلی لیتر از حلال فاز متحرک داکسی نیوالنول به آن اضافه و به وسیله ورتکس به مدت یک دقیقه و سپس به وسیله سونیکاتور به مدت یک دقیقه مخلوط شد. محتویات ویال برای بار دوم به مدت یک دقیقه با ورتکس مخلوط شد.

برای اندازه گیری، ابتدا محلول های استاندارد کاری داکسی نیوالنول به مقدار ۵۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون رسم شد. سپس عصاره نهایی نمونه با حجم ۲۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و تشخیص داکسی نیوالنول با آشکارساز ماورابنفش و در طول موج ۲۱۸ نانومتر انجام شد. پیک های حاصل با پیک های استاندارد مقایسه و میزان آلودگی با استفاده از منحنی کالیبراسیون و مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه مجهول و با لحاظ ضریب رقت محاسبه شد.

یافته ها:

در این پژوهش، تعداد ۱۲۳ نمونه از چهار نوع برنج عمده وارداتی مصرفی شهرستان زابل جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. برنج مصرفی زابل به طور عمده از کشورهای هند و پاکستان وارد می شوند. طبق اطلاعات به دست آمده از فروشندگان خرد و کلان، برنج های وارداتی از مرزهای زمینی و دریایی وارد استان می شوند، مارک تجاری ثبت شده بر روی بسته های برنج مربوط به شرکت های بسته بندی بوده و تا حدودی درجه و کیفیت برنج را تعیین می کند.

درصد رطوبت مجاز برای برنج بر اساس استانداردهای موجود حداکثر ۱۴ درصد می باشد. در این مطالعه میانگین درصد رطوبت نمونه های مورد بررسی ۱۱/۵۹±۰/۵۳ درصد بود.

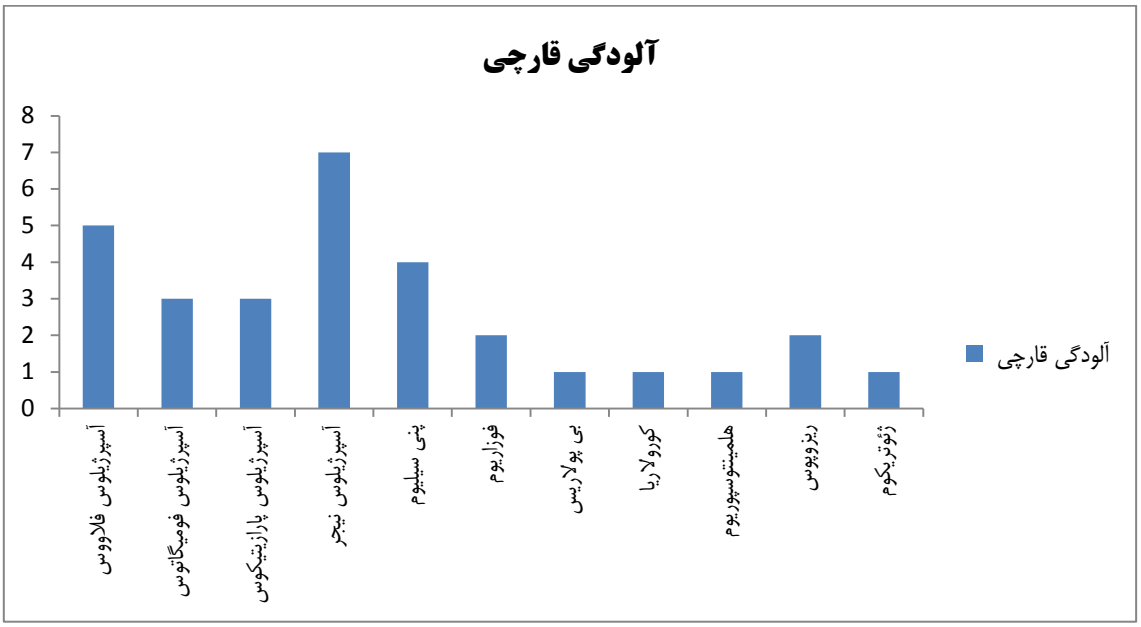
در جدول شماره ۱ می توان میزان آلودگی نمونه ها به تفکیک نوع برنج آورده شده است. (جدول ۱)

