

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

نویسندگان:

سعید امانلو\*<sup>۱</sup>، محمدرضا رضایی گیخا<sup>۲</sup>، عباسعلی رضانی<sup>۳</sup>، لیلا میر<sup>۴</sup>

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 سید 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، زیرالتون 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 دانه های برنج  $11/59 \pm 0/53$  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 اسپرژیلوس نیجر (۷ نمونه، ۵/۷ درصد)، اسپرژیلوس 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:** مایکوتوکسین ها، اکراتوکسین ها، زیرالتون، داکسی نیوالنول، بیماری قارچی، برنج

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

### مقدمه:

آسیب پذیری و آلودگی آن ها به سم قارچی می شوند [۲۰۱]. 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

محصولات کشاورزی از جمله دانه های روغنی، خشکیار، میوه های خشک و بیش تر غلات مستعد آلودگی های قارچی هستند. سه قارچ عمده آلوده کننده برنج عبارتند از: اسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم. این قارچ ها با حمله به محصولات کشاورزی باعث تغییر رنگ، کاهش بازار پسندی، شکنندگی،

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

پست الکترونیک: ama.myco@gmail.com

دورنگار: ۰۵۴۲۲۲۵۴۵۴۳

تلفن تماس: ۰۳۹۸۷۹۷۹۱۲

پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۶

اصلاح: ۹۲/۷/۲۰

دریافت: ۹۲/۵/۲۷

است [۸، ۵]. گستردگی جهانی مایکوتوکسین ها 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،

آلودگی با آفلاتوکسین و عفونت اسپرژیلوسی 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 می کند. 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 نمی یابد. 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 مایکوتوکسین ها می باشند [۴، ۳]. این آلودگی ها در شرایط 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 تأثیر 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 تخم گذاری، 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 مایکوتوکسین های متعددی که آلوده کننده برنج می باشند، آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A بیشترین تأثیر سمی را بر پستانداران داشته و با خاصیت هپاتوتوکسیک، ترانوژنیک و موتاژنیک منجر به اختلالاتی از قبیل هپاتیت، خونریزی، ادم، سرکوب سیستم ایمنی، کارسینوما 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

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 اکرآتوکسین:

روش اندازه گیری اکرآتوکسین 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 اکرآتوکسین 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 اکرآتوکسین 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 اندازه گیری، 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.

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 داده های مربوط به میزان آلودگی، جنس و گونه قارچ های آلوده کننده مشخص شد. برای آزمون اختلاف میانگین آلودگی نمونه های 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 میکوتوکسینی 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 ایمونوفینیته 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

## اندازه گیری زیرالنون:

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  $11/59 \pm 0/53$  درصد بود. در جدول شماره ۱ می توان میزان آلودگی نمونه ها به تفکیک نوع برنج آورده شده است. (جدول ۱)

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 ایمونوفینیتی 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 میلی لیتر از عصاره صاف شده از ستون های DONSPE عبور و

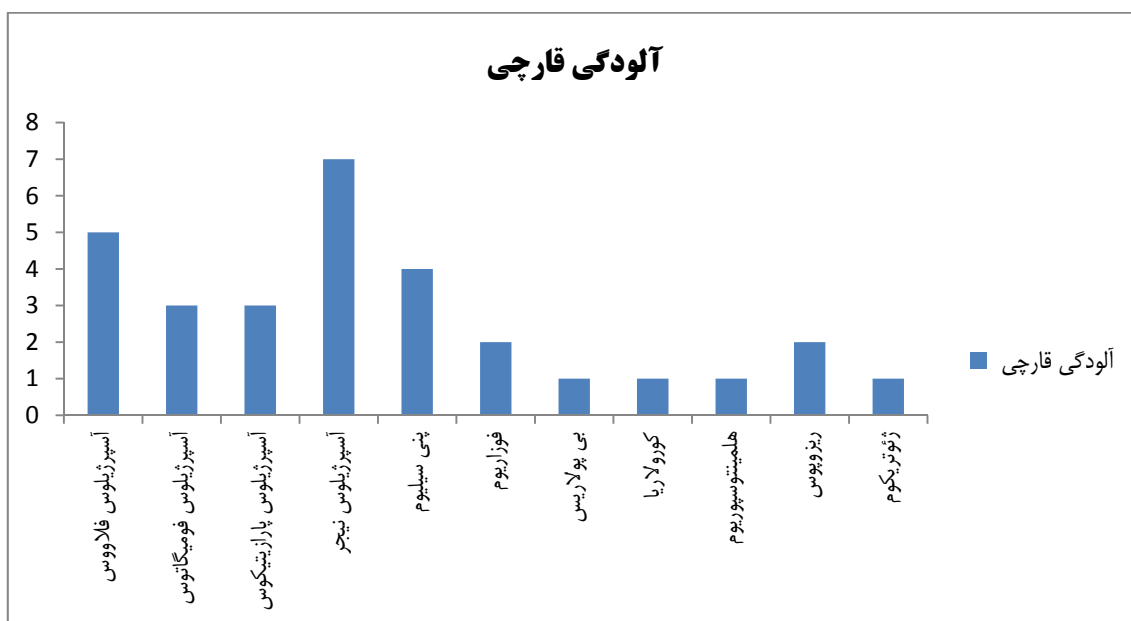
جدول ۱: آلودگی قارچی برنج های مصرفی شهر زابل بر حسب نوع نمونه

