اکراتوکسین A و جدایه‌های مولد اکراتوکسین A در گروه *Aspergillus* section *Nigri* در کشمش ایران*

OCHRATOXIN A AND OCHRATOXIN - PRODUCING ISOLATES OF *ASPERGILLUS* SECTION *NIGRI* IN RAISIN IN IRAN

منصوره میرابوالفتحی**، روح ا ...کرمی اسبو و لاله حسینیان[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱)

چکیده

اکراتوکسین A (OTA) زهرابه قارچی است که عمدتاً توسط گونه‌های *Aspergillus* و *Penicillium* در غلات، کشمش و قهوه تولید می‌شود. مهم‌ترین عامل محدودکننده صادرات کشمش و قهوه در دنیا آلودگی این محصولات به اکراتوکسینA است. سمیت ناشی از اکراتوکسینA در کلیه‌ها بروز می‌کند و سبب نارسایی و نهایتاً سرطان کلیه‌ها و کبد می‌شود. در این تحقیق از محصول کشمش استان خراسان (کاشمر، خلیل آباد، قوچان)، استان قزوین (تاکستان)، و استان آذربایجان شرقی (بناب، مراغه و ملکان) نمونه‌برداری شد. جهت جداسازی قارچ‌های گروه *Aspergillus* Sec. *Nigri* نمونه‌های کشمش مستقیماً در محیط‌های کشت مصنوعی مناسب کشت شد، هم‌چنین سوسپانسیونی از آلودگی‌های سطحی آنها تهیه، در محیط مناسب کشت و قارچ‌های گروه فوق ردیابی، تشخیص و میزان آلودگی نمونه‌ها ثبت گردید. اکراتوکسین A در نمونه‌های کشمش جمع‌آوری شده با استفاده از روشHPLC+IAC ردیابی و میزان آن اندازه‌گیری شد. جهت ارزیابی توانایی توکسین زایی جدایه‌های گروه *Aspergillus* Sec. *Nigri* حاصل از کشمش، چهارده جدایه انتخاب و میزان اکراتوکسین تولید شده توسط آنها در محیط PDB اندازه‌گیری گردید. جدایه‌هایی از گونه *A. carbonarius* که بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک تشخیص شده بودند، انتخاب، دی ان ای آنها استخراج و نواحی 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S از دی ان ای ریبوزومی و ژن بتا توبولین آنها در واکنش PCR تکثیر، تعیین توالی، و با توالی این نواحی در سایر جدایه‌های گزارش شده از این گونه در NCBI مقایسه شد. همگی نمونه‌ها (۴۴ نمونه) به قارچ‌های گروه *A.* Sec. *Nigri* آلوده بودند، لیکن میزان آلودگی بین ۸- ۱۰۰ درصد متغیر بود. بیشترین آلودگی قارچی (۱۰۰٪) مربوط به کشمش‌های آسیب دیده و کشمش‌هایی بود که مصارف مستقیم خوراکی نداشتند. آلودگی به اکراتوکسین A در پنج نمونه کشمش (۱۱٪ نمونه‌ها) با گستره آلودگی ۰/۴ ppb تا ۱۰۰ ppb ردیابی شد. از بین ۵۲ جدایه متعلق به گروه A. Nigri تعداد ۱۰ جدایه (۲۰٪) متعلق به گونه *A. carbonarius* بود که ۷۱٪ جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید اکراتوکسین A در مقادیر ۲/۳ تا ۱۰۸/۸ppb در محیط مصنوعی را داشتند. توالی نوکلئوتیدی دی ان ای ریبوزومی و ژن بتا توبولین نماینده‌هایی از جدایه‌های *A. carbonarius* کشمش که مولد مقادیر بالای اکراتوکسین A بودند، همگی یکسان و با جدایه‌های این قارچ در بانک ژن ۱۰۰٪ تشابه داشت که با شماره‌های دسترسی KF434631، KF434632، KF434633 برای دی ان ای ریبوزومی و KF434634، KF434635 برای ژن بتا توبولین در بانک ژن NCBI ثبت شد.

واژه‌های کلیدی: کشمش، ایران، اکراتوکسین A، *Aspergillus carbonarius*

---

*: بخشی از پروژه تحقیقاتی ارایه شده به موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی mmirab2000@yahoo.com

۱. به ترتیب استاد و کارشناسان مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

مقدمه

اکراتوکسین متابولیت ثانویه گروهی از قارچ‌هاست که به طور طبیعی توسط گونه‌های *Aspergillus* و *Penicillium* تولید می‌شود، این کپک‌ها قادرند در شرایط آب و هوایی متفاوت و روی گیاهان مختلف رشد نموده و محصولات کشاورزی را به اکراتوکسین A (OTA) آلوده سازند. اکراتوکسین A در حبوبات، غلات، کاکائو، کشمش، قهوه و هم‌چنین در گوشت حیواناتی که غذای آلوده به OTA در رژیم غذایی آنها وجود داشته و در آنها سمیت کلیوی ایجاد نموده یافت شده است. اکراتوکسین از طریق معده و کمی هم از ابتدای روده جذب می‌شود و بلافاصله در خون قابل ردیابی است. اکراتوکسین در شیر مادران شیرده ده برابر خون آنهاست (Breithultz- Emanuelsson *et al.* 1993a,b)، و در مرغ‌هایی که در جیره غذایی آنها اکراتوکسین بوده است سبب کاهش تعداد تخم و تغییر رنگ پوست تخم مرغ شده است (Page *et al.* 1980). اکراتوکسین A از سنتز پروتئین، DNA و RNA جلوگیری می‌کند (Creppy *et al.* 1984). بر اساس آزمایش‌های انجام شده محل اصلی ایجاد سمیت ناشی از OTA کلیه‌ها هستند. تحقیقات نشان داده است که جنس ماده و افراد مسن‌تر نسبت به جنس نر و جوانترها در برابر این سم حساسیت بیشتری دارند (Dortant *et al.* 2001). برای مثال وقتی OTA در جیره غذایی روزانه گروه‌های مختلف سنی موش‌ها منظور شد، کمترین غلظتی که در موش‌های ماده بالغ پیر سبب لکه‌هایی در کلیه‌ها شده برابر ۷۰μ g/kg وزن موش در روز بود، در حالی‌که برای موش‌های ماده بالغ جوان این غلظت ۵ برابر بیشتر بود. اکراتوکسین A سبب افزایش حجم، قند و پروتئین ادرار و اوره خون می‌شود. از نظر نفروتوکسیسیتی شواهد انسانی و بررسی‌های سبب شناسی مشخص نموده است که OTA سبب بیماری‌های کشنده کلیوی در جوامع روستایی مناطق مرکزی شبه جزیره بالکان شامل بوسنی، هرزگوین، بلغارستان، کروآسی، رومانی، صربستان و اسلوونیا شده است(JECFA 2001). اکراتوکسین A سبب سرطان کلیه به عنوان عضو اصلی و هم چنین کبد می‌شود، OTA سبب جهش در دی ان ای باکتری‌ها نیز شده است (Obrecht- Pflumio *et al.* 1999).