جدول ۱: آلودگی قارچی برنج های مصرفی شهر زابل بر حسب نوع نمونه

ردیف	نوع نمونه	برنج های آلوده		برنج های غیر آلوده		نتایج آزمون آماری
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۱	برنج سفید پاکستانی	۱۱	٪۳۴/۴	۲۱	٪۶۵/۶	Pearson chi-square=۱/۲۷۲ Df= ۳ P=۰/۷۳۶
۲	برنج زرد پاکستانی	۸	٪۲۶/۷	۲۲	٪۷۳/۳	
۳	برنج زرد هندی	۷	٪۲۱/۹	۲۵	٪۷۸/۱	
۴	برنج سفید تایلندی	۸	٪۲۷/۶	۲۱	٪۷۲/۴	
۵	جمع کل	۳۴	٪۲۷/۶	۸۹	٪۷۲/۴	

نتایج آزمون آماری نشان داد بین انواع نمونه های برنج مورد آزمایش از نظر آلودگی قارچی تفاوت معناداری وجود ندارد (P=۰/۷۳۶ , df=۳). با این وجود بیش ترین درصد آلودگی مربوط به برنج سفید پاکستانی (۳۴/۴٪) و کمترین آلودگی در ارتباط با برنج زرد هندی (۲۱/۹٪) بوده است.

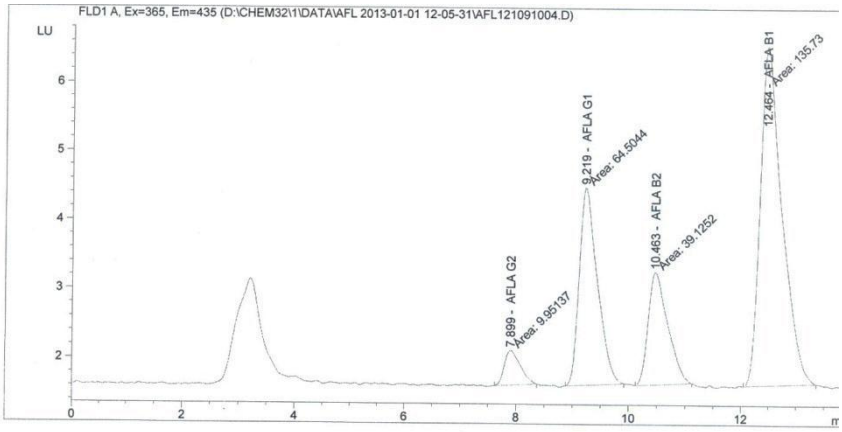
بررسی آزمایشگاهی نمونه ها نشان داد که از ۱۲۳ نمونه مورد آزمایش، تعداد ۳۴ نمونه (۲۷/۶ درصد) آلودگی دارند و بیشترین آلودگی به ترتیب مربوط به آسپرژیلوس نیجر (۷ نمونه، ۵/۷ درصد)، آسپرژیلوس فلاووس (۵ نمونه، ۴/۱ درصد) و پنی سیلیوم و کاندیدا هرکدام (۴ نمونه، ۳/۳ درصد) بوده است. در نمودار شماره ۱ توزیع فراوانی جنس و گونه قارچ های آلوده-کننده برنج های وارداتی مصرفی شهر زابل آورده شده است.



نمودار ۱: توزیع فراوانی جنس و گونه قارچ های آلوده کننده برنج های وارداتی مصرفی شهرستان زابل

اندازه گیری مایکوتوکسین ها:

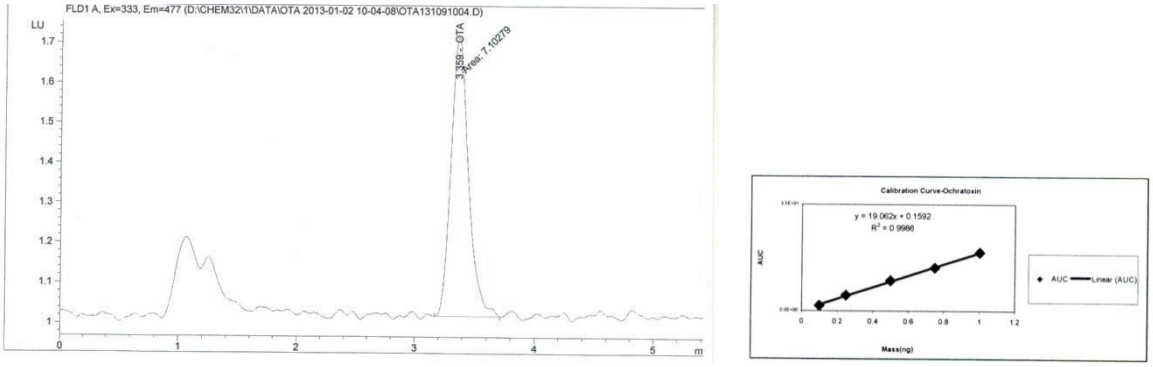
تصویر شماره ۱ کروماتوگرام به دست آمده برای هر چهار نوع آفلاتوکسین را نشان می دهد. اندازه گیری با آشکارساز فلورسانس در طول موج های ۴۳۵ نانومتر و ۳۶۵ نانومتر انجام شده است.



