بررسی شیوع آفلاتوکسین در نمونه‌های پسته فرآوری شده شهرستان رفسنجان طی سال‌های ۹۰ تا ۹۱ و ارتباط آن با زمان برداشت

نویسندگان: سید رضا فانی[۱] امان الله جوانشاه[۲] محمد مرادی[۳]

۱. کارشناس ارشد بخش گیاه پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی یزد

۲. استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان

۳. نویسنده مسئول: استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان

تلفن:۰۹۱۳۸۲۸۵۲۰۲ Email:moradi@pri.ir

طلوع بهداشت

فصلنامهٔ علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد
سال دوازدهم
(ویژه نامه بهداشت محیط)
شماره: چهارم –۱۳۹۲
شماره مسلسل: ۴۲

تاریخ وصول: ۱۳۹۱/۰۶/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۶

چکیده

مقدمه: آلودگی میوه پسته به سم آفلاتوکسین ناشی از گونه‌های قارچ Aspergillus یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در مصرف این محصول با ارزش غذایی است. یکی از روش‌های مهم کاهش آفلاتوکسین در توده پسته، غربال یا جداسازی میوه های پسته آلوده است. در این تحقیق پراکندگی آفلاتوکسین در پسته‌های فرآوری شده یک ترمینال در ۳ زمان دهم شهریور، بیست و پنجم شهریور و دهم مهر ماه مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: نمونه‌برداری از پسته‌های خشک جمع‌آوری شده از فاز زیرآبی که شامل پسته‌های نهایی، ریز و با رنگ زرد، و از فاز روآبی چرخ انجام شد. پسته‌های نهایی و ریز به لکه دار، بدشکل و بدون‌لکه، و پسته‌های با رنگ زرد و روآبی به لکه‌دار، بدشکل و با رنگ زرد تقسیم بندی شدند.آفلاتوکسین در نمونه‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: از نظر کلی و با استفاده از آزمون‌های آماری مورد استفاده (p=۰/۰۵) جهت آنالیز داده‌ها، حاکی از وجود تفاوت در بین انواع پسته‌های مورد بررسی از نظر غلظت آفلاتوکسین‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد که وجود پسته‌های بدشکل و لکه دار در آلودگی یک توده پسته ارائه شده به بازار نقش مهمی دارند و دامنه غلظت آفلاتوکسین B_1 در آنها به ترتیب از ۰/۷۶ تا ۲۵۱/۶ng/g و ۱/۴۶ تا ۸۵/۳ ng/gدر سه زمان نمونه‌برداری متغیر بود. در خصوص پسته‌های ریز مقدار آفلاتوکسین از ۱/۲۳ تا ۲۴۱/۵۵ ng/g متغیر بود، که بسته به بدشکل بودن و وجود و یا عدم وجود لکه بر روی پوست استخوانی متغیر بود. از طرف دیگر عدم وجود لکه بر روی پوست استخوانی در پسته‌های ریز نمی‌تواند دلیلی بر عدم وجود آفلاتوکسین باشد. پسته‌های زرد رنگ نیز یکی از منابع اصلی آلودگی دریک توده پسته بودند و بیشترین غلظت آفلاتوکسین (۵۲۱۴ ng/g) مربوط به آنها بود. مقایسه زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد که بیشترین مقدارآفلاتوکسین با زمان ۱۰ مهر ارتباط دارد. با تاخیر در زمان برداشت، مقدار آفلاتوکسین بین ۲ تا ۳۰ برابر در انواع پسته‌های مورد بررسی افزایش یافت.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق می‌تواند در جداسازی پسته‌های آلوده از سالم در مرحله فرآوری و یا پس از آن در یک توده پسته مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین، ایمنی غذایی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مقدمه

قارچ‌ها قادر به تولید دامنه وسیعی از ترکیبات به نام متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. در بسیاری موارد نقش این ترکیبات روی خود ارگانیزم ناشناخته است ولی ممکن است بسیاری از این متابولیت‌های شناخته شده از نظر دارویی، صنعتی و یا کشاورزی اهمیت داشته باشند. مایکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی هستند که عموما" توسط گونه‌های متعددی از جنس‌های قارچی آسپرژیلوس (Aspergillus)، فوزاریوم (Fusarium) و پنی‌سیلیوم (Penicillium) در مواد غذایی انسان و دام تولید می شوند (۱). برخی از مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس شامل آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1، G_2، M_1، اسید سیکلوپیازونیک، آفلاترم، استریگماتوسیستین و ورسیکلورین هستند. در میان این گروه از متابولیت‌ها، آفلاتوکسین‌ها به‌دلیل پراکندگی جهانی و خطر آفرینی برای سلامت انسان‌ها در شمار مایکوتوکسین‌هایی قرار دارند که در محصولات کشاورزی بیشترین مطالعه و آزمایش بر روی آن‌ها صورت گرفته است (۲). آلودگی آفلاتوکسینی محصولات کشاورزی یک نگرانی جهانی در ایمنی غذایی به شمار می رود. از آنجایی که آفلاتوکسین‌ها بصورت بالقوه سرطان زا هستند، مقدار آنها در غذای انسان و دام در غالب کشورها به دقت مورد بازبینی و کنترل قرار می گیرد. به عنوان مثال اتحادیه اروپا حداکثر ۸ میکروگرم در کیلوگرم برای آفلاتوکسین B_1 و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم را برای کل آفلاتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی تعیین کرده است (۳). آفلاتوکسین‌ها به دلیل تاثیر مختلف بیوشیمیایی (اثر بر روی متابولیسم انرژی، متابولیسم کربوهیدرات و چربی و تاثیر روی سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک) و بیولوژیکی (سرطان‌زایی، جهش‌زایی، ناقص الخلقه‌زایی، ایجاد مسمومیت کلیوی وکبدی و اثر تضعیف کنندگی سیستم ایمنی) از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند (۴). ثابت شده است که آفلاتوکسین با تشکیل یک گروه اپوکساید در موجودات خون‌گرم، سمیت حاد و مزمن ایجاد می‌کند و حیواناتی که قادر به تولید آن نیستند در مقابل بروز هر دو نوع سمیت نسبتا مقاوم می‌باشند. اپوکساید آفلاتوکسین B1 به صورت اختصاصی با دنباله‌های گوانین مولکول‌های DNA در تعدادی از نقاط فعال واکنش می‌دهد که یکی از این نقاط کدون ۲۴۹ در ژنP۵۳ می‌باشد. محصول این ژن در فرآیندی که به طور طبیعی موجب محافظت در برابر سرطان می‌شود، شرکت می‌نماید (۵).