سمیت و ریسک اکراتوکسین A برای سلامتی انسان در اروپا در سال ۱۹۹۸ توسط کمیته علمی کمیسیون اروپایی غذا (European Commission Scientific Committee On Food, SCF,1998) ارزیابی شده است، در کمیته خبره مشترک FAO و WHO در افزودنی‌های غذایی (The Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additive, JECFA) نیز حد تحمل OTA در غذا مشخص شده است، این حد تحمل به عنوان معیار پایه برای وضع قوانین در سایر کشورها پذیرفته شده. مقدار سم قابل تحمل در غذای روزانه معادل ۱- ۱۶ ng/kg وزن بدن انسان پیشنهاد شده است (Codex Alimentalius 1998) و مصرف غذاهای آلوده به این مقادیر اکراتوکسین A به سرعت در بسیاری از کشورهای اروپا، امریکا و کانادا ممنوع شده است (Van Egmund, 1997; Romani *et al.* 2000; Cotty *et al.* 1994). در اتحادیه اروپا (EU)، انگلستان و تعداد زیادی از کشورها میزان اکراتوکسین در خشکبار، میوه‌های خشک، کشمش، خرما، غذا و سایر فراورده‌ها کنترل می‌گردد. بر اساس قوانین کشورهای اروپایی حد تحمل اکراتوکسین A در کشمش ۱۰μ g/kg در نظر گرفته شده است (Muller& Nyberg 2003).

گونه‌های قارچی زیر به عنوان مولد اکراتوکسن A معرفی شده‌اند. تعدادی از این گونه‌ها نیز به عنوان آلوده

کننده محصولات غذایی به OTA شناخته شده‌اند.

گونه‌های *A. ochraceus, A. melleus, A. auricomus, A. ostianus, A. petrakii, A. sclerotiorum, A. sulfureus* از بخش Circumdati که به عنوان گروه *A. ochraceus* نیز شناخته شده است. گونه‌های *A. alliaceus , A. albertensis* که قبلاً در بخش *Circumdati* بودند، اما اخیراً مشخص شده که نزدیک‌تر به بخش Flavi هستند (Peterson 2000). *A. niger* و *A. carbonarius* از بخش Nigri (Abarca *et al*. 1994; Ciegler 1972; Pitt 1987; Teren *et al*. 1996; Varga *et al*.1996) و قارچ *Penicillium verrucosum* (Peterson 2000) هستند. تعدادی از این گونه‌ها مترادف هستند یا توصیف ضعیفی دارند (Peterson 2000; Varga *et al*. 2000; Samson & Pitt 2000). که سبب پیچیده شدن سبب‌شناسی مولدین اکراتوکسین شده‌اند.

هیچ یک از جدایه‌های *A. ochraceus* حاصل از خشکبار و انجیر کالیفرنیا اکراتوکسین تولید ننمودند. هم‌چنین در انجیرهای آلوده به *A. ochraceus* و پنیسیلیوم اکراتوکسین ردیابی نشد، در حالی‌که همه جدایه‌های *A. alliaceus* تولید اکراتوکسین نمودند، در نتیجه گونه *A. alliaceus* که کمتر شناخته شده بود، مولد اکراتوکسین A در انجیر کالیفرنیا و عامل آلودگی آن به اکراتوکسین A معرفی شد (Bayman *et al*. 2002).

بررسی فلور قارچی انگور در آرژانتین نشان داده است که ۷۰٪ آلودگی‌ها مربوط به جنس *Aspergillus* بوده و در بین گونه‌ها *A. flavus* و *A. niger* var. *niger* ردیابی شده است. بررسی توانایی تولید اکراتوکسین در گروه قارچی Aspergillus Nigri در انگور آرژانتین نشان داد که از۶۳ سوش متعلق به این بخش فقط سه درصد آنها مولد اکراتوکسین A در انگور بوده‌اند، که میزان آن در محیط کشت بین ۲ng/ml–۲/۴۵ متغیر بود (Magnoli *et al*. 2003).

حضور سوش‌های مولد اکراتوکسین در بخش Nigri گویای اهمیت وجود OTA در انگور نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است، از این رو باید از رشد این قارچ‌ها و تشکیل مایکوتوکسین در انگور این نواحی جلوگیری نمود.

گونه مولد اکراتوکسین A در انگور و کشمش گونه *A. carbonarius* و در قهوه *A. ochraceus* می‌باشد، لیکن به دلیل عدم بررسی در همه مناطق جغرافیایی، تعدد قارچ‌های مولد اکراتوکسین و هم‌چنین به دلیل وجود مسائل تاکسونومیکی در بخش Circumdati، روشن نیست که در محصولات مختلف کدام گونه سبب آلودگی‌های اکراتوکسینی می‌شوند. در غلات و در شرایط سرد *Penicillium verrucosum* به عنوان مولد اکراتوکسین شناخته شده است (Mill & Abramson 1982; Pitt 2000).

کشمش میوه رسیده و خشک فرآوری شده ارقام مختلف انگور و محصول بوته مو از گونه *Vitis vinifera* و خانواده Vitiaceae بوده و بر حسب رقم و شرایط فرآوری انگور به نام‌های کشمش آفتابی (raisin)،کشمش تیزابی (Sultanus)، کشمش گوگردی بی دانه زرد (Golden bleach) یا کشمش طلایی که همان رقم Sultan است که با دی اکسید گوگرد (SO2) تیمار می‌شود و در دو نوع بی دانه کشمشی و بی دانه پیکانی عرضه می‌شود. کشمش دانه دار و مویز نیز از انواع دیگر موجود در بازار هستند. رقم بی‌دانه سفید در اروپا ، امریکا و استرالیا به نام Sultan Thompson seedless شناخته می‌شود. کشمش سبز فقط در ایران تولید می شود و کشمش پلویی که ریز و تیره است در پاکستان و هند هم تولید می‌شود. در هند و پاکستان کشمش سیاه به عنوان Kishmish (یک لغت هندی) خوانده می‌شود.

بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۷ سطح زیر کشت انگور معادل ۳۰۱۷۲۹ هکتار و تولید آن معادل ۱۷۳۹۵۰۳تن ذکر شده است. استان‌های خراسان رضوی (۳۵۸۱۳ تن)، قزوین (۳۲۶۱۱ تن)، آذربایجان شرقی (۱۶۸۰۷تن)، خراسان شمالی(۱۶۰۸۹تن) از استان‌های مهم تولید کننده انگور کشور هستند. میزان محصول بی دانه کشمشی ایران در سال ۱۳۸۷ معادل ۱۴۱۳/۶۱ تن بوده است و هر تن کشمش به قیمت۱۲۰۰- ۱۳۰۰ دلار به فروش می‌رسد. کشمش ایران به کشورهای هلند، آلمان، ایتالیا، لیتوانی، اتریش، فرانسه، یونان، چین، ژاپن، کانادا، مجارستان، اوکراین، روسیه، لهستان و امارات متحده عربی صادر می‌شود (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۷). تا کنون بررسی جامعی در مورد کشمش ایران و به ویژه آنچه مصرف داخلی دارد انجام نشده است. هدف این تحقیق پایش اکراتوکسین A در کشمش، تعیین گونه مولد اکراتوکسین A درکشمش، و مقایسه توان تولید اکراتوکسین A در جدایه‌های گروه قارچی Aspergillus Nigri کشمش ایران بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌ها در پاییز و زمستان ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ از محصول کشمش استان‌های آذربایجان شرقی شامل شهرهای ملکان، بناب و مراغه، استان خراسان شامل شهرهای کاشمر، خلیل آباد، قوچان و در استان قزوین از منطقه تاکستان در مراحل پس از خشک شدن در بارگاه، کارگاه، کارخانه پس از فرآوری و انبار در مرحله قبل از بسته‌بندی جمع‌آوری شد. هر نمونه یک کیلوگرمی متشکل از ده زیر نمونه ۱۰۰ گرمی از ده بارگاه و کارگاه‌های فرآوری مختلف هر شهر بود. در محل‌هایی که انواع کشمش از نظر نوع خشک شدن (آفتابی، روی زمین، گوگردی، کالیفرنی) و یا براساس کیفیت (کشمش‌های خوراکی، غربال شده، غیر قابل مصرف و آسیب دیده یا کله و با دم) در دسترس بود، از انواع آنها جهت مقایسه تأثیر روش‌های مختلف فرآوری بر میزان آلودگی نمونه‌برداری شد.

