

مقاله کوتاه

مطالعه امکان تولید آفلاتوکسین B1 در زعفران و محصولات حاصل از آن

عباس محمدی^{۱*}، سیمین نجار^۲ و فهیمه سنگی کاظم آباد^۲

تاریخ پذیرش: ۱۱ اسفند ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۹ تیر ۱۳۹۴

عباس محمدی، ع، نجار، س، و سنگی کاظم آباد، ف. ۱۳۹۶. مطالعه امکان تولید آفلاتوکسین B1 در زعفران و محصولات حاصل از آن. زراعت و فناوری زعفران، ۵(۲): ۱۹۴-۱۸۵.

چکیده

زعفران از با ارزش ترین محصولات دارویی استان های خراسان رضوی و جنوبی است که در تمام مراحل برداشت، انتقال و انبارداری ممکن است به گونه های مختلف قارچ *Aspergillus* آلوده گردد. یکی از توکسین های ناشی از این آلودگی، آفلاتوکسین B1 است. این پژوهش با هدف بررسی تولید این توکسین توسط قارچ *Aspergillus flavus* در مراحل مختلف برداشت، انتقال و انبارداری زعفران صورت گرفت. بافت های خشک و مرطوب زعفران و بافت های برنج آغشته شده به عصاره زعفران، با *A. flavus* تلقیح گردیده و تولید آفلاتوکسین در آن ها به روش کروماتوگرافی TLC بررسی گردید. قارچ اسپرژیلوس توانست در شرایط مختلف این پژوهش، تمام بافت های تلقیح شده را آلوده نماید. مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 در تیمارهای مختلف به استثنای زعفران های نگهداری شده در شرایط خشک (شاهد)، تولید گردید. در بافت های برنج آغشته به عصاره زعفران نیز آفلاتوکسین B1 تولید گردید ولی میزان آن نسبت به تیمار برنج بدون زعفران، کمتر بود. بر اساس نتایج این پژوهش، بافت های زعفران به سرعت در شرایط گرم و مرطوب به گونه های مختلف اسپرژیلوس آلوده می گردند. زعفران خشک و مرطوب تلقیح شده با قارچ اسپرژیلوس، پس از مدتی حاوی مقدار زیادی آفلاتوکسین بود. میزان آفلاتوکسین تولیدی در بافت های زعفران، ارتباط مستقیم با رطوبت محیط و بافت داشت. با افزایش رطوبت، آلودگی بافت به قارچ بیشتر و تولید توکسین نیز افزایش یافت. آغشته کردن مواد غذایی به زعفران هرچند میزان تولید آفلاتوکسین B1 را کاهش داد ولی تولید آن را متوقف نکرد. نتایج این پژوهش نشان داد که بسته بندی زعفران قبل از خشک شدن کامل بافت یا نگهداری آن ها در شرایط رطوبت بالا، خطر آلودگی به قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در آن ها را افزایش می دهد.

کلمات کلیدی: آلودگی، اسپرژیلوس، برنج، توکسین های قارچی، کروماتوگرافی.

مقدمه

هکتار، یکی از گیاهان دارویی با ارزش استان های خراسان رضوی و جنوبی است (Kafi et al., 2006). با وجود آن که در منابع علمی مختلف بر خاصیت ضد قارچی و باکتریایی زعفران تأکید شده است (Vahidi et al., 2002; Pawar & Thaker, 2006) ولی آلودگی این گیاه و محصول آن به قارچ های مولد

زعفران (*Crocus sativus* L.) با سطح زیر کشت ۷۳۱۱۹

۱- استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

(* نویسنده مسئول: Amohammadi@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2017.29711.1098

الجزایر در میزان ۲۴ تا ۲۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 را در نمونه‌های زعفران بررسی شده مشاهده کردند. نوربخش و همکاران (Noorbakhsh et al., 2009) تعداد ۳۷ نمونه زعفران بسته‌بندی شده را که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بود بررسی کرده و گونه‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین را در آن‌ها مشاهده کردند. بهشتی و همکاران (Beheshti et al., 2014) با مطالعه‌ای که بر روی زعفران‌های موجود در بازار شهر مشهد انجام دادند با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و ستون ایمونوآفینیته، وجود آفلاتوکسین B1 را در آن‌ها به اثبات رساندند.