آمار صادرات پسته حاکی از اهمیت اقتصادی بالای این محصول برای ایران است (۶). از طرف دیگر میوه پسته بستری مناسب برای آلودگی به انواع کپک‌ها، مخصوصا" گونه‌ها با توانایی تولید آفلاتوکسین‌ها می‌باشد (۱۳- ۷). در مراحل مختلف تولید پسته از باغ تا انبار، میکروارگانیسم‌های مختلفی ازجمله قارچ‌ها، با فعالیت روی میوه پسته سبب کاهش کیفیت و بالطبع کاهش بازارپسندی این محصول می‌شوند. از سال ۱۹۷۱ که تعدادی از محموله‌های پسته ایران به دلیل آلودگی به آفلاتوکسین توسط آمریکا توقیف گردید، موضوع آلودگی پسته ایران به آفلاتوکسین‌ها مورد توجه خاص قرار گرفت (۱۴). مجتهدی و همکاران گزارش نمودند که آلودگی میوه‌های پسته به قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین از

باغ شروع می‌شود و پس از برداشت در موقع درجه‌بندی پسته‌ها با آب بر اساس وزن حجمی، میزان آلودگی به اسپور قارچ‌های مزبور بطور چشم‌گیری افزایش می‌یابد. اسپورهای قارچ A. flavus پس از خشک شدن تحت شرایط آفتابی، در صورت وجود شرایط مناسب، حداقل تا چهار ماه بعد قادر به جوانه‌زنی و تولید آفلاتوکسین‌ها هستند (۱۴). برای از بین بردن و یا مدیریت آلودگی به آفلاتوکسین در پس از برداشت می توان از روش‌های مختلفی همچون فیزیکی، شیمیایی و یا بیولوژیکی استفاده نمود. مرادی و همکاران (۲۰۱۱) ضمن بررسی جامع تحقیقات انجام شده در خصوص آلودگی میوه پسته به گونه‌های قارچ آسپرژیلوس و تولید آفلاتوکسین بیان نمودند که برنامه مدیریت و پیشگیری از آلودگی باید در مراحل مختلف برداشت، فرآوری، انبارداری، انتقال و ارائه به بازار اعمال گردد (۱۵). با توجه به اینکه در اکثر محصولات آلودگی به A. flavus قبل از برداشت صورت می گیرد، پیشگیری از آلودگی در این مرحله ضروری است.

از فاکتورهایی که در آلودگی میوه پسته به قارچ‌های گروه A. flavus و به تبع آن سم آفلاتوکسین نقش بسزایی دارد، می‌توان به دور و زمان آبیاری، زمان برداشت، عملیات کشاورزی، بقایای گیاهی، فاکتورهای محیطی، چگونگی استفاده از کودهای حیوانی در خاک، ترک خوردگی میوه پسته و فراوانی سویه‌های توکسین‌زا را نام برد (۲۰- ۱۶، ۱۱، ۱۰، ۸، ۷).

عموما"، پس از برداشت، پسته ی‌تر بلافاصله از باغ به ترمینال فرآوری منتقل و به شرح زیر فرآوری می گردد. اولین مرحله در فرآوری پسته پوست‌گیری می‌باشد، که با استفاده از پوست گیرهای فلزی، پوست سبز پسته‌رویی جدا شده و پس از انتقال در طول خط به کمک نوارهای نقاله و عبور از آشغال‌گیر و چرخ‌آبی به داخل حوض آبی ریخته شده و بر اساس وزن حجمی در دو خط مجزا به پسته‌های روآبی و زیرآبی تقسیم می‌شوند.

در خط پسته‌های روآبی، پسته‌ها مجددا" پوست گیری و به حوض آبی منتقل شده و بر اساس وزن حجمی پسته‌های پوک جداسازی شده و بقیه به خشک کن و میدان و یا میدان به تنهایی منتقل می شوند و تحت پسته رو آبی به بازار عرضه می‌گردد، هرچند ممکن است فرآوری بیشتری روی آنها صورت پذیرد.

در خط پسته‌های زیرآبی، پس از حوض آبی پسته‌ها وارد نم‌گیر (حذف آب سطحی ناشی از شستشوی پسته)، گوگیر (جداسازی پسته‌هایی که به دلائل مختلف پوست گیری نشده‌اند) و نوار تست (جداسازی پسته‌های پوست گیری نشده) می گردند. برای خشک کردن پسته‌ها از خشک‌کن و سپس میدان آفتابی و یا میدان آفتابی به تنهایی استفاده می‌شود. پسته‌ها بر اساس اندازه و خندانی تفکیک شده و مورد بازبینی چشمی جهت جداسازی پسته‌ها با ظاهر متفاوت از پسته‌های سالم قرار می‌گیرند. در نهایت پسته در گونی بسته‌بندی و به انبار منتقل شده و یا برای فروش به بازار عرضه می‌گردد. مراحل توضیح داده شده در بالا، مراحل اصلی هستند، هرچند در برخی از ترمینال‌ها مراحل فرآوری ممکن است متفاوت باشد.

نحوه پراکندگی و منابع آفلاتوکسین در یک توده پسته اولا" در تعیین وضعیت آلودگی توده پسته اهمیت داشته و ثانیا" نقش

سورتینگ یا جداسازی مجدد را در کاهش آلودگی مشخص می‌نماید. در این خصوص تعدادی از محققین سعی نموده‌اند جنبه‌های مختلف این موضوع را مورد بررسی قرار دهند (۲۴-۲۰، ۱۵، ۱۱).