بررسی‌های قارچ‌شناسی

به منظور جداسازی قارچ‌های مولد اکراتوکسین با دو روش شامل۱) کشت مستقیم دانه‌های کشمش ضدعفونی شده با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۳ دقیقه در محیط‌های نمک آگار حاوی6% NaCl, 2% agar (Doster & Michailides 1994) و PDA+ 250 ppm streptomycin و ۲) کشت سوسپانسیون حاصل از افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به ۱۰ گرم از هر نمونه کشمش و قرار دادن درشیکر ۹۰ تکان در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد، در آزمایش اخیر ۵۰۰µl از سوسپانسیون مذکور در سطح هر ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA+250 ppm streptomycin ریخته شد. تعیین درصد آلودگی به گروه قارچی *Aspergillus* Sec. *Nigri* در کشت مستقیم بر اساس تعداد دانه‌های کشمش آلوده از ۵۰ عدد کشمش کشت شده و برای کشت سوسپانسیون تعداد پرگنه این گروه قارچی از کل پرگنه‌های رشد یافته در ده تشتک پتری برای هر نمونه کشمش انجام شد. برای مشاهدات مورفولوژیک و تشخیص، جدایه‌ها در محیط‌هایCzapek-Dox agar، potato dextrose agar و malt extract agar کشت شدند. تشخیص جدایه‌ها با استفاده از سیستم‌های تاکسونومیکی استاندارد (Klich & Pitt 1988; Raper & Christensen 1982 ;

Fennell 1965) و استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی این جنس (Samson & Varga 2007) انجام گردید. کیفیت ظاهری و روش فرآوری هر نمونه کشمش نیز یادداشت شد.

بررسی مولکولی جدایه‌های مولد اکراتوکسین *A. carbonarius*

به منظور تأیید تشخیص جدایه‌های *A. carbonarius* تعدادی از جدایه‌های این گونه که مقادیر بالایی اکراتوکسین A نیز تولید نموده بودند، انتخاب شد، برای تهیه توده قارچ قطعاتی از رویش ۵ روزه جدایه‌ها در محیط potato dextrose agar در فلاسک‌های دویست و پنجاه میلی‌لیتری محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط potato dextrose broth انداخته شد و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری و توده قارچی رشد یافته در سطح محیط با کاغذ صافی جدا، با آب مقطر شستشو و به منظور استخراج DNA در ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. استخراج DNA با روش (Sambrook & Russell (2001) انجام شد. واکنش PCR برای تکثیر دی ان ای DNA ریبوزومی با استفاده از جفت آغازگرهای (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) ITS1 و (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) ITS4 صورت گرفت (White *et al.* 1990; Peterson 2008) و - دی ان ای ناحیه تکثیر شده تعیین توالی شد، هم‌چنین با استفاده از جفت آغازگر : (T1>5′-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3′, T22>5′-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3′) ژن β-tubulin جدایه‌های منتخب در واکنش PCR تکثیر (O'Donnell &. Cigelnik 1997)، تعیین توالی و همگی در NCBI بلاست و با توالی دی ان ای نواحی مشابه سایر جدایه‌های *A. carbonarius* موجود در بانک ژن مقایسه شد.

ردیابی و اندازه‌گیری اکراتوکسین

هر نمونه یک کیلوگرمی کشمش، مخلوطی از ده زیر نمونه ۱۰۰ گرمی جمع‌آوری شده از ده کارگاه مختلف هر شهر بود. تمامی کشمش هر نمونه در نیتروژن مایع پودر شد. سپس ۵ گرم آن در یک فلاسک یکصد میلی‌لیتری ریخته شد و ۲۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به آن افزوده شد. نیم ساعت در شیکر با۱۴۰تکان افقی در هر دقیقه شیک و سپس با استفاده از قیف و کاغذ صافی صاف شد، ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده برداشته شد و با ۳۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. همه ۴۰ میلی‌لیتر محلول حاصل از ستون ایمونو افینیتی با حجم سه میلی‌لیتر اختصاصی آکراتوکسین A از شرکت Libus فرانسه عبور داده شد(Sibanda *et al.* 2008) . سرعت عبور ازستون معادل یک میلی‌لیتر در ثانیه بود. سپس ستون با شش میلی‌لیتر آب دیونیزه شستشو و با پمپ خشک شد. اکراتوکسن A متصل شده به فیلتر ستون ایمونوافینیتی اختصاصی اکراتوکسین با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول HPLC grade از ستون شسته و در یک ویال جمع گردید. سپس محتوای ویال در دستگاه خشک کن خشک شد، ۱/۵ میلی‌لیتر حلال فاز متحرک دستگاه HPLC به آن اضافه و ۱۰۰µl از آن به دستگاه تزریق گردید. در این بررسی از ستون C18 استفاده شد. حلال فاز متحرک HPLC آب: استونیتریل به نسبت ۷۰: ۳۰ بود، سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. حس گر سیستم برای اندازه گیری اکراتوکسین A دتکتور فلورسنت با طول موج تهییج (Excitation) ۳۳۰ nm و نشر (Emission) ۴۴۰ نانومتر بود Scott & Kanhere 1995; Mac (Donald 1999). محلول استاندارد OTA در مقادیر ۰/۵ تا ۱۵ ng/ml به سیستم تزریق شد. پیک OTA پس از ۴/۷ دقیقه ظاهر شد. از مقایسه سطح زیر پیک نمونه با منحنی