با توجه به اینکه وجود آفلاتوکسین B1 در نمونه‌های زعفران بسته‌بندی شده و عرضه‌شده در فروشگاه‌های مختلف به اثبات رسیده است، این پژوهش در جهت شناخت زمان بروز این آلودگی در محصول زعفران صورت گرفت. بنابراین در این پژوهش امکان تولید آفلاتوکسین B1 در مراحل مختلف فرآوری و نگهداری زعفران، مطالعه و اثر عصاره زعفران بر تولید این توکسین در مواد غذایی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

کشت و تکثیر قارچ

جدایه *A. flavus* استفاده شده در این پژوهش جدایه NRR2999 (تهیه شده از کلکسیون قارچ‌شناسی آمریکا) بود که به عنوان یکی از جدایه‌های با توانایی بالای تولید آفلاتوکسین شناخته می‌شود. مایه تلقیح مورد استفاده در این پژوهش با کشت جدایه قارچ روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) تهیه گردید. پس از رشد پرگنه قارچ و تولید توده اسپور، مایه تلقیح آماده گردید (Davis et al., 1966). بافت‌های گلبرگ زعفران که پس از برداشت به‌طور طبیعی آلوده شده بودند، بررسی و میزان توکسین در آن‌ها بررسی گردید.

توکسین، از خطراتی است که تولید این محصول با ارزش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. زمان ماندگاری گل زعفران در مزرعه کوتاه بوده و گل‌ها قبل از باز شدن، برداشت می‌گردند. بنابراین، آلودگی در مزرعه خسارتی به گل‌ها نرزه ولی اسپورها و ریشه‌های قارچ‌های موجود در خاک، قادرند به همراه گل‌های برداشت‌شده منتقل گردند. در مراحل پس از برداشت، به دلیل رطوبت موجود در گل‌ها، به تأخیر افتادن حذف گلبرگ‌ها و روش‌های نامناسب خشک کردن و نگهداری بافت‌ها، اسپورهای قارچ آسپرژیلوس به‌خصوص *Aspergillus flavus* جوانه‌زده و بافت گیاهی را آلوده می‌نماید. این قارچ تعداد زیادی توکسین تولید می‌کند که مهم‌ترین آن‌ها، آفلاتوکسین B1 است (Hesseltine et al., 1966). آفلاتوکسین‌ها نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان‌زایی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. آفلاتوکسین‌های G_1 ، G_2 ، B_1 و B_2 توسط آژانس بین‌المللی پژوهش‌های سرطان (IARC) در گروه A عوامل سرطان‌زا دسته‌بندی شده‌اند (Humans et al., 2002). آفلاتوکسین‌ها می‌توانند بیماری آفلاتوکسیکوزیس را در حیوانات اهلی و انسان ایجاد کنند (Richard, 2007).

وجود آفلاتوکسین در نمونه‌های زعفران عرضه‌شده در فروشگاه‌های مواد غذایی و دارویی توسط محققین مختلفی به اثبات رسیده است. مارتینز و همکاران (Martins et al., 2001) در مطالعه‌ای که روی محصولات خشکبار و ادویه‌ای در لهستان انجام داده‌اند، وجود ۱-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 را در زعفران‌های بسته‌بندی شده موجود در فروشگاه‌های لیسبون مشاهده کردند. بررسی مواد غذایی و ادویه‌ای در استانبول ترکیه نشان داد که نمونه‌های زعفران جمع‌آوری شده در آن کشور، حاوی ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 بودند (Hacibekiroglu & Kolak, 2013). آزون و همکاران (Azzoune et al., 2016) با مطالعه گیاهان دارویی مختلف در

تلقیح بافت زعفران

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارهای این پژوهش شامل بافت زعفران خشک با رطوبت محیطی بالا، بافت مرطوب زعفران، برنج آغشته شده به عصاره غلیظ زعفران و برنج بدون عصاره زعفران بودند. برای هر تیمار از ۱۰۰ میلی گرم بافت زعفران استفاده شده و تمام بافت‌های مورد استفاده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو و استریل شدند (Sinclair & Dhingra, 1995).

برای تلقیح بافت خشک زعفران و به جهت جلوگیری از انتقال آب آزاد و رطوبت مستقیم به بافت زعفران، توده اسپوری توسط یک لام استریل از روی محیط کشت جمع‌آوری و به درون لوله‌های حاوی بافت زعفران خشک شده منتقل شدند. در تیمار زعفران مرطوب، ابتدا بافت زعفران خیس و مرطوب شده و در تمام دوره آلودگی با افزودن رطوبت، مرطوب نگه داشته شدند. تلقیح این بافت‌ها با سوسپانسیون اسپور قارچ صورت گرفت (Sinclair & Dhingra, 1995; Di Primo et al., 2002).

برای بررسی امکان تولید توکسین در مواد غذایی آغشته به زعفران، ابتدا به ۵۰ گرم برنج خشک مقدار ۲۵ میلی‌لیتر آب اضافه گردید و پس از استریل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، توسط سوسپانسیون اسپور قارچ تلقیح شد. به یکی از تیمارهای برنج‌های این پژوهش، محلول آبی بسیار غلیظ زعفران اضافه شد تا عصاره زعفران سطح برنج‌ها را پوشش داده و در زمان اتوکلاو شدن، به درون بافت برنج نفوذ نماید. بافت‌های تلقیح شده به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Shotwell et al., 1966).