تصویر ۱: کروماتوگرام HPLC آفلاتوکسین های B_1, B_2, G_1, G_2 در نمونه برنج آل

بر اساس نتایج به دست آمده، در نمونه برنج پاکستانی مقدار آفلاتوکسینB1 به مقدار ۱/۰۲ نانوگرم بر گرم و مقدار کل آفلاتوکسین ۱/۱۴ نانوگرم بر گرم بوده است. همچنین میزان آفلاتوکسین کل برای نمونه برنج نباتی پاکستانی ۰/۳۵ نانوگرم بر گرم، برنج نباتی هندی ۰/۷۵ نانوگرم بر گرم و برنج سفید تایلندی ۰/۱۱ گرم اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده نشان می دهد که میزان آفلاتوکسین در تمام نمونه ها در گستره مجاز آن برای برنج قرار دارد، هرچند میزان قابل توجه آفلاتوکسینB1 در نمونه برنج سفید پاکستانی در مقایسه با سایر آفلاتوکسین ها قابل تأمل است.

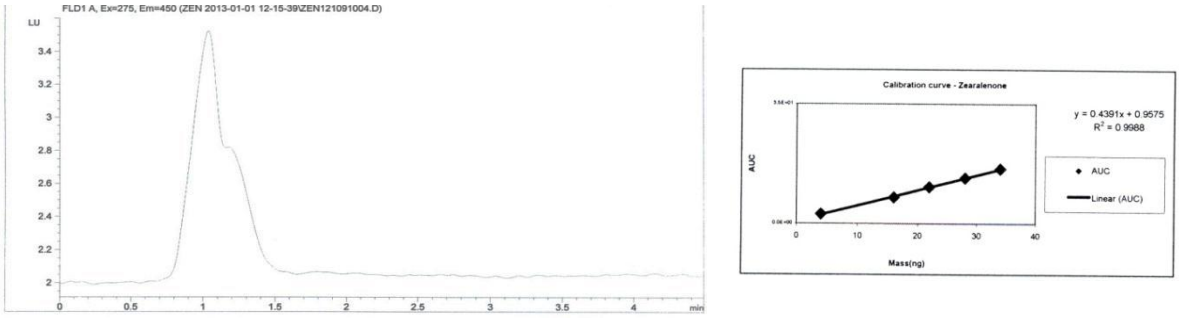
نمودار شماره ۲ منحنی کالیبراسیون و کروماتوگرام اکراتوکسین بدست آمده را نشان می دهد.



نمودار ۲: کروماتوگرام HPLC و منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت اکراتوکسین در نمونه های برنج

نتایج نشان داد که مقدار اکراتوکسین حتی تا سطح LOQ=0/790 ppb برای دستگاه قابل تشخیص نبوده و نتیجه آزمایش نمونه های برنج از نظر وجود اکراتوکسین منفی می‌باشد.

برای اندازه گیری زیرالنون ابتدا استانداردهای کاری زیرالنون با غلظت های مشخص برای به دست آوردن منحنی کالیبراسیون به دستگاه HPLC تزریق شد و سپس نمونه های مجهول با آشکارساز فلورسانس در طول موج های ۴۵۰ نانومتر و ۲۷۵ نانومتر اندازه گیری شد. نمودار شماره ۳ منحنی کالیبراسیون و کروماتوگرام زیرالنون را نشان می دهد.