ردیف	نوع نمونه	برنج های آلوده		برنج های غیر آلوده	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	برنج سفید پاکستانی	۱۱	۳۴٫۴٪	۲۱	۶۵٫۶٪
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٪

آلودگی به ترتیب مربوط به اسپرژیلوس نیجر (۷ نمونه، ۵/۷ درصد)، اسپرژیلوس 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.

نتایج آزمون آماری نشان داد بین انواع نمونه های برنج مورد آزمایش از نظر آلودگی قارچی تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P=0/736$  ,  $df=3$ ). 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

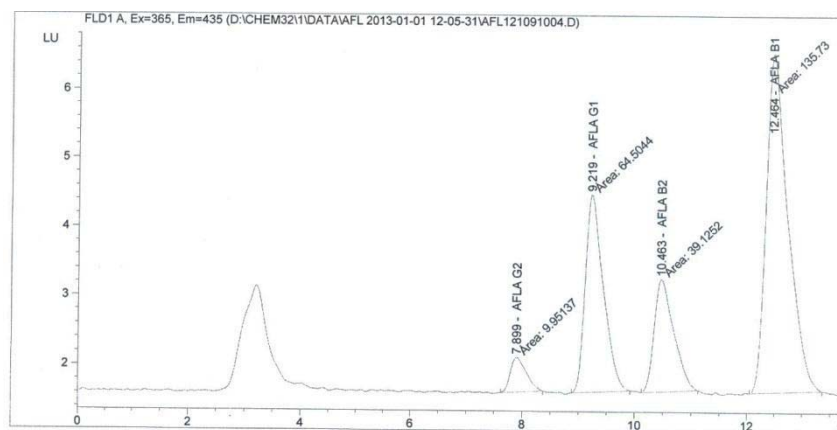


نمودار ۱: توزیع فراوانی جنس و گونه قارچ های آلوده کننده برنج های وارداتی مصرفی شهرستان زابل

فلورسانس در طول موج های ۴۳۵ نانومتر و ۳۶۵ نانومتر انجام شده است.

### اندازه گیری مایکوتوکسین ها:

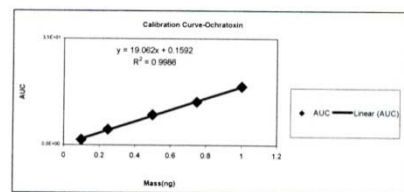
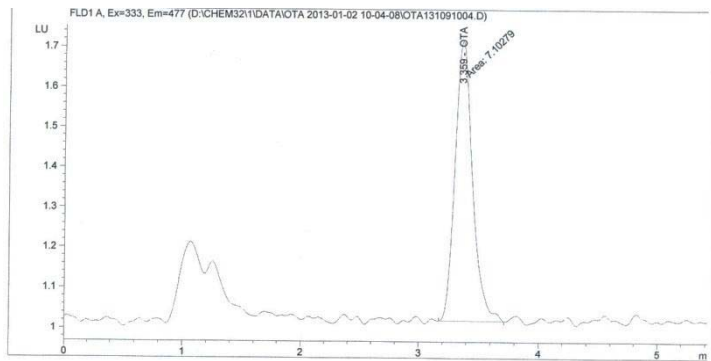
تصویر شماره ۱ کروماتوگرام به دست آمده برای هر چهار نوع آفلاتوکسین را نشان می دهد. اندازه گیری با آشکارساز



تصویر ۱: کروماتوگرام HPLC آفلاتوکسین های B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> در نمونه برنج آل

دهد که میزان آفلاتوکسین در تمام نمونه ها در گستره مجاز آن برای برنج قرار دارد، هرچند میزان قابل توجه آفلاتوکسین B1 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.

بر اساس نتایج به دست آمده، در نمونه برنج پاکستانی مقدار آفلاتوکسین B1 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

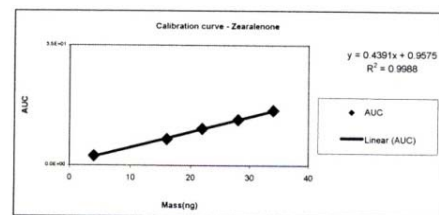
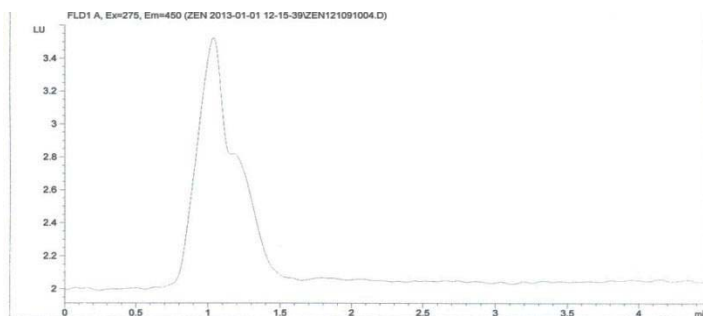


نمودار ۲: کروماتوگرام HPLC و منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت اکراتوکسین در نمونه های برنج

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.