پسته‌های زودخندان خشک و چروکیده بیش از ۹۹ درصدآفلاتوکسین را به خود اختصاص می‌دهند ولی سطوح آلودگی در پسته‌های ترک‌خورده نامنظم و آسیب دیده توسط پرندگان پایین است (۹). عمل سورتینگ پسته‌ها با مقدار بالای آفلاتوکسین در حین فرآوری، باعث کاهش ۲ تا ۴ برابر مقدار آفلاتوکسین در پسته فرآوری شده نسبت به پسته‌های فرآوری نشده می‌گردد (۲۲). از طرف دیگر نود درصد از مقدار آفلاتوکسین با ۴/۶ درصد از کل پسته‌ها که کیفیت آنها پایین می‌باشد، در ارتباط است (۲۳). پسته‌های زودخندان، وزنی بین ۹/ تا ۱/۱ گرم در هر میوه دارند و یکی از منابع اصلی آلودگی به قارچ‌ها و متعاقب آن آفلاتوکسین می‌باشند و به نظر می‌رسد که میوه‌های پسته با اندازه خیلی کوچک توانایی و امکان ورود قارچ را کاهش می دهند (۲۴). با توجه به اینکه پوست استخوانی کمتر از ۱٪ از مقدار آفلاتوکسین مغز را شامل می شود و وزن آن بین ۴۱/۷ تا ۴۶/۸ درصد وزن کل پسته در نوسان است، می توان کل یک نمونه (شامل پوست استخوانی و مغز) را با هم آنالیز و نتایج را برای هر قسمت تعمیم داد (۲۵).

یکی دیگر از عوامل تاثیرگذار در آلودگی میوه پسته به آفلاتوکسین زمان برداشت است. مطالعات انجام شده نشان داده که نوسان تراکم جمعیت اسپور قارچ های گروه A. flavus و A. niger در فضای باغ و روی میوه پسته با نزدیک شدن به زمان برداشت افزایش می یابد. تاخیر در زمان برداشت باعث افزایش تعداد پسته‌ها با پوست سبز ترک خورده و آلودگی آنها به سم آفلاتوکسین می‌گردد (۲۶). تاخیر در زمان برداشت همچنین باعث افزایش آسیب دیدگی توسط پرندگان، آفات، رنگ گیری پوست و ریزش محصول می‌گردد. این موضوع می‌تواند در افزایش تراکم جمعیت قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در فضای باغ‌ها نقش مهمی داشته باشد (۱۵).

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در خصوص توزیع و یا پراکندگی آفلاتوکسین و منابع مرتبط با آن در پسته‌های فرآوری شده و یا در حال فرآوری صورت نگرفته است. در این تحقیق با توجه به تقسیم‌بندی کلی پسته‌های فرآوری شده توسط ترمینال‌دار به صورت تجربی، انواع پسته‌ها با توجه به منشاء آنها از نظر شکل، رنگ گیری و اندازه، گروه‌بندی شدند و مقدارآفلاتوکسین در آنها اندازه‌گیری گردید. با توجه به اینکه یکی از فاکتورهای مهم در آلودگی زمان برداشت می باشد، تغییرات میزان آفلاتوکسین در انواع پسته‌های گروه بندی شده در ۳ زمان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت میدانی صورت گرفت. نمونه‌برداری از یک ترمینال فرآوری پسته در شهرستان رفسنجان در ۳ زمان دهم شهریور، بیست و پنجم شهریور و دهم مهر در سال های ۹۰ و ۹۱ صورت گرفت. از پسته‌های زیرآبی شامل پسته‌های نهایی (جهت عرضه به بازار، S_1)، ریز (جداسازی شده توسط غربال، S_2) و با

رنگ زرد (بازرسی دستی توسط کارگران در مرحله بعد از نم‌گیر، S_3) و پسته‌های روآبی (S_4) نمونه‌برداری شد (تیمارهای فوق بصورت تجربی توسط باغداران در ترمینال‌های فرآوری جمع آوری می گردد). در هر زمان نمونه‌برداری برای هریک از انواع پسته‌ها (S_1 تا S_4) مقدار ۵۰ کیلوگرم در ۳ تکرار نمونه‌برداری گردید. از هر نمونه ۵۰ کیلو گرمی، ۳ زیر تکرار به وزن تقریبی یک کیلو گرم به صورت تصادفی برداشت گردید و پس از مخلوط کردن و تهیه یک نمونه مرکب در کیسه‌های پلاستیکی درب بسته به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه نمونه‌های ۳ کیلوگرمی به دقت مورد بررسی قرار گرفتند و بر اساس چگونگی و شدت رنگ‌گیری پوست استخوانی (شکل ۱) به گروه‌های مختلف که در جدول ۱ نشان داده شده است، تقسیم‌بندی شدند (جدول ۱). لازم به ذکر است که برای هر یک از گروه‌بندی‌های ارائه شده در جدول یک در هر زمان، ۳ تکرار برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین استفاده گردید.

اندازه‌گیری آفلاتوکسین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کار آیی بالا (HPLC) :