جدول۱. نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرهای مختلف

Table 1. The samples collected from various cities

Processing sort	Common name	Processing area	Location	No
نوع فرآوری	نام عمومی	ناحیه فرآوری	محل	شماره
tizabi	Bidane	Taherkhani	Takestan	1
tizabi- sulfure	Bidane	Zartak factory	Takestan	2
aftabi	Bidane	Taherkhani	Takestan	3
californi	Bidane	Taherkhani Farshid	Takestan	4
Roie zamini	Bidane	Taherkhani	Takestan	5
californi	Talaii	Rahmani factory	Takestan	6
tizabi- saie khoshk	Bidane	Rahmani	Takestan	7
tizabi	Bidane	Taherkhani	Takestan	8
tizabi- sulfure	Bidane	Taherkhani	Takestan	9
tizabi	Bidane	Parshahi1	Khalilabad	10
tizabi- sulfure	Bidane	Parshahi2	Khalilabad	11
tizabi- sulfure	Sabz	Parshahi3	Khalilabad	12
kalle	Sabz	Parshahi4	Khalilabad	13
tizabi- sulfure	Sabz qalami	Parshahi 5	Khalilabad	14
tizabi- sulfure- badom	Sabz qalami	Parshahi6	Kashmar	15
kalle	Sabz	Parshahi 8	Khalilabad	16
tizabi- sulfur- darje1	Sabz qalami	Parshahi1	Kashmar	17
dom keshmesh	Sabz	Parshahi 7	Kashmar	18
kalle	Sabz	Khalilabad	Kashmar	19
daraje1	Sabz qalami	Parshahi 8	Khalilabad	20
tizabi	Poloii	Area1	Quchan	21
tizabi	Poloii	Area2	Quchan	22
tizabi	Poloii	Area3	Quchan	23
tizabi	Poloii	Area4	Quchan	24
tizabi	Poloii	Area5	Quchan	25
tizabi	Poloii	Area1	Maragheh	26
tizabi	Poloii	Area2	Maragheh	27
tizabi	Poloii	Area3	Maragheh	28
tizabi	Poloii	Area1	Bonab	29
tizabi	Poloii	Area2	Bonab	30
tizabi	Sabz	Area3	Bonab	31
tizabi	Sabz	Area4	Maraqeh	32
tizabi	Poloii	Area5	Maraqeh	33
tizabi	Sabz	Area4	Bonab	34
tizabi- sulfure	Sabz	Area1	Malekan	35
tizabi	Poloii	Area6	Maraqeh	36
tizabi- sulfure	Sabz	Area2	Malekan	37

ادامه جدول ۱.

tizabi- sulfure	Sabz	Area3	Malekan	38
tizabi	Poloii	Area4	Malekan	39
tizabi	Poloii	Area5	Malekan	40
tizabi	Poloii	Area5	Bonab	41
tizabi	Sabz	Area6	Bonab	42
Tizabi non sulfur	Poloii	Area6	Malekan	43
tizabi	Poloii	Area7	Malekan	44

استاندارد حاصل از غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۵ ng/ml میزان اکراتوکسین محاسبه شد. LOD (Limit of Detection) روش نیز محاسبه شد (شکل۱). درصد بازیافت اکراتوکسین (Recovery) نیز با افزودن۱۰ppb اکراتوکسین A به پودر کشمش عاری از آلودگی و اندازه‌گیری آن با HPLC+IAC محاسبه شد (جدول۴ وشکل ۲).

بررسی و مقایسه توان اکراتوکسین‌زایی جدایه‌های گروه A. Nigri کشمش

به منظور بررسی پتانسیل جدایه‌ها از نظر تولید OTA در آزمایشگاه نمایندگانی از گروه‌بندی‌های مورفولوژی گروه A. Nigri انتخاب و در محیط کشت PDA کشت شد، تعداد ۵ قطعه از لبه کلنی جوان (هفت روزه) از هر جدایه در یک فلاسک۲۵۰ میلی‌لیتری محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB انداخته شد. فلاسک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در حالت سکون در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و پس از آن به مدت ۱۰ روز در شیکر انکوباتور ۹۰rpm شیک شد. به منظور استخراج اکراتوکسین A در پایان دوره ده روزه محتوی هر قلاسک هموژن و صاف گردید، پنج میلی‌لیتر از صاف شده مذکور با ۳۵ میلی‌لیتر آب مخلوط و به مدت نیم ساعت در شیکر با سرعت ۱۴۰rpm در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. همه ۴۰ میلی‌لیتر محتوی فلاسک از ستون ایمونو افینیتی اختصاصی اکراتوکسین A (ساخت کارخانه Libus فرانسه) با سرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شد. سپس ستون با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو و خشک و نهایتاً اکراتوکسین با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول از ستون شسته و در ویال جمع گردید. محنوی ویال در خشک کن خشک و در ۱/۵ میلی‌لیتر حلال فاز متحرک HPLC شامل آب: استونیتریل به نسبت ۷۰: ۳۰ حل گردید. اندازه‌گیری با دستگاه HPLC ساخت کارخانه Waters و دتکتور فلورسنت با طول موج تهییج (Excitation) ۳۳۰ nm و نشر (Emission) در طول موج ۴۴۰ نانومتر انجام شد.

نتایج و بحث

آلودگی کشمش به قارچ‌های گروه *Aspergillus* Sec. *Nigri*

نتایج بررسی‌ها گویای آلودگی انواع کشمش به گونه‌های گروه A. Nigri از جمله *A. niger* و *A. carbonarius* و میزان آلودگی بین ۸ تا ۱۰۰ در صد بود. امکان ردیابی آلودگی قارچی در روش تهیه سوسپانسیون دقیقتر از روش کشت مسقیم در محیط غذایی بود. به‌طور کلی در این تحقیق از نظر نوع کشمش تفاوتی بین میزان آلودگی در کشمش سبز قلمی، بی دانه و پلویی دیده نشد ولی کشمش‌هایی که پس از تیزاب روی زمین و به طریق آفتابی خشک شده بودند (نمونه‌های ۳، ۵، ۳۲ ، ۳۳، ۴۱ ، ۴۲و ۴۳) از کشمش‌های گوگردی آلودگی قارچی بیشتری

جدول ۲. میزان آلودگی کشمش جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف به قارچ‌های بخش (٪) *A. Sec. Nigri* و اکراتوکسین A (ng/g)

Table2. *Aspergillus* section *Nigri* contamination (%) and ochratoxin (ng/g) of raisins collected from different provinces

Ochratoxin A (ng/g)	آلودگی قارچی *A.* Sec. *Nigri* contamination (%)		Area	Location	No
	Suspension**	Raisin*			
اکراتوکسین (نانوگرم/گرم)	سوسپانسیون**	کشمش*	ناحیه فرآوری	محل	شماره
0.4	50	66	Taherkhani	Takestan	1
ND***	25	0	Zartak factory	Takestan	2
ND	100	100	Taherkhani	Takestan	3
ND	75	0	Taherkhan Farshid	Takestan	4
2.13	100	100	Taherkhani	Takestan	5
0.61	75	0	Rahmani factory	Takestan	6
ND	8	0	Rahmani	Takestan	7
ND	100	82	Taherkhani	Takestan	8
ND	90	90	Taherkhani	Takestan	9
ND	100	100	Parshahi1	Khalilabad	10
ND	75	0	Parshah2	Khalilabad	11
ND	25	100	Parshahi3	Khalilabad	12
ND	100	100	Parshahi4	Khalilabad	13
ND	75	33	Parshahi 5	Khalilabad	14
ND	50	50	Parshahi6	Kashmar	15
ND	100	100	Parshahi 8	Khalilabad	16
ND	100	75	Parshahi1	Kashmar	17
ND	100	83	Parshahi 7	Kashmar	18
100	100	100	Khalilabad	Kashmar	19
ND	100	100	Parshahi 8	Khalilabad	20
ND	100	36	Area1	Qouchan	21
ND	100	10	Area2	Qouchan	22
ND	80	0	Area3	Qouchan	23
ND	25	100	Area4	Qouchan	24
ND	25	25	Area5	Qouchan	25
ND	100	100	Area1	Maraghe	26
ND	10	0	Area2	Maraghe	27
ND	100	100	Area3	Maraghe	28
ND	20	0	Area4	Maraghe	29
ND	80	0	Area5	Maraghe	30
ND	50	100	Area6	Maraghe	31
ND	100	100	Area1	Bonab	32
ND	100	100	Area2	Bonab	33
ND	20	45	Area3	Bonab	34
ND	80	17	Area4	Bonab	35
ND	90	50	Area5	Bonab	36
ND	20	33	Area6	Bonab	37
ND	80	100	Area1	Malekan	38
ND	20	0	Area2	Malekan	39
ND	20	0	Area3	Malekan	40
ND	100	100	Area4	Malekan	41
ND	100	100	Area5	Malekan	42
3.07	100	100	Area6	Malekan	43
ND	100	60	Area7	Malekan	44

*- culturing surface sterilized raisin on PDA directly.