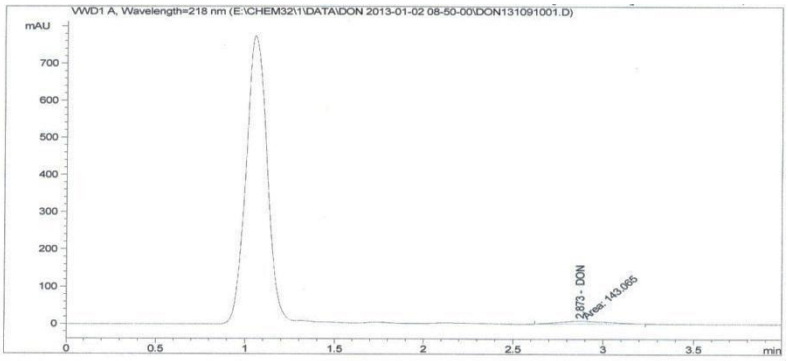


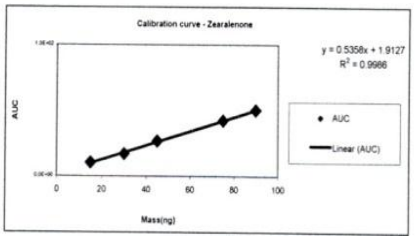
نمودار ۳: کروماتوگرام HPLC و منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت زیرالنون در نمونه های برنج

نتایج بدست آمده برای زیرالنون در چهار نوع برنج مورد آزمایش منفی است. مقدار زیرالنون حتی تا سطح LOQ=18/400 ppb برای دستگاه غیرقابل تشخیص بود.

برای اندازه گیری داکسی نیوالنول ابتدا استانداردهای کاری با غلظت مشخص این سم به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون رسم شد. سپس نمونه های مجهول با آشکارساز ماورابنفش در طول موج ۲۱۸ نانومتر اندازه گیری شدند.

نمودار شماره ۴ منحنی بدست آمده از تزریق استانداردها و رگرسیون نمودار و کروماتوگرام بدست آمده را برای داکسی نیوالنول نشان می دهد.





نمودار ۴: کروماتوگرام HPLC و منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت داکسی نیوالنول در نمونه های برنج

نتایج آزمایش آلودگی به داکسی نیوالنون برای چهار نمونه برنج وارداتی منفی بود. میزان داکسی نیوالنول در تمام نمونه ها تا سطح LOQ=293/600 ppb برای دستگاه غیر قابل تشخیص بود.

بحث:

بر اساس استانداردهای موجود، درصد رطوبت مجاز برای برنج حداکثر ۱۴ درصد می باشد. در این مطالعه میانگین درصد رطوبت نمونه های مورد بررسی (۱۱/۵۹±۰/۵۳) در محدوده استاندارد بود. این میزان می تواند به عنوان یک عامل کلیدی موثر در کاهش آلودگی قارچی و تولید مایکوتوکسین ها در محصول باشد.

نتایج حاصل از پژوهش اخیر نشان داد که شیوع آسپرژیلوس فلاووس بیش تر از آسپرژیلوس پارازیتیکوس می باشد. شاید بتوان این اختلاف را به رطوبت پایین نمونه های مطالعه حاضر (۱۱/۵۹±۰/۵۳) نسبت داد. به بیان دیگر، شرایط رشد ایده آل برای آسپرژیلوس پارازیتیکوس تأمین نشده است.

بیش ترین آلودگی برنج به آسپرژیلوس ها در زمان انبارداری و به خصوص با افزایش شپش یا سوسه برنج گزارش شده است [۱۶]. ریدی و همکاران و رقاواندر و همکاران، ارتباط بین تهاجم حشرات و افزایش عفونت آسپرژیلوس فلاووس را در مطالعات خود نشان داده اند [۱۸، ۱۷]. در پژوهش حاضر در دو نمونه (۱/۶درصد) آلودگی به سوسه برنج مشاهده شد. این نوع آلودگی می تواند ناشی از انبارداری نامناسب و طولانی مدت برنج باشد.

هرچند گونه های آسپرژیلوس از دانه های برنج جداسازی شده بودند، ولی آلودگی به آفلاتوکسین بسیار کم تر بود [۱۹]. با این وجود، برنج های آلوده که تغییر رنگ داده از نظر بازار پسندی با مشکل مواجه هستند و بدین ترتیب از نظر قیمت و کیفیت تنزل پیدا می کنند. مطالعه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی حاکی از تهاجم عناصر قارچی آسپرژیلوس به بخش های مختلف دانه برنج می باشد [۲۰].