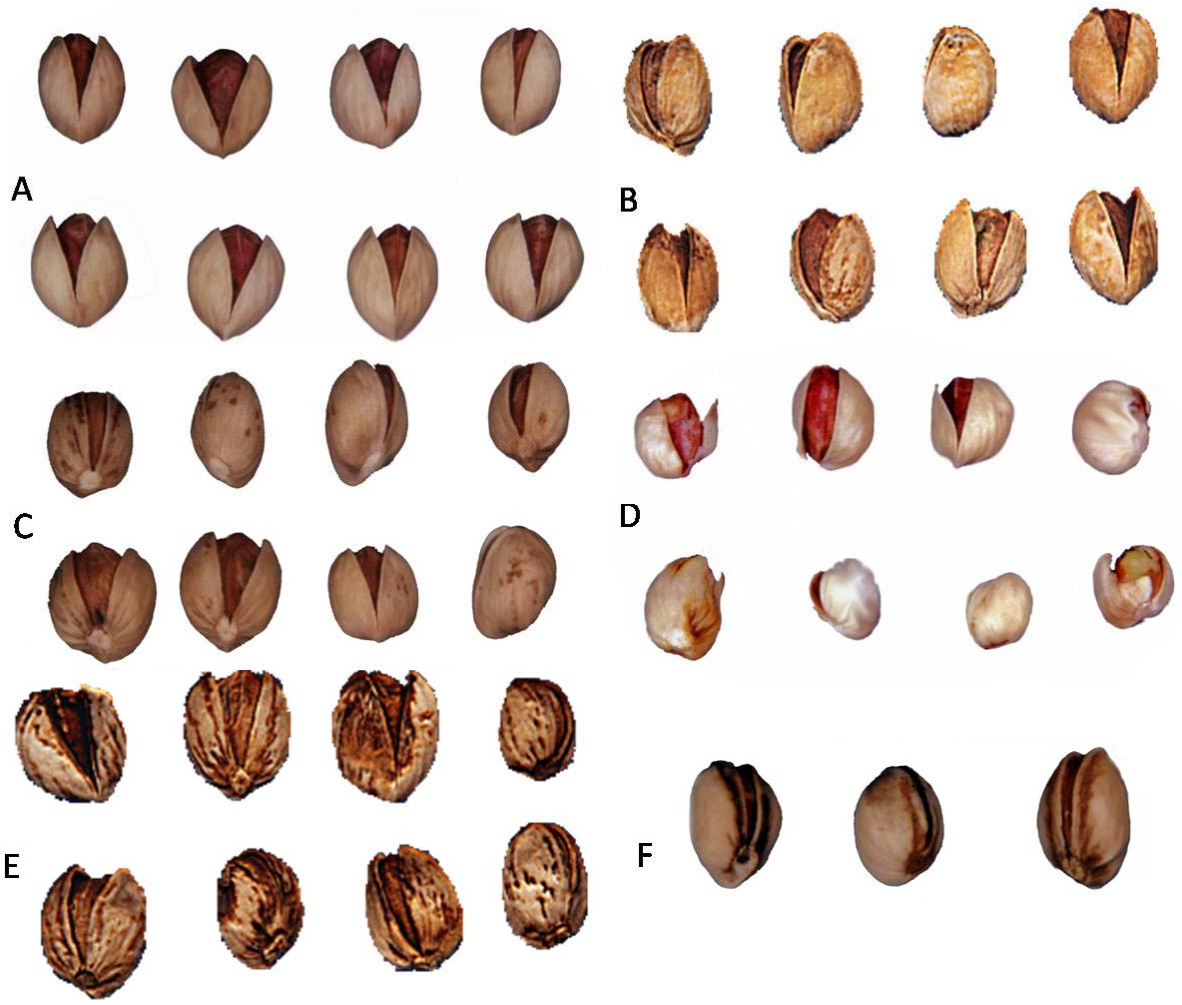
اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین با روش HPLC و خالص سازی با ستون ایمینوافینیتی و بر اساس استاندارد شماره ۶۸۷۲ و به شرح ذیل انجام شد (۲۷).

الف) عصاره گیری: به ۵۰ گرم نمونه خمیر شده، ۵ گرم NaCl، ۱۲۰ میلی لیتر متانول خالص و ۱۰۰ میلی لیتر ان- هگزان اضافه و به مدت ۳ دقیقه با سرعت بالا بلندر گردید. پس از جداسازی فاز ان- هگزان از عصاره حاصل به مقدار ۲۰ میلی لیتر از عصاره فیلتر شده ۱۲۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و از کاغذ صافی عبور داده شد. پس از رساندن ستون ایمینوافینیتی به دمای آزمایشگاه، مقدار ۱۰ میلی لیتر بافر PBS از آن عبور داده شد. سپس ۷۰ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده از ستون با سرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شد. در مرحله بعد ستون با ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد و با عبور فشار ملایم هوا به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ستون خشک گردید. جهت شستشوی آفلاتوکسین‌ها از ستون، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (MeOH-HPLC) به ستون اضافه و در یک ویال جمع‌آوری گردید و پس از آن ۱/۵ میلی‌لیتر آب مخصوص HPLC به ویال اضافه و پس از ورتکس کردن و عبور از صافی ۴۵ میکرومتر مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. برای تخمین کمی آفلاتوکسین‌ها از منحنی استاندارد استاندارد (مخلوط آفلاتوکسین Sigma, Germany) با غلظت‌های مختلف و پس از احتساب ضریب رقت و بازیافت استفاده گردید.

داده‌های بدست آمده به لگاریتم تبدیل و با استفاده از طرح آماری کاملا" تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. ازآزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید. لازم به ذکر است که پسته‌های زیرآبی (شامل پسته‌های نهایی، ریز و با رنگ زرد) و پسته‌های روآبی به صورت جداگانه مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در زمان دوم با توجه به حجم کم پسته‌های روآبی، امکان تقسیم بندی و در نتیجه آنالیز آنها وجود نداشت.

جدول ۱: چگونگی انجام نمونه‌برداری و تقسیم بندی پسته‌های روآبی و زیرآبی با توجه به خصوصیات ظاهری و منشاء آنها در حین و یا پس از فرآوری

پسته‌های زیر آبی								پسته‌های رو آبی $S_۴$		
نمونه برداری	پسته‌های نهایی $S_۱$			پسته‌های ریز $S_۲$			پسته‌های زرد رنگ $S_۳$			
گروه بندی	سالم	بدشکل	لکه دار	سالم	بدشکل	لکه دار	با رنگ زرد	بدشکل	لکه دار	با رنگ زرد	بدشکل	لکه دار



شکل ۱: تقسیم‌بندی انواع پسته‌های فرآوری شده بر اساس خصوصیات ظاهری پوست استخوانی: A پسته‌های سالم؛ B، با رنگ زرد؛ C، E و F انواع رنگ‌گیری پوست استخوانی براساس زمان و نوع ترک‌خوردگی در باغ؛ D پسته‌های بدشکل

یافته ها

نتایج حاصله از بررسی آلودگی پسته‌های زیر آبی شامل نهایی، ریز، با رنگ زرد و روآبی به آفلاتوکسین‌های B_1 و کل در زمان های نمونه‌برداری درشکل ۲ و جداول ۲ تا ۳ نشان داده شده است. با توجه به اینکه بیشترین غلظت مربوط به خطرناک‌ترین نوع آفلاتوکسین (B_1) است، لذا بیشترین بحث در ارتباط با آن خواهد بود.دامنه غلظت آفلاتوکسین B_1 در پسته‌های لکه دار و بدشکل تفکیک شده از پسته‌های نهایی جهت عرضه به بازار به ترتیب از ۰/۷۶ تا ۲۵۱/۶ ng/g و ۱/۴۶ تا ۸۵/۳ ng/g در سه زمان نمونه‌برداری متغیر بود (شکل ۲).