بررسی میزان آفلاتوکسین B1

اندازه‌گیری آفلاتوکسین به روش اسکات و تراکسیس

(Scott & Trucksess, 1996) به صورت زیر انجام شد. ۰/۱ گرم نمونه بافت و ۴ میلی‌لیتر آب مقطر با هم مخلوط شد ۶ میلی‌لیتر استون به آن اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه به‌طور کامل تکان داده شد. ۷/۵ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده فوق با ۳ گرم کربنات مس و ۱۰ میلی‌لیتر محلول فریک ژل به‌طور کامل مخلوط شد. ۱۰ میلی‌لیتر از مواد فیلتر شده به یک کیف دکانتور محتوی ۱۰ میلی‌لیتر از $H_2SO_4 + 1$ میلی‌لیتر کلروفرم منتقل و سپس فاز کلروفرم ته‌نشین شده، جداسازی گردید. عصاره کلروفرم تهیه شده در آون با حرارت ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. باقی‌مانده مواد خشک‌شده در حدود ۰/۳ میلی‌لیتر کلروفرم حل گردیده و روی صفحه TLC در یک راستا و همراه استاندارد (۱۰ پی پی ام) نقطه‌گذاری شدند. صفحه در مخزن TLC قرار داده شده تا محلول کلروفرم: استون (۱۲:۸۸) از آن بالا رفته و صفحه شسته شود. صفحه خشک‌شده در زیر نور UV (۳۶۵ نانومتر) بررسی و شدت نقطه فلورسانس آبی نمونه با نقاط فلورسانس استاندارد به روش اسکن فلورسنت مقایسه گردید (Ellis et al., 1991).

نتایج و بحث

کلونیزاسیون بافت در مزرعه

بررسی میدانی بافت‌های گلبرگ زعفران برداشت‌شده از مزرعه، نشان داد که بعد از چند روز، در صورت نامساعد بودن شرایط نگهداری مانند گرمای محیط و انبار بافت‌ها به صورت توده‌ای و متراکم، تمام سطح گل‌ها به گونه‌های مختلف اسپرژیلوس آلوده گردیدند (مشاهدات نگارنده). تاکنون نیز گونه‌های مختلف اسپرژیلوس از بافت‌های زعفران و خاک مزارع زعفران گزارش گردیده است (Noorbakhsh et al., 2009; Saeezadeh, 2014). منبع این آلودگی، در درجه اول آلودگی خاک مزرعه و بعد آلودگی‌های انتقال‌یافته توسط دست‌های کشاورزان، جریان باد، وسایل حمل‌ونقل و آلودگی مکان

نگهداری گل‌ها است.

از آنجایی که برداشت گل و تفکیک کلاله زعفران در مزارع کوچک در زمان بسیار کوتاهی صورت می‌گیرد، معمولاً آلودگی گل‌ها کم خواهد بود. با این وجود، ظریف بودن بافت گلبرگ‌ها و زخمی شدن آن‌ها در حین برداشت، شرایط را برای ایجاد آلودگی فراهم می‌نمایند. بنابراین هرچند در این پژوهش برگ‌های برداشت شده فاقد توکسین بودند ولی اگر طولانی مدت در شرایط انبار نگهداری شده و یا بازه زمانی برداشت گل‌ها تا تفکیک کلاله و گلبرگ‌ها طولانی باشد، حتی در شرایط انبارداری مساعد ممکن است آلودگی در برگ‌ها گسترش یافته و به کلاله‌ها منتقل گردد. یکی از مشکلاتی که کمتر توسط زارعین مورد توجه قرار می‌گیرد، آلودگی گلبرگ‌هایی است که کلاله آن‌ها تفکیک شده است. گلبرگ‌ها چون کارایی خاصی ندارند و غالباً برای مصارفی مانند تغذیه دام استفاده می‌شوند، در شرایط نامناسبی نگهداری و به سرعت به گونه‌های مختلف اسپرژیلوسی که اسپوره‌های آن‌ها از مزرعه همراه گل‌ها منتقل شده، آلوده می‌گردند. این بافت‌ها معمولاً حاوی آفلاتوکسین هستند و ممکن است در شیر دام‌هایی که از آن‌ها تغذیه می‌کنند، ترکیبات ناشی از مصرف آفلاتوکسین خصوصاً آفلاتوکسین M1 یافت گردد (Galvano et al., 1996). خسارت دیگر این مرحله، رشد و تکثیر گونه‌های اسپرژیلوس است که می‌تواند جمعیت گونه‌های سازگار با بافت‌های زعفران را افزایش داده و یا سازگاری گونه‌های قبلی را با بافت زعفران بیشتر نماید (Bayman & Cotty, 1991). از آنجایی که اثر این پدیده در کوتاه‌مدت دیده نمی‌شود معمولاً به آن توجهی نمی‌گردد، درحالی‌که از نظر قارچ‌شناسی و مطالعات جمعیتی قارچ اسپرژیلوس، اهمیت بسیار بالایی دارد.