* کشت مستقیم کشمش با ضد عفونی سطحی در PDA

** culturing suspension of raisins -surface contaminations on PDA+streptomycin

- PDA+streptomycin

** کشت سوسپانسیون آلودگی های سطحی کشمش در محیط کشت

***ND= Not Detected

*** ND = ردیابی نشد

جدول ۳. جدایه‌های بخش A. Nigri حاصل از کشمش جمع‌آوری شده از مناطق مختلف

Table 3.The list of *Aspergillus* section *Nigri* isolates obtained from raisin collected from different areas

Number	Code	and processing kind Location	Species
شماره	کد	محل و نوع فرآوری	گونه
1	100- 12-15BS	Khalilabad	*A. niger*
2	100- 12-15BC	Khalilabad	*A. niger*
3	100- 12-5BS	Takestan	*A. niger*
4	100-12-21BC	khalilabad	*A. niger*
5	100-12-10L	Khalilabad, Kale	*A. carbonarius*
6	100-12-20BC	Khalilabad, Kale	*A. niger*
7	100-12-9 BC	Takestan, on the ground	*A. niger*
8	100-12-7L	Khalilabad	*A. carbonarius*
9	100-12-16BC	Khalilabad	*A. niger*
10	100-12-18BC	Khalilabad, not screened	*A. niger*
11	100-12-23C	Khalilabad, kale	*A. niger*
12	100-12-24L	Khalilabad, screened	*A. carbonarius*
13	100-12-24S	Khalilabad, screened	*A. niger*
14	100-12-6 L	Zartak	*A. carbonarius*
15	100-12-15L1	Khalilabad	*A. carbonarius*
16	100-12-19L1	Khalilabad, Badom	*A. carbonarius*
17	100-12-19-BC	Khalilabad, Badom	*A. niger*
18	100-12-14-BC	Kashmar	*A. niger*
19	100-12-16BC	Khalilabad	*A. niger*
20	100-12-23L	Khalilabad, Kale	*A. carbonarius*
21	100-12-18-B	Khalilabad, notscreened	*A. niger*
22	100-12-30B	Maragheh4	*A. niger*
23	100-12-30-L	Maragheh4	*A. carbonarius*
24	100-12- 30-BS	Maragheh4	*A. niger*
25	100-12-32-B	Maragheh5	*A. niger*
26	100-12-32BR	Maragheh5	*A. niger*
27	100- 12-34Y	Bonab	*A. niger*
28	100-12- 34BR	Bonab	*A. niger*
29	100-12-35BR	Bonab6	*A. niger*

ادامه جدول۳.

30	100-12-35B	Bonab6	*A. niger*
31	100-12-38BC	Bonab4	*A. niger*
32	100-12-38B	Bonab4	*A. niger*
33	100-12-28B	Quchan4	*A. niger*
34	100-12-28BC	Quchan4	*A. niger*
35	100-12-29BR	Quchan5	*A. niger*
36	100-12-29-B	Quchan5	*A. niger*
37	100- 12-40-B	Maragheh3	*A. niger*
38	100-12-41-BR	Malekan, Sulfur	*A. niger*
39	100-12-41-L	Malekan, Sulfur	*A. carbonarius*
40	100-12-43SMB	Malekan, Sulfur	*A. niger*
41	100-12-44BR	Malekan	*A. niger*
42	100-12-44 SMB	Malekan	*A. niger*
43	100-12-45BR	Bonab3	*A. niger*
44	100-12-45B	Bonab3	*A. niger*
45	100-12-46-B	Bonab5	A.sp
46	100-12-46Y	Bonab5	*A. niger*
47	100-12-47SB	Malekan	*A. niger*
48	100-12-47BR	Malekan	*A. niger*
49	100-12-48BR	Malekan, Sulfur	*A. niger*
50	100-12-23BRB	Khalilabad, Kale	*A. niger*
51	100-12-37BR	Maragheh	*A. niger*
52	100-12-25B	Quchan	*A. niger*

داشتند (جدول ۲). در بازدید از کارگاه‌های منطقه کاشمر مشاهده شد که کشمش‌های تغییر رنگ یافته ناشی از انگورهای آسیب دیده را از کشمش‌های سالم جدا نموده و اصطلاحاً کله می‌نامیدند (نمونه‌های۱۳،۱۶ و۱۹). این نوع کشمش بنا به قول باغداران مصارف دیگری به جز خوراک مستقیم دارد و برای تهیه الکل یا لواشک از آنها استفاده می‌شود که بیشترین آلودگی‌ها قارچی مربوط به این کشمش‌ها بود (جدول ۲).

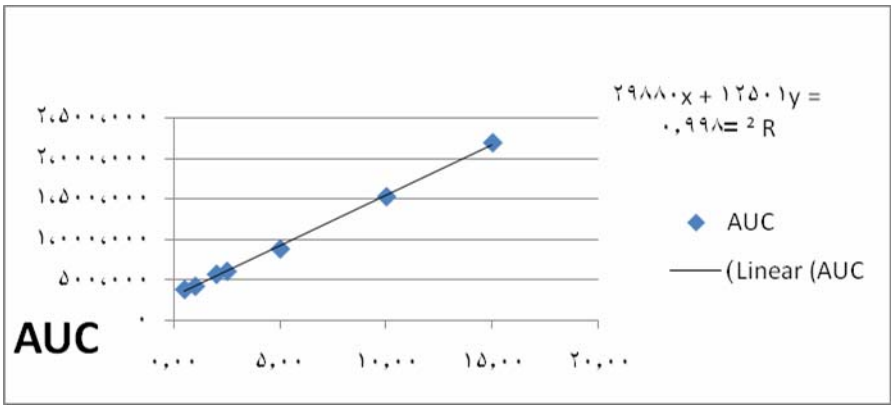
آلودگی کشمش به اکراتوکسینA

منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۵ ng/ml اکراتوکسین در شکل۱ قابل مشاهده است. درصد بازیافت اکراتوکسین A در روش HPLC+IAC مورد استفاده در دو آزمایش انجام شده معادل ۶۸/۲ و

جدول ۴. توانایی تولید اکراتوکسینA در جدایه‌هایی از بخش A. Nigri جدا شده از کشمش

Table 4. Ochratoxin producing potential of representative isolates of *A*. section *Nigri* isolated from raisin