شکل ۲:مقایسه غلظت آفلاتوکسین در انواع پسته‌های گروه‌بندی شده در پسته‌های نهایی، زرد رنگ و ریز فرآوری شده زیرآبی در سه زمان نمونه‌برداری: برای آفلاتوکسین کل و آفلاتوکسین B_1

- برای آفلاتوکسین B1 و آفلاتوکسین کل داده‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی دار نیستند.

غلظت آفلاتوکسین در تمامی پسته‌های بدون لکه روی پوست استخوانی کمتر از حد تشخیص (شکل ۲) روش مورد استفاده جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین بود، ولی در پسته‌های لکه‌دار و بدشکل همانطور که دامنه تغییرات غلظت نشان می‌دهد غلظت آفلاتوکسین در تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی متغیر بود. پسته‌های ریز ($S_۲$) به گروه‌های لکه‌دار، بدون لکه و بدشکل تقسیم بندی شدند. غلظت آفلاتوکسین $B_۱$ در پسته‌های لکه‌دار ریز از ۱۳۲/۵ تا ۲۰۸/۵۶ng/g، بدشکل ریز از ۱/۲۳ تا ۱۰۴/۳۷ng/g و بدون لکه از ۰/۹۲ تا ۲۴۱/۵۵ ng/g متغیر بود. بررسی بیشتر پسته‌های بدون لکه ریز نشان داد که غلظت آفلاتوکسین $B_۱$ و آفلاتوکسین کل متغیر بوده و ممکن است ارتباطی با نوع لکه بر روی پوست استخوانی نداشته باشد. بررسی مقدار آفلاتوکسین در پسته‌های جمع‌آوری شده به صورت دستی توسط کارگران نشان داد که تمامی پسته‌های جمع‌آوری شده در این گروه حاوی مقادیر نسبتا" بالای آفلاتوکسین هستند. دامنه تغییرات آفلاتوکسین در پسته‌های این گروه از ۰/۵ تا ۲۴۸ng/g متغیر بود.

بررسی پسته‌های روآبی ($S_۴$) در مقایسه با سایر پسته‌ها نشان داد که تمامی نمونه‌های مورد بررسی در این گروه حاوی مقادیر بالای آفلاتوکسین می‌باشند و در غالب نمونه‌های مورد بررسی دامنه تغییرات غلظت آفلاتوکسین‌ها بین ۲۰۰ تا ۵۲۱۴ ng/g متغیر بود. غلظت آفلاتوکسین $B_۱$ و آفلاتوکسین کل (total) به ترتیب در تیمار های $S_۱$، $S_۲$، $S_۳$ و $S_۴$ افزایش، و در غالب نمونه‌های مورد بررسی در پسته‌ها با رنگ زرد، لکه‌دار و بدشکل کاهش می‌یافت. مقایسه زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان دهنده یک روند کلی در افزایش غلظت آفلاتوکسین به ترتیب زمان‌های ۱۰ و ۲۵ شهریور و ۱۰ مهر بود. هر چند که در تعدادی از تیمارها این تفاوت‌ها مشاهده نمی‌گردد، ولی مقایسه پسته‌های زیرآبی ($S_۱$) (جدول ۲) و پسته‌های روآبی در زمان‌های ۱۰ شهریور و ۱۰ مهر (جدول۳) بخوبی این تفاوت را نشان می‌دهد و مقدار افزایش بین ۲ تا حدود ۳۰ برابر در سه زمان مورد بررسی متغیر بود. تنها در خصوص پسته نهایی بدون لکه بر روی پوست استخوانی (سالم) روند افزایشی آفلاتوکسین مشاهده نگردید.

جدول ۲: تغییرات میزان غلظت آفلاتوکسین در زمان‌های نمونه‌برداری در انواع پسته‌های نهایی (S1)، ریز (S2) و زرد رنگ (S3) فرآوری شده زیرآبی

	زمان نمونه‌برداری غلظت آفلاتوکسین (ng/g)								
	۱۰ شهریور			۲۵ شهریور			دهم مهر		
	$S_۱$	$S_۲$	$S_۳$	$S_۱$	$S_۲$	$S_۳$	$S_۱$	$S_۲$	$S_۳$
$B_۱$	۱/۲ g	۶۱/۷d-g	۱۲۳/۷ bcd	۲۵/۴ fg	۱۲۴/۹bd	۹۳/۵cde	۳۴/۲efg	۸۰/۵ c-f	۱۸۰/۴a
کل	۱/۳ g	۶۵/۹d-g	۱۳۱/۹ bc	۲۶/۱ fg	۱۳۳/۸bc	۱۲۲/۵bcd	۵۲/۳efg	۹۰/۶cde	۱۹۴/۴a

در هر ردیف داده‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی دار نمی باشند

جدول ۳: مقایسه غلظت آفلاتوکسین در انواع پسته‌های فرآوری شده روآبی ($S_۴$) در دو زمان نمونه‌برداری

	زمان نمونه‌برداری [غلظت آفلاتوکسین (ng/g)]					
	دهم شهریور			دهم مهر		
	با رنگ زرد	بدشکل	لکه دار	با رنگ زرد	بدشکل	لکه دار
B۱	۷۶۸/۴ de	۱۳۵/۰ bcd	۲۲۴/۰ bcd	۲۳۷۰/۸ ab	۵۶۸/۲ abc	۲۲۴/۷ bcd
کل	۸۵۵/۰ de	۱۴۴/۴ bcd	۲۶۶/۲ bcd	۲۷۲۹/۸ a	۶۳۲/۷ abc	۲۳۳/۵ bcd

در هر ردیف داده‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی دار نمی باشند