کلونیزاسیون بافت‌های تلقیح شده

یک هفته پس از تلقیح بافت‌های گیاهی مورد مطالعه،

همگی پوششی از ریشه قارچ داشتند. توده میسلیمی و پوشش ریشه قارچ روی بافت گیاهی در بافت خشک زعفران کم ولی در بافت مرطوب کاملاً مشخص و توده سبز رنگ اسپور قارچی روی آن به خوبی مشخص بود. برنج‌هایی که با اسپور قارچ تلقیح شده بودند هم توده کاملاً مشخص از ریشه قارچ را داشتند ولی روی سطح برنج‌هایی به عصاره زعفران آغشته شده بود، به میزان زیادی پوشش میسلیمی قارچ کاهش یافته بود. معمولاً ۲-۳ روز پس از تلقیح بافت‌های گیاهی توسط قارچ اسپرژیلوس، پوشش سفید رنگ و سپس سبز رنگ قارچ روی بافت مشاهده گردید. میزان رطوبت بافت در این مرحله برای گسترش توده ریشه‌ای بسیار اهمیت دارد.

قارچ اسپرژیلوس با کمترین میزان آب در دسترس (AW) می‌تواند فعالیت کند (Gock et al., 2003). زمانی که AW بالاتر از ۹۰٪ باشد، بسیاری از قارچ‌ها فعال هستند ولی برخی گونه‌های قارچی مانند اسپرژیلوس با ۶۵٪ آب در دسترس هم قادر به رشد هستند (Vinnere Pettersson & Leong, 2011) و با میزان بسیار کم رطوبت محیط، قارچ می‌توانند روی بافت گیاهی رشد کنند. اگر رطوبت محیط بالا باشد، مقدار کمی از آن توسط بافت خشک شده زعفران جذب می‌گردد که می‌تواند برای رشد قارچ اسپرژیلوس بر روی بافت مناسب باشد. به غیر از گونه‌های اسپرژیلوس و پی‌سیلین که با این شرایط سخت سازگار هستند، مابقی قارچ‌های مهم پاتوژن گیاهی این قدرت را ندارند (Júnior et al., 2012). این شرایط برای فعالیت عوامل بیماری‌زا یا خطرناک دیگر، ممکن است خیلی مناسب نباشد ولی برای این گونه‌های قارچی مساعد است.

برنج‌های تلقیح شده، پس از ۳ روز کاملاً سفید رنگ شده و سپس به رنگ سبز تغییر رنگ دادند و پوشش قارچ روی آن‌ها به وضوح قابل مشاهده بود. در نمونه‌های برنج تیمار شده با عصاره زعفران، پوشش قارچ به تراکم و شدت برنج‌های فاقد

کروماتوگرافی آن بر روی کاغذ TLC، بافت‌های خشک زعفران که به اسپور قارچ آلوده شده و در رطوبت محیطی بالا ننگه‌داری شده بودند، همگی حاوی آفلاتوکسین بودند. نتیجه این بخش نشان داد که هرچند بافت زعفران پس از برداشت به‌خوبی خشک می‌گردد ولی بافت خشک نیز در صورت وجود رطوبت محیطی، آلوده شده و آفلاتوکسین در آن تولید می‌گردد. میزان آفلاتوکسین در بافت‌های با درصدهای مختلف کلونیزاسیون، تفاوت معنی‌داری باهم داشته و میزان کلونیزاسیون بافت و تولید آفلاتوکسین همبستگی مثبتی باهم داشتند (جدول ۱ و ۲). بیشترین میزان توکسین تولیدی در این پژوهش ۱۰ میلی‌گرم توکسین بر هر کیلوگرم بافت گیاهی بود. این میزان در بافت‌های برنج حاوی زعفران تا یک‌دهم کاهش یافت. در بافت‌های زعفران تلقیح شده در این تحقیق کمتر از ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 مشاهده گردید (شکل ۱). این میزان توکسین در مدت زمان ۱۰ روز تولید گردید. بنابراین در صورت آلودگی بافت زعفران و انبارداری طولانی مدت آن‌ها، میزان آفلاتوکسین در آن‌ها ممکن به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کند.