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 می باشد.

برای اندازه گیری زیرالنون ابتدا استانداردهای کاری زیرالنون با غلظت های مشخص برای به دست آوردن منحنی کالیبراسیون

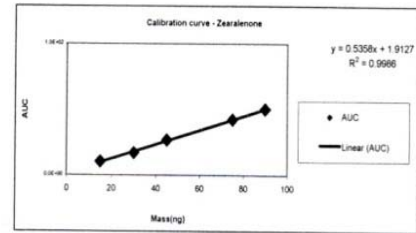
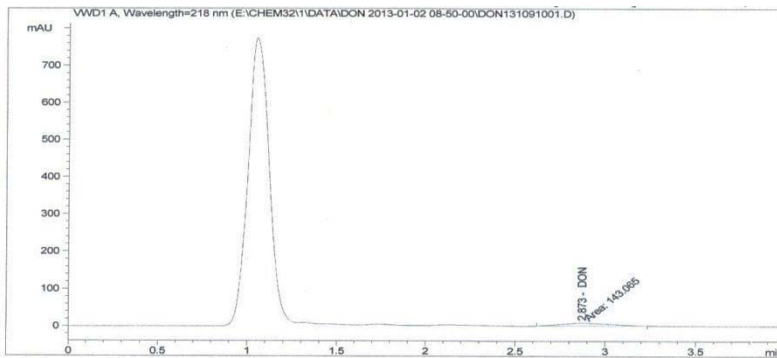


نمودار ۳: کروماتوگرام HPLC و منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت زیرالنون در نمونه های برنج

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 نیوالنون نشان می دهد.

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 نیوالنون ابتدا استانداردهای کاری با غلظت مشخص این سم به دستگاه HPLC تزریق و منحنی





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

حاکی از تهاجم عناصر قارچی اسپرژیلوس به بخش های مختلف دانه برنج می باشد [۲۰].

هر کدام از عوامل قارچی در شرایط اکوسیستم خاصی می توانند برنج را مورد تهاجم قرار دهند. اسپرژیلوس 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 اندازه گیری است [۲۱، ۲۲]. 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 اسپوره های 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 میکوتوکسین 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 میکوتوکسین ها در همه نمونه ها صفر یا نزدیک به صفر می باشد. این نتایج با گزارشات سازمان ملی استاندارد کشور در خصوص عدم آلودگی میکوتوکسینی برنج های 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

نتایج آزمایش آلودگی به داکسی نیوالنول 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  $(11/59 \pm 0/53)$  در محدوده استاندارد بود. این میزان می تواند به عنوان یک عامل کلیدی موثر در کاهش آلودگی قارچی و تولید میکوتوکسین ها در محصول باشد.

نتایج حاصل از پژوهش اخیر نشان داد که شیوع اسپرژیلوس فلاووس بیش تر از اسپرژیلوس پارازیتیکوس می باشد. شاید بتوان این اختلاف را به رطوبت پایین نمونه های مطالعه حاضر  $(11/59 \pm 0/53)$  نسبت داد. به بیان دیگر، شرایط رشد ایده آل برای اسپرژیلوس پارازیتیکوس تأمین نشده است.

بیش ترین آلودگی برنج به اسپرژیلوس 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 اسپرژیلوس فلاووس را در مطالعات خود نشان داده اند [۱۷، ۱۸]. در پژوهش حاضر در دو نمونه  $(11/6)$  درصد آلودگی به سوسه برنج مشاهده شد. این نوع آلودگی می تواند ناشی از انبارداری نامناسب و طولانی مدت برنج باشد.

هرچند گونه های اسپرژیلوس 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

تشکر و قدردانی می شود.

اجرای طرح اعلام می دارند. همچنین از کلیه فروشندگان برنج سطح شهر زابل که در اجرای این طرح همکاری داشته اند،

## 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/Reddy2750.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 9<sup>th</sup> 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 Azarbaidgan. *Tabriz Med J Tabriz Univ Med Sci* 2008; 30(3): 111-8 (Persian)
14. Fisher F. *Fundamentals of diagnostic mycology*. 1<sup>st</sup> ed. North Carolina: Saunders; 1998.
15. Evans EG, Richardson MD. *Medical mycology. A practical approach*. Tehran: Jahad Daneshgahi 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.



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

Amanloo S<sup>1</sup>, Rezaei Kahhka MR<sup>2</sup>, Ramezani AA<sup>3</sup>, Mir L<sup>4</sup>

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

### Abstract

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

#### 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  $11.59 \pm 0.53$ . 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