بحث و نتیجه گیری

مطالعات زیادی در مورد آلودگی میوه پسته به آفلاتوکسین در مناطق و سال‌های مختلف صورت گرفته است که در این قسمت به برخی از آنها اشاره می گردد. چراغعلی و همکاران (۲۸) با بررسی آنالیز های انجام شده بر روی ۳۳۵۶ نمونه پسته با استفاده از روش‌های TLC و HPLC طی سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۸۱ گزارش نمودند که ۳۶/۷٪ از نمونه ها به طور متوسط به میزان ۵/۹ نانوگرم در گرم به آفلاتوکسین B۱ آلوده شده اند. در همین مطالعه مشخص شد میانگین آفلاتوکسین B۱ در ۱۱/۸٪ از نمونه ها بالاتر از حد تحمل نهایی آفلاتوکسین پسته در ایران maximum tolerated level (MTL) یعنی ۵ نانوگرم در گرم است (۲۸). در مطالعه ای دیگر که توسط دینی و همکاران (۲۹) بر روی ۸۲۰۳ زیرنمونه به دست آمده از ۳۱۸۱ نمونه پسته طی سال های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰ انجام گردید، سطح آفلاتوکسین $B_۱$ در ۶/۷۸٪ و ۵/۲۲٪ از زیرنمونه به ترتیب بالاتر از حداکثر مجاز ملی (۵ ng/g) و اتحادیه اروپا (۸ng/g) بود و به طور متوسط آفلاتوکسین $B_۱$ و کل با مقادیر ۲/۱۸ و ۲/۴۲ng/g پایین تر از حداکثرهای مجاز یاد شده هستند و سطوح آلودگی به این سم برای صادارت به کشورهای عضو اتحادیه اروپا حدود ۵۰٪ مقادیری بود که در سال های ۲۰۰۳-۲۰۰۲ اندازه گیری شده بود (۲۹). سرهنگ پور و همکاران (۳۰) با بررسی آلودگی ۱۰۰ نمونه پسته به آفلاتوکسین در استان اصفهان طی ماه های شهریور تا آبان، گزارش نمودند که فراوانی آفلاتوکسین کل، افلاتوکسین$B_۱$، $B_۲$، $G_۱$ و $G_۲$ به ترتیب ۹۵، ۹۵، ۴۲، ۶۴ و ۲۸٪ است. در ۳۶ و ۲۹٪ از نمونه های پسته نیز مقدار آفلاتوکسین B1 و کل بیشتر از حد تحمل نهایی براساس قوانین اتحادیه اروپا بودند (۳۰).

در یونان نتایج نشان داد مهم ترین مرحله برای آلودگی به آفلاتوکسین مرحله رسیدن میوه است چون اولین مرحله ای است که میزان سم بالاتر از حد مجاز(۱۳۶۱ ng/g -۱۱) تشخیص داده شد. در مرحله برداشت میزان سم حتی از این هم بالاتر می رود (۱۴۲۰ng/g). سطوح بالاتر آفلاتوکسین (بیش ۱۰۰۰ ng/g) در باغاتی که دارای آلودگی شدید به حشرات آفت هستند دیده و

ارتباط مستقیمی بین این دو مشاهده شد. در مرحله بعد از برداشت در سه چهارم از باغات آلودگی‌هایی بین ng/g ۴۰ تا ۱۲۰۰ به ثبت رسید، در مرحله خشک کردن مقدار سم ng/g ۶۵۰و در انبار به ng/g ۱۱۰۰نیز رسید(۳۱).

نتایج تحقیقاتی که در کشور به انجام رسیده و به آن اشاره گردید مربوط به بررسی نمونه های پسته گرفته شده بعد از برداشت و در مراحل انبار یا قبل از صادرات بوده است. این نوع نمونه‌ها غالبا" بعد از عملیات سورتینگ و غربال به دست آمده و میزان آلودگی که از خود نشان می‌دهند حاکی از میزان این سم در نمونه های غربال شده است اما همان گونه که در نتایج تحقیقی که در یونان به دست آمده و نتایجی که در ایران حاصل شده و به آن اشاره خواهد شد مقدار آفلاتوکسین در نمونه های مختلفی که از باغ به دست می آید و قبل از غربال مورد آزمایش قرار می گیرد، طیف‌های مختلفی از آلودگی به آفلاتوکسین را از خود نشان می‌دهد.

نتایج تحقیق انجام گرفته در این مقاله، پراکندگی آفلاتوکسین درپسته‌های فرآوری شده و نیاز به جداسازی مجدد یا سورتینگ پسته‌های که در آلودگی نقش دارند، را به خوبی نشان می‌دهد. وجود پسته‌های بدشکل و لکه‌دار در پسته‌های نهایی هر چند با فراوانی کم در یک توده پسته می‌توانند درآلودگی یک توده پسته نقش مهمی را ایفا نمایند و باید برای ارائه یک محصول عاری ازآفلاتوکسین جداسازی شوند. افزایش لکه برروی پوست استخوانی می تواند معرف افزایش سطح آلودگی و مقدار آفلاتوکسین باشد که درتیمارهای S_2، S_3 و S_4 به خوبی این امر مشاهده می‌گردد و از نظر آماری نیز تفاوت‌ها معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۵). این نتایج همچنین نشان می‌دهد که منابع آلودگی به خوبی از پسته‌های نهایی جداسازی نشده‌اند و برای ارائه یک محصول عاری از آفلاتوکسین لازم است که غربال مجدد جهت جداسازی آنها صورت گیرد. تحقیقات انجام شده مشخص نمود که با افزایش لکه بر روی پوست استخوانی مقدار آفلاتوکسین و پوسیدگی مغز نیز افزایش می‌یابد (۲۴، ۲۳، ۲۲، ۲۱، ۱۱). بررسی آلودگی مغز پسته‌های زود خندان و ترک‌خورده نا منظم به قارچ‌ها نشان داد که با افزایش رنگ گیری پوست استخوانی، پوسیدگی مغز ناشی از قارچ‌ها نیز افزایش می یابد (۱۱).