تولید توکسین در هر دو گروه برنج‌های آغشته به زعفران و برنج‌های بدون زعفران مشاهده گردید. تولید آفلاتوکسین در حضور زعفران نصف برنج‌های بدون زعفران بود و با تولید آفلاتوکسین در شرایط طبیعی تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱ و ۲). نتیجه این بخش نشان می‌دهد که آغشته کردن موادغذایی به زعفران می‌تواند تولید آفلاتوکسین را در آن‌ها کاهش دهد ولی نمی‌تواند مانع آلودگی توسط قارچ‌های مولد آفلاتوکسین گردد (شکل ۱).

بر اساس یافته‌های این پژوهش، هرچند مقالات متعددی در مورد خاصیت ضد قارچی زعفران وجود دارد (Vahidi et al., 2002)، ولی این گیاه در تمام مراحل نگهداری ممکن است به گونه‌های قارچی مولد آفلاتوکسین آلوده شده و این توکسین

عصاره زعفران نبود. همچنین به دلیل رنگ زعفران، پوشش قارچ به‌راحتی قابل مشاهده نبود ولی با فاصله زمانی دیرتر از تیمار بدون زعفران، پوشش قارچی روی برنج‌ها مشاهده گردید. میزان رشد قارچ روی بافت‌های زعفران مرطوب، بیشتر از بافت‌های خشک بود و نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. در زعفران‌های بسته‌بندی شده، این شرایط زمانی ایجاد می‌گردد که بافت زعفران قبل از بسته‌بندی به‌خوبی خشک نشده یا در زمان بسته‌بندی مرطوب شده باشد و آلودگی‌هایی که در مزرعه یا زمان برداشت و تفکیک کالاه ایجاد شده، گسترش یافته و باعث تولید آفلاتوکسین گردد.

بر اساس نتایج این پژوهش، پوشش قارچ اسپریلوس روی تمام بافت‌های مطالعه شده تشکیل گردید ولی در میزان کلونیزاسیون بافت و توده میسلیمی بین تیمارها تفاوت وجود داشت، بین کلونیزاسیون بافت در مقادیر مختلف رطوبت، تفاوت معنی‌دار وجود داشت. میزان کلونیزاسیون بافت توسط قارچ با رطوبت محیط ارتباط مستقیم داشت. بنابراین در صورت وجود رطوبت در محیط یا مرطوب بودن بافت زعفران، حتماً قارچ اسپریلوس آن را کلونیزه خواهد کرد که این پدیده ممکن است منجر به تولید آفلاتوکسین B1 گردد. آغشته کردن موادغذایی به عصاره زعفران به‌منظور کاهش آلودگی به گونه‌های اسپریلوس، می‌تواند منجر به کاهش کلونیزاسیون بافت گردد ولی نمی‌تواند رشد قارچ را روی این بافت‌ها متوقف نماید. در شرایط آزمایشگاهی، به‌طور معمول در طول ۳-۲ روز پوشش سفیدی از قارچ روی بافت‌ها ایجاد می‌شود و بعد از آن به دلیل تولید اسپور، رنگ پوشش به رنگ سبز تغییر پیدا می‌کند و پس از ۷-۵ روز نیز سطح بالایی از توکسین در بافت ایجاد می‌گردد (Shotwell et al., 1966).

بررسی میزان آفلاتوکسین

پس از استخراج آفلاتوکسین از بافت‌های تلقیح شده و

می‌رفت به دلیل کلونیزاسیون کم بافت‌ها، میزان توکسین تولیدشده بسیار کمتر از بافت مرطوب بود درحالی‌که در بافت مرطوب به دلیل کلونیزاسیون بالای بافت‌های زعفران، میزان توکسین زیادی تولید شده بود. در بافت‌های برنج آغشته به عصاره زعفران، توکسین تولیدشده در مقایسه با برنج بدون عصاره زعفران سطح بسیار پایین‌تری داشت که با میزان کلونیزاسیون بافت ارتباط مستقیم داشت. افزایش میزان توکسین یک تا دو روز پس از کلونیزاسیون اتفاق افتاده و پس از مدتی تمام بافت کلونیزه شده و میزان توکسین به بالاترین سطح خود رسید.

درون بافت‌های زعفران تولید گردد. هر چه این پوشش کمتر باشد یعنی رشد قارچ و اسپوردهی کمتر و به تبع آن تولید توکسین هم کمتر خواهد بود.