هر کدام از عوامل قارچی در شرایط اکوسیستم خاصی می‌توانند برنج را مورد تهاجم قرار دهند. آسپرژیلوس ها در برنج انبار شده در شرایط رطوبت بالا بیش ترین آلودگی را ایجاد می کنند. البته سهم عمده ای از این آلودگی ها به عنوان کلونیزاسیون سطحی مطرح بوده و بعد از شستشو با مواد ضد عفونی، آلودگی قارچی درون برنج با فراوانی خیلی کمتر از قبل قابل اندازه‌گیری است [۲۲، ۲۱]. در پژوهش حاضر، مقایسه آلودگی سطحی نمونه ها (۹۸ مورد، ۷۹/۶ درصد) با آلودگی بافت های عمقی دانه های برنج (۳۴ مورد، ۲۷/۶ درصد) می تواند مدرکی دال بر کلونیزاسیون سطحی اسپورهای قارچی باشد. با پخت قبل از مصرف برنج، خطرات احتمالی ناشی از این کلونیزاسیون برطرف می شود، ولی اگر شرایط انبارداری نامناسب زمینه را برای تهاجم قارچ به بافت های درونی برنج مهیا سازد، احتمال تولید مایکوتوکسین و عوارض ناشی از آن افزایش می یابد. با وجود مطالعات اندک یاد شده، مطالعه جامعی روی اجزای مختلف برنج از نظر فلور قارچی و آلودگی قارچی در اکوسیستم های مختلف انجام نگرفته است.

یافته ها نشان می دهد که با وجود آلودگی قارچی نمونه ها، میزان آلودگی به مایکوتوکسین‌ها در همه نمونه ها صفر یا نزدیک به صفر می باشد. این نتایج با گزارشات سازمان ملی استاندارد کشور در خصوص عدم آلودگی مایکوتوکسینی برنج‌های وارداتی مطابقت دارد.

تقدیر و تشکر:

طرح تحقیقاتی حاضر مصوب شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زابل به شماره ۶۹/۹۰ بوده و مجریان طرح مراتب سپاس خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه برای تأمین منابع مالی

اجرای طرح اعلام می‌دارند. همچنین از کلیه فروشندگان برنج سطح شهر زابل که در اجرای این طرح همکاری داشته اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Helen CS, Hackbart LP, Ednei G, et al. Simultaneous Extraction and Detection of Ochratoxin A and Citrinin in Rice. J Braz Chem Soc 2012; 23(1): 103-9.
2. Wayne L Bryden. Mycotoxins in the food chain: human health implications. Asia Pac J Clin Nutr 2007; 16 (Suppl 1):95-101.
3. Pande N, Saxena J, Pandey, H. Natural occurrence of mycotoxins in some cereals. Mycoses 1990; 33(3): 126-8.
4. Reddy CS, Reddy KRN, Kumar RN, et al. Exploration of aflatoxin contamination and its management in rice. J Mycol Pl Pathol 2004; 34(3): 816-20.
5. Reddy BN, Raghavender CR. Outbreaks of aflatoxicoses in India. African J Food Agric. Nutr Devp 2007; 7(5). Accessed April 05/2008. Available from: http://www.ajfand.net/Issue16/PDFs/Reddy 2750.pdf.
6. Qiu M, Liu X, Wang Y, Zhang C. Survey on the fumonisins intake and the urinary Sa/So ratio of people suffered from a high incidence of esophageal cancer. Wei Sheng Yan Jiu 2001; 30 (6): 365-7. (Chinese)
7. Isaacson C. The change of the staple diet of black South Africans from sorghum to maize (corn) is the cause of the epidemic of squamous carcinoma of the esophagus. Med Hypotheses 2005; 64 (3): 658-60.
8. Peraica M1, Domijan AM. Contamination of food with mycotoxins and human health. Arh Hig Rada Toksikol 2001; 52(1): 23-35.
9. Corry JE, Jarvis B, Passmore S, Hedges A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. Food Microbiol 2007; 24 (3): 230-53.
10. Kazemi Abdolhossein, Niknam Gholamhossein. Survey some of crops‘ Contamination to Mycotoxin TCSC producer Fusarium, in the Tabriz. Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2006; 28(2): 91-4. (Persian)
11. Mikaeili Ali. Survey of aflatoxigenic Fungi in flour and bread in the Kermanshah, in 2003. Proceedings of the 9th Iranian Nutrition Congress. Tabriz, Iran. Sep 4-7, 2006: 216. (Persian)
12. Hedayati MT. Evaluation of zearalenon amount in stored wheat in Mazandaran Province in 2002. J Mazandaran Univ Med Sci 2005; 15(49): 93-8. (Persian)
13. Kazemi, A H, Mohtadi Nia J, Mahdavi R, et al. Survey of consumed rice contamination to mycotoxinogenic fungi in East Azarbaidgjan. Tabriz Med J Tabriz Univ Med Sci 2008; 30(3): 111-8 (Persian)
14. Fisher F. Fundamentals of diagnostic mycology. 1st ed. North Carolina: Saunders; 1998.
15. Evans EG, Richardson MD. Medical mycology. A practical approach. Tehran: Jahad Daneshghahi Publ; 2003.
16. Fouzia B, Samajpati N. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. Naturwiss 2000; 87: 275-7.
17. Reddy KRN, Reddy CS, Muralidharan K. Characterization of AFB1 produced by Aspergillus flavus isolated from discolored rice grains. J Mycol Pl Pathol 2005; 35(3): 470-4.
18. Raghavender CR, Reddy BN, Rani GS. Aflatoxin contamination of pearl millet during field and storage with reference to stage of grain maturation and insect damage. Mycotoxin Res 2007; 23(4): 199-209.
19. Palaniswami A, Manickam A, Neelakantan S. Surveillance of toxigenic fungi and aflatoxins in rice and paddy grains. Madras Agric J 1989; 76(9): 481-9.
20. Mangala UN, Reddy KRN, Singotamu L, et al. Aspergilli colonize and produce AFB1 in discolored rice grains. J Mycol Pl Pathol 2006; 36(3): 418-26.
21. Sales AC, Yoshizawa T. Mold counts and Aspergillus section Flavi populations in rice and its byproducts from the Philippines. J Food Prot 2005; 68(1): 120-25.
22. Sales AC, Yoshizawa T. Updated profile of aflatoxin and Aspergillus section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. Food Addit Contam 2005; 22(5): 429-36.