درخصوص پسته‌های ریز نتایج این تحقیق نشان داد نمی‌توان ارتباط مستقیم و مشخصی بین اندازه میوه پسته وآلودگی آن به آفلاتوکسین برقرار نمود. دلیل آن غلظت بالای آفلاتوکسین در تعدادی از پسته‌های ریز بدون لکه و غلظت پایین آفلاتوکسین در تعدادی دیگر بود. شاید علت آن را بتوان به اندازه کوچک میوه مرتبط دانست که درغربال‌های موجود در ترمینال‌ها انواع پسته‌های ریز در یک گروه جمع آوری می شوند و این امر می‌تواند باعث آلوده تلقی شدن پسته‌هائی گردد که از نظر ژنتیکی یا سایر عوامل ریز هستند، و در حالت طبیعی آلوده نیستند، به هر حال این موضوع نیاز به تحقیق بیشتری دارد. بعنوان مثال تقسیم‌بندی آنها از نظر وزنی، ظاهری و ارتباط آن با آفلاتوکسین می‌تواند حقیقت امر را روشن نماید. تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که با کاهش اندازه میوه پسته مقدار آفلاتوکسین کاهش می‌یابد و پسته‌های زودخندان وزنی بین ۹/ تا ۱/۱ گرم برای هر میوه پسته دارند که

یکی از منابع اصلی آلودگی قارچی وآفلاتوکسین می‌باشد و به نظر می رسد که میوه‌های پسته با اندازه خیلی کوچک توانایی و امکان ورود قارچ را کاهش می‌دهند. نتایج همچنین نشان می‌دهد که عدم وجود لکه بر روی پوست استخوانی در پسته‌های ریز نمی تواند دلیلی برعدم وجودآفلاتوکسین در آنها باشد (۲۴).

بررسی پسته‌های لکه‌دار نشان داد که آلودگی آنها به آفلاتوکسین بالاست و غلظت آفلاتوکسین می‌تواند تغییرات زیادی داشته باشد که به نظر می‌رسد با شدت و درصد لکه بر روی پوست استخوانی ارتباط داشته باشد. این موضوع توسط تعدادی از محققین قبلا" گزارش شده است (۲۱، ۱۲- ۹).

نتایج نشان می‌دهد که پسته‌های لکه‌دار، زرد رنگ و بدشکل که تحت عنوان پسته‌های زرد رنگ از پسته‌های زیرآبی جمع آوری می‌شوند، منابع اصلی آلودگی می‌باشند و جداسازی آنها می‌تواند درحذف منابع آلودگی کمک کند. مشخص شده است که پسته‌ها با ظاهر پوست استخوانی قهوه ای تیره متوسط در سطح پوست استخوانی (رنگ گیری عمومی) و بدون رنگ گیری آلودگی متوسط تا کمی داشته و یا فاقد آلودگی می‌باشند. لزوم تحقیق بیشتر روی پسته‌های زرد رنگ، مخصوصا" آلودگی قارچی مغز آنها ضروری به نظر می رسد تا بتوان ریسک آنها را در ارتباط آلودگی پسته فرآوری شده بدست آورد (۱۱).

مقایسه زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان دادکه به طور کلی بیشترین مقدار آفلاتوکسین‌ها مر بوط به زمان سوم نمونه برداری می باشد. از دلایل آن می توان زمان بیشتر برای افزایش جمعیت قارچ های مولد سم و انتشار آنها از طریق اسپور و در نهایت افزایش مقدارآفلاتوکسین در باغ باشد، تشکیل بیشتر پسته‌های ترک خورده و ریزش میوه های پسته در باغ را می توان به عنوان دلیل دیگری در نظر گرفت که که می‌تواند منجر به آلودگی وسیع تر و تولید سم به میزان بالاتری در یک توده پسته گردد. برداشت به موقع و زود هنگام محصول نیزمی تواند درکاهش سطح آلودگی نقش مهمی داشته باشد (۲۲). در همین رابطه مرادی و همکاران (۲۷) با بررسی نوسان تراکم جمعیت گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس گزارش نمودند که از دهه دوم شهریور ماه میزان تراکم جمعیت اسپور در فضای باغ‌های پسته به شدت افزایش می‌یابد (۲۷). پناهی و خضری(۳۲) با بررسی اثرات زمان برداشت روی برخی خصوصیات کیفی ارقام مختلف پسته طی ۴ سال گزارش نمودند میزان ترک خوردگی پوست سبز و آلودگی به آفلاتوکسین از ۲۱ شهریور به بعد به صورت تصاعدی بالا می‌رود (۳۲).

تشکر و قدردانی

نگارندگان لازم می‌دانند از همکاری بی شائبه مدیریت شرکت تعاونی تولیدکنندگان پسته رفسنجان و آقای فلاح جهت آنالیز نمونه‌ها تشکر و قدردانی نمایند.

References

1-Mortazavi A, Tabatabayi F. Fungal Mycotoxins, 1th ed. Mashhad :Ferdowsi Mashhad University Publication;1997. 14-25.

2-Sinha KK, Bhatnagar D. Mycotoxins in agriculture and food safety. 1th ed. USA: CRC Press, 1998: 3-23.

3-Codex Alimentarius. Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan. 2010. 193-195. Available from: http://www.codexalimentarius.net/download /standards/17 /CXS_193e.pdf. Accessed: 5-4-2011.

4-Sweeney MJ, Pamies P, Dobson ADW. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in Aspergillus parasiticus 439. Int J Food Microbiol 2000; 56: 97-103.

5-Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Ann rev pharmacol toxicol 1994; 34(1): 135-172.

6-Razavi S. Pistachio production, Iran vs. the world. In IV International Symposium on Pistachios and Almonds. 2005: 689-94.

7-Mojtahedi H, Rabie CJ, Lubben et al. Toxic Aspergillus from pistachio nuts. Mycopathologia, 1979; 67: 123-27.

8-Sommer NF, Buchanan JR, Fortlage RJ. Relation of early splitting and tattering of pistachio nuts to aflatoxin in the orchard. Phytopathology 1986; 76: 692-94.

9-Doster M, Michailides TJ. Aspergillus molds and aflatoxin in pistachio nuts in california. Phytopathology, 1994; 84: 583-90.

10-Doster WA, Michailides TJ. The relationship between date of hull splitting and decay of pistachio nuts by Aspergillus species. Plant Dis, 1995; 79:766-69.

11-Doster MA, Michailides TJ. Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation. Plant Dis 1999; 83: 259-64 .