پس از قرار دادن عصاره هر کدام از نمونه‌ها روی کاغذ TLC و مقایسه توکسین آن‌ها با نقاط استاندارد آفلاتوکسین B₁، مشاهده شد که در تمام بافت‌های تلقیح شده با *A. flavus* آفلاتوکسین B₁ تشکیل گردیده که بر اساس مقایسه میزان رنگ فلورسانس حاصل از نقطه‌گذاری، میزان آن کمتر از ۱ ppm بود. همچنین میزان توکسین تولیدی بسته به شرایط آزمایش متفاوت بود. در بافت خشک همان‌گونه که انتظار

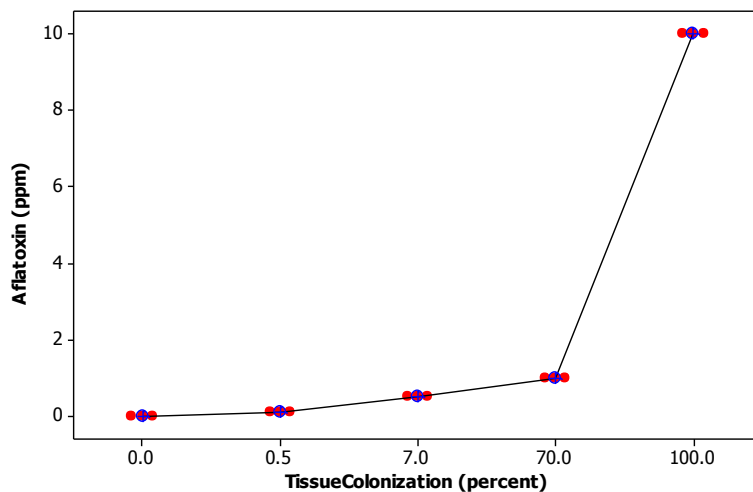
جدول ۱- تجزیه واریانس میزان تولید آفلاتوکسین B₁ ناشی از کلونیزاسیون بافت زعفران توسط *Aspergillus flavus*
Table 1- Analysis of the aflatoxin production in saffron versus tissue colonization by *Aspergillus flavus*

منبع تغییرات Source	درجه آزادی DF	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean square	F	سطح معنی‌داری P
کلونیزاسیون بافت Tissue Colonization	4	223.0440	55.7610	*	*
خطا Error	10	0.0000	0.0000		
مجموع Total	14	223.0440			

*: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد
*: Significant at 1% probability level

جدول ۲- مقایسه سطوح مختلف تولید آفلاتوکسین B₁ در درصدهای مختلف کلونیزاسیون بافت زعفران توسط *Aspergillus flavus*
Table 2- Different levels of aflatoxin production in saffron tissue versus tissue colonization by *Aspergillus flavus*

کلونیزاسیون بافت Tissue Colonization	تکرار N	میانگین Mean	گروه‌بندی Grouping
100.0	3	10.000	A
70.0	3	1.000	B
7.0	3	0.5000	C
0.5	3	0.1000	D
0.0	3	0.000	E



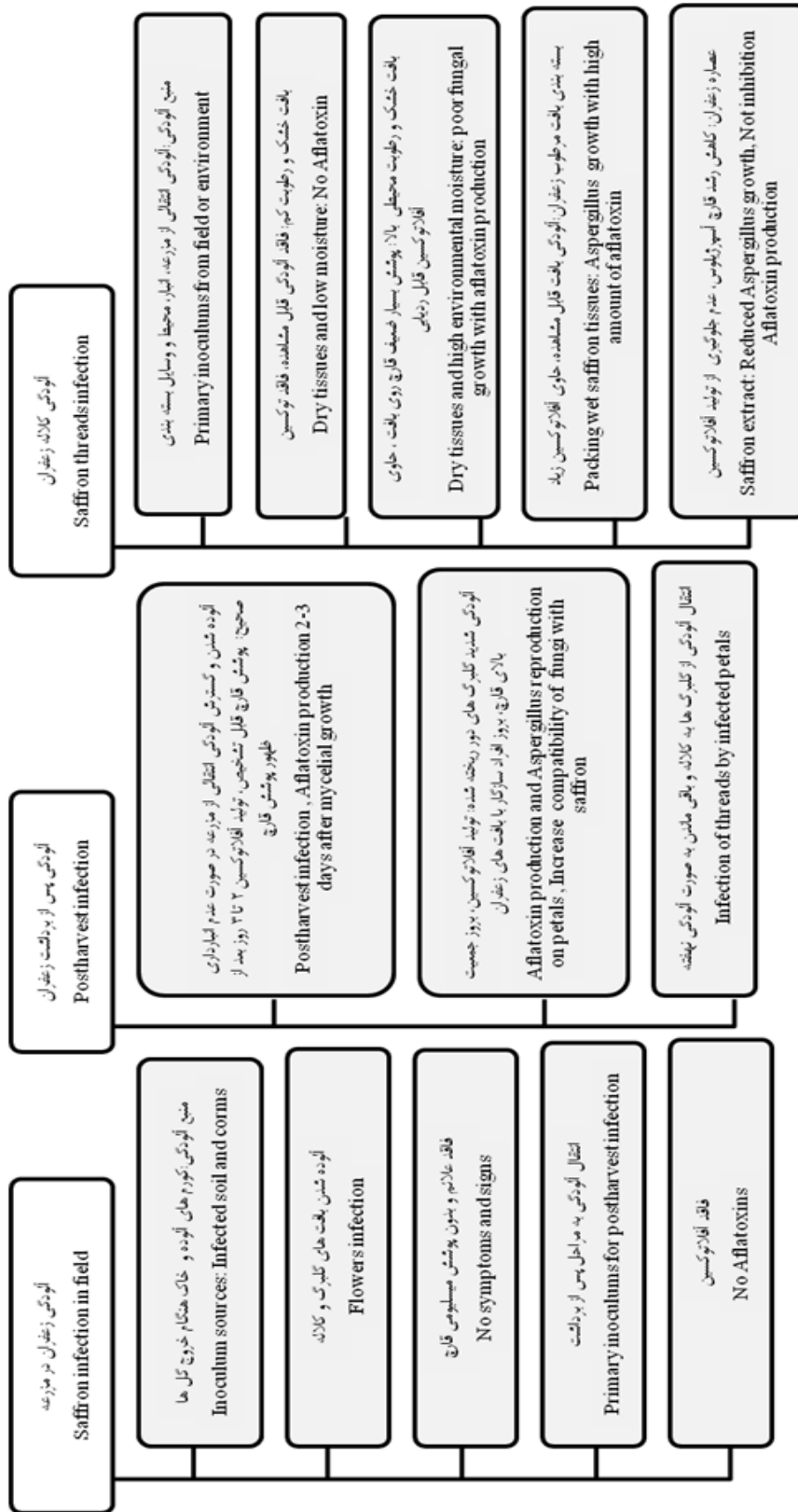
شکل ۱- میزان آلودگی بافت و تولید آفاتوکسین B₁ در بافت زعفران (خشک و مرطوب)، برنج زعفرانی و بدون عصاره زعفران
 Figure 1- Tissue infection and aflatoxin production in saffron tissues (dry and wet), rice grains with and without saffron extract