Number شماره	Code کد	Location محل	Ochratoxin A(ng/g) اکراتوکسین (نانوگرم/گرم)
1	100-12-34Y	Bonab	ND
2	100-12-46Y	Bonab	2.3
3	100-12-23L	Kale- Parshahi	63.91
4	100-12-30L	Maragheh	3.2
5	100-12-10L	Kale- khalilabad	13.74
6	100-12-19L	Badom-khalilabad	51.15
7	100-12-7L	Khalilabad	108.08
8	100-12-14BC	kashmar	0.87
9	100-12-6BC	Zartak	ND
10	100-12-16BC	khalilabad	ND
11	100-12-5 BS	Takestan	ND
12	100-12-19L1	Khalilabad	ND
13	100-12-43S	S -Malekan	ND
14	100-12-15L1	Khalilabad	ND



ng/ml	0.50	1.00	2.00	2.50	5.00	10.00	15.00
AUC	381,969	421,417	569,940	607,030	884,650	1,530,068	2,197,020

شکل ۱. منحنی استاندارد سطح زیر منحنی مقادیر ۵/. تا ۱۵ ng/ml از محلول استاندارد اکراتوکسینA

Fig. 1. Area under curve of 0.5- 15 ng/ml ochratoxin A Standard solutions

۷۰ در صد بود (جدول۵ و شکل ۲).

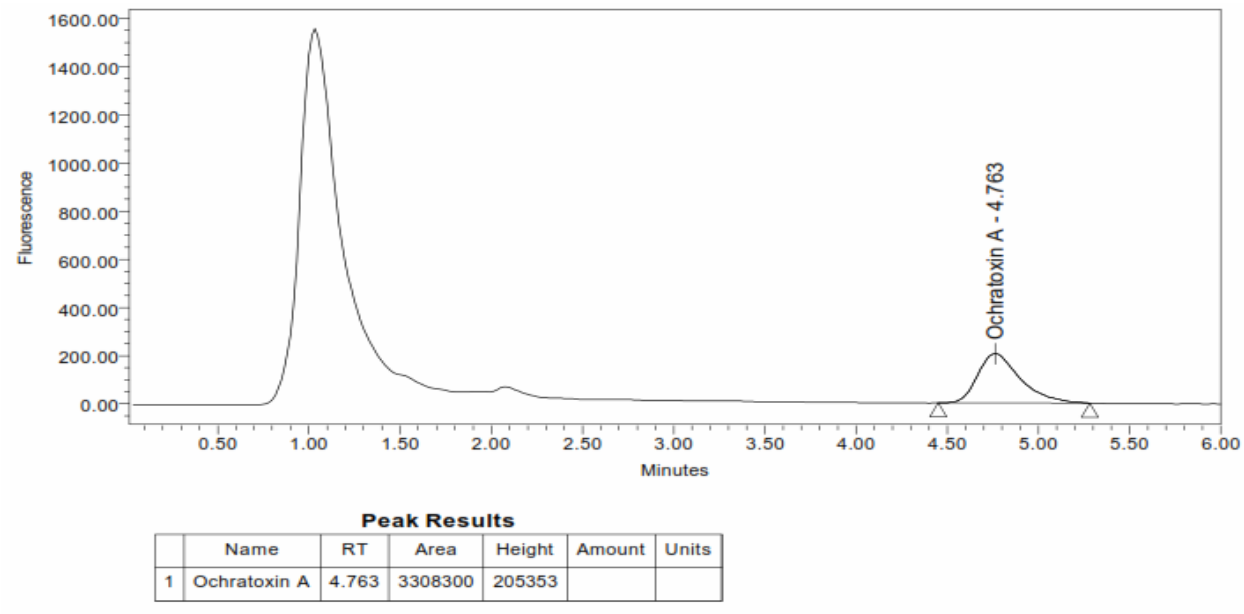
از نظر آلودگی کشمش به اکراتوکسین آلودگی در سه نمونه تاکستان، یک نمونه ملکان و یک نمونه کاشمر ردیابی شد. اکراتوکسینA در نمونه‌های آلوده تاکستان و ملکان کمتر از حد مجاز تعریف شده برای این مایکوتوکسین (۱۰ ppb) و در نمونه کشمش کاشمر (۱۰۰ppb) و بسیار بیشتر از حد مجاز تعریف شده بود (جدول۲).

در نمونه‌های ۱، ۵ و ۶ جمع‌آوری شده از منطقه تاکستان قزوین مقادیر ۰/۴ ppb – ۲/۱۳ اکراتوکسین

جدول ۵. درصد بازیافت مقدار10 ppb اکراتوکسین A افزوده شده به کشمش عاری از آلودگی

Table 5. The result of recovery tests obtained from 10 ppb ochratoxin A spiked uncontaminated raisin

NO	AUC	Conc. 5 g	Diluted	Factor	Recovery
Spk 10 ppb	110920	0.028	0.444	0.50	71.00%
Spk 10 ppb	106545	0.027	0.426	0.50	68.20%



شکل۲. کروماتوگرام ردیابی 10 ppb اکراتوکسین A در کشمش

Fig. 1. The chromatograms of 10 ppb spiked raisin sample

ردیابی شد که پایین‌تر از حد مجاز تعریف شده در کمیسیون اروپا و استاندارد ایران (۱۰µg/kg) بود. نمونه شماره ۵ تاکستان که روی زمین خشک شده بود دارای آلودگی ppb ۲/۱۳ و نمونه کشمش غیر گوگردی ملکان (شماره۴۳) دارای ppb ۳/۰۷ آلودگی کمی داشتند. در یک نمونه جمع‌آوری شده از منطقه خلیل آباد کاشمر در خراسان (شماره ۱۹) مقدار ppb ۱۰۰ اکراتوکسین ردیابی شد که بسیار بالاتر از حد مجاز بود. نمونه اخیر از نمونه‌های کشمش آسیب دیده و تغییر رنگ یافته بود که در اصطلاح محلی کله نامیده می‌شود، این کشمش‌ها با دست از بقیه کشمش‌ها جدا شده و مستقیماً مصرف خوراکی ندرد.

توانایی تولید اکراتوکسین A در جدایه‌های گروه *A. Nigri* کشمش

بررسی توانایی تولید اکراتوکسین در جدایه‌های گروه A. Nigra نشان داد که جدایه‌های 100-12-23L، 100-12-19L، 100-12-7L، 100-12-30L، 100-12-10L، 100-12-46Y قادر به تولید مقادیر متفاوتی از اکراتوکسین A بودند که بیشترین مقدار توسط جدایه 100-12-7L با مقدار ppb ۱۰۸/۰۸ تولید شد این جدایه از کشمش‌های غیر خوراکی نوع کله جدا شده بود. همه جدایه‌های مولد اکراتوکسین A