12-Moradi M, Massomi H. Study of pistachio nut contamination to aflatoxin in pre-harvest and processing by using ELISA. Report of IPRI 1998: 13.[Persian]

13-Moradi M, Ershad J. Determination of density of the molds Aspergillus species in the Kerman pistachio orchards in different months of years. Proceeding of the 14 th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran. 2000: 128.

14-Mojtahedi H, Danesh D, Haghighi B, et al. Postharvest pathology and mycotoxin contamination of Iranian pistachio nuts. Phytopathology 1978; 68(12): 1800-804. [Persian]

15-Moradi M, Hokmabadi H. The Control of Mycotoxigenic Fungi in Nuts: Farm to Fork. In: Tokusoglu, Ö. Hall C.Editors: Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry & Applications. USA: CRC Press; 2011: 291-318 .[Persian]

16-Thomson SV, Mehdy MC. Occurrence of Aspergillus flavus in pistachio nuts prior to harvest. Phytopathology 1978; 68:1112-114.

17-Mojtahedi H, Danesh D, Haghighi B, et al., Storage relative humidity in Rafsanjan and impossiblity of pistachio aflatoxicosis after nut processing. Iranian J Plant Pathol 1980; 16:80-85.[Persian]

18-Moradi M, Ershad D, Mirabolfathy M, et al., The role of plant debris, soil and manure on population density of Aspergillus flavus and Aspergillus niger groups in pistachio orchards of Kerman provice. Iranian J Plant Pathol, 2004; 40: 55-9.[Persian]

19- Moradi M, Mirabofathy M. Changing of Aspergillus flavus and Aspergillus niger during processing pistachio nuts in terminals. Iranian J Paj Saz 2007; 77:104-110. [Persian]

20-Shakerardekani A, Karim R, Mirdamadiha F. The effect of sorting on aflatoxin reduction of pistachio nuts. J. Food Agric. Environ. 2012; 10 (1): 459-61.

21-Pearson TC. Separating early split from normal pistachio nuts for removal of nuts contamination on the tree with aflatoxin. Masters Thesis, University of California, Davis CA, 1993.

22-Schatzki TF. Distribution of aflatoxin in pistachios. 2. Distribution in freshly harvested pistachios. J. Agric. Food Chem 1995; 43:1566-69.

23-Schatzki T F. Distribution of aflatoxin in pistachios. 3. Distribution in pistachio process streams. J. Agric. Food Chem 1996; 44:1076-84.

24-Schatzki TF, Pan J. Distribution of aflatoxin in pistachios. Distribution in small pistachios. 1997; 45: 205-7.

25-Scholten JM, Spanjer MC. Determination of aflatioxin B1 in pistachio kernel and shells. AOAC, 1996; 79:1360-64.

26-Moradi M, Hokmabadi H, Mirabolfathy M. Density fluctuations of two major Aspergillus species airborne spores in pistachio orchards growing regions of Iran. Int J Nut related sci 2010; 1: 60-70.

27-Anonymous. Food and feed stuffs. Determination of aflatoxins B and G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method, Institute of Standards and Industrial Research of Iran 2011:21. [Persian]

28-Cheraghali AM, Yazdanpanah H, Doraki N, et al. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. Food Chem Toxicol 2007; 45(5): 812-16.

29-Dini A, Khazaeli P, Roohbakhsh A, et al. Aflatoxin contamination level in Iran's pistachio nut during years 2009–2011. Food Con .2012; 30(2): 540-2.

30-Sarhang-Pour RS, Rasti M, Zighamian H, et al. Occurrence of aflatoxins in pistachio nuts in Esfahan Province of Iran. J Food Saf. 2010; 30(2), 330-340.

31-Georgiadou M, Dimou A, Yanniotis S. Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. Food con 2012; 26(2): 580-6.

32-Panahi B, Khezri M. Effect of harvesting time on nut quality of pistachio (Pistacia vera L.) cultivars. Sci Hort 2011; 129 : 730–734.

Prevalence of Aflatoxin in Rafsanjan Processed Pistachios During 2011-12, And Its Relation With Time of Harvest

Fani SR (MS.c)[1], Javanshah J (Ph.D)[2],Moradi M(Ph.D)[3]

1.MS.c in Plant Pathology, Plant Protection Depratment Natural Resources and Agricultural Research Centre of Yazd, Yazd, Iran
2.Assistant Professor in Horticulture, Pistachio Research Institute, Rafsanjan, Iran
3.Corresponding author: Assistant Professor in Plant Pathology, Pistachio Research Institute, Rafsanjan

Abstract

Introduction: Contamination of pistachio nuts of Aspergillus species and their toxins is the most serious health threat for human and animal. Sorting out contaminated pistachios is critical to reduce the sources and levels of aflatoxins in pistachio nuts. Distribution of aflatoxin in processed pistachios was determined in the fifth and twentieth of September and fifth of October.

Methods: Samples were collected from dried sinking (final, small, and yellow shell discoloration pistachios) and floater pistachios. The final and small pistachios were categorized in stained, deformed, and non-stained (healthy) pistachios, while the yellow shell discoloration and floater pistachios were divided into deformed, stained, and yellow shell discoloration. Aflatoxins in the samples were measured using high performance liquid chromatography (HPLC) method.

Results: Overall, there was significant differences (p=0.05) between aflatoxin amounts in evaluated pistachios. The results showed that the presence or frequency of deformity and shell staining in pistachio offered to the markets are critical factors and their aflatoxin B1 content ranged from 0.76 to 251.6 ng/g and 1.46 to 85.3 ng/g, respectively. In small pistachios, aflatoxin levels varied from 1.23 to 241.55 ng/g, depending on the presence or frequency of shell staining and deformity. On the other hand, there was no relation between shell staining and aflatoxin in small pistachios. The highest content of aflatoxins belonged to yellow shell discoloration (5214 ng/g) in floater pistachios. Normally, these pistachios are sorted out by their density in floatation tanks during processing. The levels of aflatoxins increased by the time of sampling and the highest amounts were associated with sampling in October fifth. The amount of aflatoxin increased by 2 to 30 times in delayed harvesting pistachios.

Conclusion: The results could be applied to sort out contaminated pistachio as well as early harvest to reduce the risk of aflatoxin in pistachios.

Keywords: Aflatoxin, Food safety, High performance Liquid chromatography