میزان توکسین تولیدشده در آن‌ها را کمتر نماید.

اثر زعفران بر رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها توسط متخصصین زیادی بررسی شده است و در شرایط *In vitro* این اثر به اثبات رسیده است. نتایج این پژوهش نشان داد که این ماده گیاهی با ارزش می‌تواند تا حدودی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس ممانعت به عمل آورد ولی این قارچ حتی بر روی بافت‌های خشک زعفران قادر به رشد خواهد بود و توانایی تولید آفاتوکسین B₁ را بر روی بافت‌های این گیاه خواهد داشت. بنابراین فرآوری صحیح و کامل این محصول با ارزش و نگهداری در شرایط مناسب یکی از نکات ضروری است که توسط کشاورزان و فروشندگان این محصول باید رعایت شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که الگوی ترسیم شده در شکل ۲ درباره تولید آفاتوکسین در بافت زعفران قابل مشاهده است. بافت زعفران حتی در زمانی که خشک شده است، در صورت مساعد بودن شرایط محیطی می‌تواند به قارچ آسپرژیلوس فلاووس آلوده گردد که این شرایط در زمان بسته‌بندی نامناسب در کیسه‌های پلاستیکی ممکن است فراهم گردد. آلودگی بافت مرطوب زعفران نشان داد که بسته‌بندی و انبارداری زعفران قبل از خشک شدن کامل بافت‌ها می‌تواند شرایط را برای رشد قارچ و تولید آفاتوکسین B₁ فراهم نماید (شکل ۲). آغشته کردن مواد غذایی به عصاره زعفران می‌تواند میزان رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را روی این بافت‌ها کاهش داده و در نتیجه



شکل ۲- آلودگی بافت زعفران به وسیله *Aspergillus flavus* و تولید آفاتوکسین از مزرعه تا انبارداری
Figure 2- Infection of Saffron tissues and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* from form to storage.