Original Article

The Mycotoxin contamination of the imported consumer rice and its producing fungi in Zabol

Amanloo S[1], Rezaei Kahhka MR[2], Ramezani AA[3], Mir L[4]

Received: 08/18/2013 Revised: 10/12/2013 Accepted: 02/15/2014

1. Dept. of Mycology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran
2. Dept. of Chemistry, School of Medicine, Zabol University, Zabol, Iran
3. Dept. of Epidemiology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran
4. Dept. of Biology, School of Medicine, Zabol University, Zabol, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 12, No. 1, Spring 2014

J Jahrom Univ Med Sci 2014; 12(1): 17-25

Abstract

Introduction:
Introduction: Mycotoxins leave severe harmful effects on human beings' and animals' organs and huge economic damages. Different Mycotoxin contamination in cereals, especially in rice, is an important issue in the field of food hygiene and public health of the society. Due to the particular position of rice in the food basket of Iranian households and the high consumption of rice and its derivatives, the present study was conducted to examine the mycotoxin contamination of the imported consumer rice and its producing fungi in Zabol City.

Materials and Methods:
In this research, 123 rice samples were collected using a non-probability convenience sampling method. After measuring the moisture of the rice grains, the samples were examined with regard to fungal contamination. In this study, 4 common rice mycotoxins, including aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol were examined with the HPLC method. The resulted data were statistically analyzed with the SPSS software.

Results:
The mean moisture of the rice grains was 11.59±0.53. Laboratory analysis showed that of the examined 123 samples, 34 (27.6%) had deep contamination with the fungal invasion of the tissues of rice. The highest contamination was related, respectively, to aspergillus niger (7 cases, 5.7%), aspergillus flavus (5 cases, 4.1%), and penicillium and candida (each 4 cases, 3.3%). Neither of the samples showed mycotoxin contamination over the allowable limit.

Conclusion:
The findings showed that despite the fungal contamination of the samples, mycotoxin contamination was null or close to null in all cases. This result was compatible with the reports of the country's Standard Organization about the mycotoxin contamination of the imported rice.

Keywords: Mycotoxins, Ochratoxins, Zearalenone, deoxynivalenol, Fungus Diseases, Rice

* Corresponding author, Email: fereshteh.dadfar@yahoo.com