متعلق به گونه *A. carbonarius* بودند. یک جدایه 100-12-14BC از گونه *A. niger* مقدار بسیار کمی(۰/۷۸ppb) اکراتوکسین A تولید نمود که با تکرار آزمایش تولید اکراتوکسین در جدایه مذکور ردیابی نگردید. تعیین گونه جدایه 100-12-46Y که مقدار کمی(۲/۳ ppb) اکراتوکسین تولید نمود در دست بررسی است. بررسی‌های انجام شده در سایر مناطق دنیا نیز نشان داده است که گونه اصلی مولد OTA در انگور *A. carbonarius* است و مطالعات زیادی روی شرایط بهینه رشد و تولید OTA توسط این گونه صورت گرفته است (Mitcell *et al*. 2004). محصول انگور استرالیا نیز به OTA آلوده بوده و همه جدایه‌های *A. carbonarius* انگور مولد اکراتوکسین بوده‌اند در حالی‌که علی‌رغم آلودگی بالا به *A. niger* جدایه‌های این گونه مولد OTA نبوده‌اند. بر اساس تحقیقات انجام شده در این کشور آلودگی لایه‌های سطحی خاک تاکستان‌ها به گونه‌های *A. niger* و *A. carbonarius* بالاست و جمعیت این دو گونه درصورت افزایش یا کاهش دمای سطح خاک (از مبنای ۲۵ درجه سلسیوس)، رطوبت بالای خاک و شخم زدن کاهش یافته و به تبع از این کاهش جمعیت آلودگی کاهش می یابد. رسیدگی حبه‌های انگور، آسیب دیدگی و ترک خوردن آنها (که فاکتور اخیر خود وابسته به نوع و زمان آبیاری و موقعیت خوشه روی ساقه است) از فاکتورهای اصلی دخیل در بروز آلودگی است (Leong *et al*. 2006). در آمریکا نیز بر اساس بررسی ۴۰ نمونه کشمش جمع‌آوری شده از نواحی انگور کاری کالیفرنیا ۹۳٪ نمونه‌ها به مقادیر کمی ng/g ۱۱/۴– ۰/۰۶ OTA آلوده بوده‌اند، و از ۴۰۰ جدایه Apergillus به دست آمده فقط ۱۲ جدایه (۳٪جدایه‌ها) که از ۵ نمونه کشمش جدا شده بودند گونه *A. carbonarius* بوده که تولید مقادیر ۱۵µg/g – ۹/ ۰اکراتوکسین نموده‌اند و بر اساس تحقیق اخیر نتیجه‌گیری شده که آلودگی کشمش کالیفرنیا به OTA پایین و مطالعه اکولوژی *A. carbonarius* در درون بخش A. Ngri وضعیت آلودگی کشمش به OTA را روشن خواهد کرد (Palumbo *et al*.2011). در ایتالیا نیز گونه مولد OTA در انگور *A. carbonarius* بوده است و قریب ۴۰٪ انگور مناطق جنوبی ایتالیا به این توکسین آلوده بوده که گاه آلودگی به بیش از 2 µg/L نیز رسیده است و جمعیت قارچ‌های گروه *A. Ngri* برحسب سال و شرایط آب و هوایی تغییر می‌کرده است (Lucchetta *et al*.2010; Battilani *et al*.2004

در این تحقیق جدایه‌های گونه *A. carbonarius* ازنظر مورفولوژی از سایر گونه‌های گروه Nigri به واسطه ویژگی‌های زیر مشخص شد، میسلیوم سفید حاشیه کلنی در محیط PDA و MEA، رنگ کلنی از پشت ظرف پتری سیاه، کنیدیوفور بلند ۱۸–۲۵×۱۰۰۰–۳۷۰۰ میکرومتر و بی‌رنگ با دیواره صاف، وزیکل‌ها بزرگ با قطر ۹۵ –۷۰ میکرومتر و کروی، متولا همه سطح وزیکل را پوشانیده و ابعاد آنها ۲۰–۴۵×۶–۱۰میکرومتر، فیالیدها ۷–۱۱×۶–۷ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بسیار بزرگ با قطر۸ –۱۱ میکرومتر، کروی، جداره بسیار ناصاف که در کنیدیوم‌های بالغ به صورت میخ‌ها یا برجستگی‌های مشخص دیده می‌شد. رنگ کنیدیوم‌ها سیاه و نحوه قرار گرفتن آن روی وزیکل شعاعی بود که با افزایش سن کلنی، حالت ستونی می‌یافت. مشخصه بارز آن کنیدیوفور بلند، کنیدیوم بزرگ با جداره بسیارناصاف آن بود.

توالی دی ان ای ریبوزومی و بتا- توبولین جدایه‌های *A. carbonarius* کشمش

توالی نوکلئوتیدی قسمتی از ناحیه 18S، نواحی ITS1, 5.8S، ITS2 و قسمتی از ناحیه 28S از دی ان ای

ریبوزومی جدایه‌های 100-12-23L ، 100-12-10L, 100-12-7L کشمش این تحقیق صد در صد با توالی نواحی فوق از دی ان ای ریبوزومی جدایه‌های.NRRL 4849 و NRRL 346 گونه.*A. carbonarius* که با شماره‌های دسترسی AF459734.1 و AF459731 در بانک ژن به ثبت رسیده بود، مشابهت داشت و توالی نواحی ITS جدایه‌های *A. carbonarius* کشمش این تحقیق به ترتیب با شماره‌های دسترسی KF434631، KF434632، KF434633 در بانک ژن NCBI به ثبت رسید.

توالی نوکلئوتیدی ژن بتا - توبولین جدایه‌های 100-12-10L و 100-12-7L کشمش این تحقیق، صد در صد با یکدیگر مشابه بود. توالی نوکلئوتیدی ژن مذکور این جدایه‌ها ۹۹٪ (۵۶۹ باز از ۵۷۰ باز) با جدایه CCF 3388 گونه *A. carbonarius* که با شماره دسترسی HE577803.1 در بانک ژن (Hubka *et al.* 2012) به ثبت رسیده بود مشابه بود و توالی ژن *β-tubulin* دو جدایه 100-12-10L و 100-12-7L کشمش ایران با شماره‌های دسترسی KF434634 و KF434635 در بانک ژنNCBI به ثبت رسید.

نتایج این تحقیق نشان داد که علی‌رغم آلودگی کم کشمش مناطق مختلف ایران به اکراتوکسین A، با توجه به جداسازی *A. carbonarius* مولد OTA از کشمش، امکان تولید این زهرابه قارچی در شرایط مساعد رشد قارچ و امکان آلودگی کشمش به اکراتوکسین A وجود دارد.

تحلیل‌ها و مطالعات وسیعی در زمینه چگونگی آلودگی، شرایط آلودگی و فاکتورهای مؤثر بر آلودگی انگور به کپک سیاه *A. carbonarius* و OTA در تاکستان، کشمش و فرآورده‌های آن انجام شده است، هم‌چنین روش‌های کنترل و کاهش آلودگی نیز بررسی شده است (Varga & Kozakiewicz 2006).