منابع

- Azzoune, N., Mokrane, S., Riba, A., Bouras, N., Verheecke, C., Sabaou, N., and Mathieu, F. 2016. Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 8: 1-8.
- Bayman, P., and Cotty, P.J. 1991. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canadian Journal of Botany* 69: 1707-1711.
- Beheshti, H.R., Sadat Fakoor Janati, S., Feizy, J., and Asadi, M. 2014. Aflatoxin determination in saffron by high-performance liquid chromatography and immunoaffinity column clean-up. *Saffron Agronomy and Technology* 1: 102-111.
- Davis, N.D., Diener, U.L., and Eldridge, D.W. 1966. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology* 14: 378-380.
- Di Primo, P., Cappelli, C., and Katan, T. 2002. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* from saffron. *European journal of plant pathology* 108: 869-875.
- Ellis, W., Smith, J., Simpson, B., Oldham, J., and Scott, P.M. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30: 403-439.
- Galvano, F., Galofaro, V., and Galvano, G. 1996. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *Journal of Food Protection* 59: 1079-1090.
- Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I., and Poulos, P.G. 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 81: 11-19.
- Hacibekiroglu, I., and Kolak, U. 2013. Aflatoxins in various food from Istanbul, Turkey. *Food Addit Contam Part B Surveill* 6: 260-264.
- Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Ellis, J.J., and Stubblefield, R.D. 1966. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriological Reviews* 30: 795-805.
- Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t., Organization, W.H., and Cancer, I.A.f.R.o. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *World Health Organization*.
- Júnior, D.P.L., Yamamoto, A.C.A., de Souza Amadio, J.V.R., Martins, E.R., do Santos, F.A.L., Simoes, S.d.A.A., and Hahn, R.C. 2012. Trichocomaceae: biodiversity of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp residing in libraries. *The Journal of Infection in Developing Countries* 6: 734-743.
- Kafi, M., Koocheki, A., and Rashed, M.H. 2006. *Saffron (Crocus sativus): Production and Processing*. Science Publishers.
- Martins, M.L., Martins, H.M., and Bernardo, F. 2001. Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Addit Contam* 18: 315-319.
- Noorbakhsh, R., Bahrami, A.R., Mortazavi, S.A., Forghani, B., and Bahreini, M. 2009. PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. *Food Science and Biotechnology* 18: 1038-1041.
- Pawar, V., and Thaker, V. 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*.

- Mycoses 49: 316-323.
- Richard, J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. International Journal of Food Microbiology 119: 3-10.
- Saeedizadeh, A. 2014. Identification of some saffron corm rot fungi and their control. Saffron Agronomy and Technology 2: 205-213.
- Scott, P.M., and Trucksess, M.W. 1996. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. Journal of AOAC International 80: 941-949.
- Shotwell, O.L., Hesseltine, C., Stubblefield, R., and Sorenson, W. 1966. Production of aflatoxin on rice. Applied Microbiology 14: 425-428.
- Sinclair, J.B., and Dhingra, O.D. 1995. Basic plant pathology methods. CRC press.
- Vahidi, H., Kamalinejad, M., and Sedaghati, N. 2002. Antimicrobial properties of *Croccus sativus* L. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 1: 33-35.
- Vinnere Pettersson, O., and Leong, S.I.L. 2011. Fungal Xerophiles (Osmophiles). eLS.

Short Communication

A study on the possibility of aflatoxin B1 production in saffron*Abbas Mohammadi^{1*}, Simin Najjar² and Fahime Sangi Kazem Abad²**Submitted: 10 July, 2015**Accepted: 1 March, 2016*

Mohammadi, A., Najjar, S., and Sangi Kazem Abad, F. 2017. A study on the possibility of production of aflatoxin B1 in saffron. *Saffron Agronomy & Technology* 5(2): 185-194.

Abstract

Saffron is the most important medicinal plants in the Khorasan Razavi and South Khorasan provinces, Iran. *Aspergillus* species can infect saffron tissues during harvesting, storage and transportation. Aflatoxin B1 is one of the important carcinogenic mycotoxin which is produced by *Aspergillus* species in saffron tissues. This study was carried out in order to investigate the production of aflatoxin B1 in saffron tissues from farm to food by TLC chromatography during the year 2015. Wet and dry saffron tissues and rice grains (with and without saffron extract) were inoculated with *Aspergillus flavus* spore suspensions. Production of Aflatoxin B1 in inoculated tissues was investigated by the TLC chromatography method. The results showed that the wet leaves and rice grains were infected with *Aspergillus* species very quickly. However, this process was very slow in dry tissues. Aflatoxin B1 was detected in all of the tested samples. The amounts of Aflatoxin B1 in the wet saffron tissues and rice grains were more than those found in dry tissues and saffron rice, respectively. The amount of Aflatoxin B1 had a direct correlation with moisture in the environment and the tissues. The contamination of the tissues and production of Aflatoxin B1 were increased with increasing the amount of moisture. The results showed that the packaging of saffron before complete drying of its tissue or storing it in conditions with high humidity can increase the risk of infection with the *Aspergillus* species and production of Aflatoxin B1 in them. Based on our data, saffron can reduce *Aspergillus* infection and aflatoxin B1 production but not inhibit it. Saffron extract reduces *Aspergillus* infection and Aflatoxin B1 production in food and grains.

Keywords: Mycotoxins, Infection, *Aspergillus flavus*, Rice, Chromatography.

1- Assistant professor of Plant Pathology, Department of Crop Protection, College of Agriculture, University of Birjand

2- M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Crop Protection, College of Agriculture, University of Birjand

(*- Corresponding author Email: Amohammadi@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2017.29711.1098