به‌طور کلی امکان ردیابی آلودگی به قارچ‌های گروه A. Nigri در روش تهیه سوسپانسیون دقیق‌تر و همگن‌تر از روش کشت مسقیم در محیط غذایی بود (جدول۶). مقایسه آلودگی کشمش مناطق مختلف به قارچ‌های گروه A. Nigri و اکراتوکسین A در این تحقیق نشان داد که بیشترین آلودگی به گروه قارچی مذکور در کشمش کاشمر (۸۴٪) ردیابی گردید، هم‌چنین بالاترین میزان آلودگی کشمش به OTA(۱۰۰ ppb) مربوط به یک نمونه این منطقه بود(جدول۶)، علاوه بر این جدایه‌های مولد مقادیر بالای اکراتوکسن A شامل جدایه‌های100-12-7L, 100-12-23L و 100-12-19L به ترتیب با تولید مقادیر ۱۰۸، ۶۳ و ۵۱ ppb اکراتوکسین A بیشترین مولدین این زهرابه قارچی بودند. نکته‌ای که باید مورد توجه قرار گیرد این است که به علت عدم یکسانی تعداد تمونه مناطق مختلف از یک سو و نمونه گیری و بررسی کشمش‌های زخمی و آسیب دیده که فقط در منطقه کاشمر در دسترس بود و اصطلاحاً کله نامیده می‌شد از سوی دیگر، نمی توان بر اساس این تحقیق به صراحت اعلام نمود که این منطقه بیشترین آلودگی را داشته است و اثبات این امر نیازمند تحفیفات تکمیلی در این منطقه است. در صد آلودگی به قارچ‌های گروه A. Nigri در نمونه های تاکستان در استان قزوین و ملکان در استان آدربایجان شرقی نیز به ترتیب ۷۴ و ۶۹ در صد و درصد نمونه‌های آلوده به OTA انها به ترتیب ۳۰ و ۱۴ در صد بود ولی میزان آلودگی کشمش در این دو ناحیه پایین‌تر از حد مجاز و بین ۳ /۰ تا ۳/۷ ppb بود. در کشمش سایر مناطق شامل قوچان، بناب و مراغه

جدول ۶. درصد و میزان آلودگی کشمش مناطق مختلف به قارچ‌های گروه *A. Sec. Nigri* و اکراتوکسین A

Table 6. Ochratoxin and *Aspergillus* section *Nigri* contaminations of raisin produced in different locations

OTA contamination level (ng/g) میزان آلودگی به OTA (ng/g)	OTA contaminated samples (%) نمونه‌های آلوده به OTA (%)	A. Nigri contamination (%) آلودگی به قارچ‌های گروه *A. Nigri* (%)		Samples numbers تعداد نمونه	Location منطقه
		Suspensionسوسپانسیون	Raisinکشمش		
0.4- 2.3	30	69.22±34	48.66±47	9	Takestan
100	9	84.09±26	76.45±34	11	Kashmar
0	0	66±38	34.2±39	5	Qouchan
0	0	60±39	50±55	6	Maraghe
0	0	68.33±38	57.5±35.	6	Bonab
3.07	14.3	74.28±38	65.71±37	7	Malekan

آلودگی به اکراتوکسین ردیابی نشد، ولی آلودگی قارچی به قارچ‌های گروه *A. Nigri* بین ۶۰ تا ۶۸٪ برآورد گردید.

از نظر مقایسه انواع کشمش و تأثیر روش‌های مختلف فرآوری بر آلودگی کشمش بیشترین جدایه‌های *A. carbonarius*، از کشمش نامرغوب غیر خوراکی که عمدتاً شامل انگورهای زخمی، آسیب دیده و لهیده بود، حاصل شد. در ایران به منظور تهیه کشمش، پس از برداشت ابتدا انگور با استفاده از امولسیون روغن گیاهی و تیزاب (کربنات پتاسیم) و در موارد معدود به روش‌های سنتی و در آفتاب آبگیری می‌شود. سپس با روش‌های جدید (استفاده از بارگاه‌های توری و سیمی) ویا سنتی (آویختن با نخ)کشمش تهیه می‌شود، و در مواردی در همین مرحله با انیدرید سولفورو دود داده (گوگردی) می‌شود، سپس کشمش به کارخانه منتقل شده و در آنجا ابتدا شستشو شده، مواد همراه خوشه و دم در دو مرحله حذف شده، مجدداً خشک شده ، در گرمخانه گوگرددهی مجدد شده، روغن‌زنی و نهایتاً در بسته‌های بزرگ بسته‌بندی می‌گردد. رطوبت کشمش در هنگام انبار نباید بالای۱۶-۱۳ ٪ و فعالیت آبی یا a_w (نسبت فشار آب موجود در کشمش به فشار بخار آب خالص در حالت اشباع) آن نباید بیشتر از ۰/۶ باشد. در چنین شرایطی فعالیت‌های میکروبی در کشمش متوقف می‌شود. در مواردی که کشمش رطوبتی بیش از این مقدار داشته باشد، در اثر رطوبت شیره از کشمش‌ها خارج شده و یا در صورتی‌که به جای نگاهداری کشمش در جعبه‌های چوبی روسی با چهار چوب فلزی با حجم یک متر مکعب از گونی‌های معمولی در انبار استفاده شود در اثر فشار گونی‌ها روی یکدیگر خروج شیره مشاهده می‌شود و سبب آلودگی‌های قارچی بعدی می شود. در مواردی نیز باران‌های پائیزه سبب به هم چسبیدن کشمش‌ها می‌شود. با تأمین شرایط فرآوری مطلوب مانند تسریع در پروسه خشک نمودن کشمش، عدم خشک نمودن روی زمین و خاک و استفاده از بارگاه سیمی، استفاده از داربست برای جلوگیری از تماس میوه با خاک به خصوص در فصل رسیدن و جدا نمودن کشمش‌های آسیب دیده و زخمی از سایر کشمش‌ها می‌توان از احتمال تولید اکراتوکسنA در انواع کشمش کاست.

از آنجا که تا قبل از این تحقیق گزارشی از چگونگی آلودگی کشمش ایران به OTA نبود، هدف این تحقیق بررسی اولیه از وضعیت آلودگی کشمش مناطق اصلی

تولید کشمش ایران به قارچ های گروه اصلی مولد آکراتوکسین A و آکراتوکسین A، گونه مولد آکراتوکسین A در گروه *A. Nigra* و یافتن بالاترین حد آلودگی طبیعی در انواع کشمش بود. در این راستا انجام تحقیقات تکمیلی در زمینه چگونگی وقوع آلودگی، یافتن نقاط بحرانی تولید توکسین از تاکستان تا آخرین مراحل فرآوری، مقایسه آلودگی مناطق تولید برای یافتن مناطق پر ریسک با آلودگی بالا، مقایسه ارقام تجاری و انواع روش‌های فرآوری ضروری است. تحقیقات برای یافتن گونه ها و جنس‌های دیگر مولد اکراتوکسین در کشمش ایران نیز باید ادامه یابد. هم‌چنین با توجه به ردیابی آلودگی بالای قارچ‌های گروه A. Nigri و اکراتوکسین A در نمونه‌های منطقه خلیل آباد کاشمر، ضروری است چگونگی آلودگی کشمش این منطقه در تحقیقات آتی بررسی شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از دکتر Bjorn Gehesquière در مؤسسه VisserijOnderzoek (Instituut voor Landbouw- en)ILVO بلژیک، آقای مهندس محمد محمدی پور در مرکز تحقیقات استان آذربایجان شرقی، خانم مهندس سمیعی مدیر باغبانی تاکستان، آقای مهندس معتمد الصنایع در سازمان کشاورزی استان خراسان رضوی و مدیریت محترم باغبانی کاشمر و خلیل آباد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (1-4) متن انگلیسی مراجعه شود.