Saffron Agronomy & Technology
Vol. 5, No. 2, Summer 2017, P. 185-194

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶ ص. ۱۹۴-۱۸۵

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 دریافت: ۱۹ تیر ۱۳۹۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۱ اسفند 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 ارزش‌ترین محصولات دارویی استان‌های خراسان‌رضوی و جنوبی است که در تمام مراحل برداشت، انتقال و انبارداری ممکن است به گونه‌های مختلف قارچ *Aspergillus* آلوده گردد. یکی از توکسین‌های 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. بافت‌های خشک و مرطوب زعفران و بافت‌های برنج آغشته شده به عصاره زعفران، با *A. flavus* تلقیح گردیده و تولید آفلاتوکسین در آن‌ها به روش کروماتوگرافی TLC بررسی گردید. قارچ آسپرژیلوس توانست در شرایط مختلف این پژوهش، تمام بافت‌های تلقیح شده را آلوده نماید. مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 در تیمارهای مختلف به استثنای زعفران‌های نگه‌داری شده در شرایط خشک (شاهد)، تولید گردید. در بافت‌های 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، بافت‌های زعفران به‌سرعت در شرایط گرم و مرطوب به گونه‌های مختلف آسپرژیلوس آلوده می‌گردند. زعفران خشک و مرطوب تلقیح شده با قارچ آسپرژیلوس، پس از مدتی حاوی مقدار زیادی آفلاتوکسین بود. میزان آفلاتوکسین تولیدی در بافت‌های 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 موادغذایی به زعفران هرچند میزان تولید آفلاتوکسین B1 را کاهش داد ولی تولید آن را متوقف نکرد. نتایج این پژوهش نشان داد که بسته‌بندی زعفران قبل از خشک شدن کامل بافت یا نگه‌داری آن‌ها در شرایط رطوبت بالا، خطر آلودگی به قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در آن‌ها را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: آلودگی، آسپرژیلوس، برنج، توکسین‌های قارچی، کروماتوگرافی.

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) با سطح زیر کشت ۷۳۱۱۹ هکتار، یکی از گیاهان دارویی با ارزش استان‌های خراسان رضوی و جنوبی است (Kafi et al., 2006). باوجود آن‌که 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 قارچ‌های مولد

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

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 نزده ولی اسپورها و ریسه‌های 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_2، G_1، B_2 و B_1 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 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 گردند. 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 ایمونوافینیتی، 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 موادغذایی 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 به‌عنوان 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.

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 میلی‌گرم 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 خشک‌شده 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) به‌صورت 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 قیف دکانتور محتوی ۱۰ میلی‌لیتر از H_2SO_4 +۱ 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 (۱:۱۲:۸۸) از آن بالا رفته و صفحه شسته شود. صفحه خشک‌شده در زیرنور 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 به‌صورت توده‌ای و متراکم، تمام سطح گل‌ها به گونه‌های مختلف آسپرژیلوس آلوده گردیدند (مشاهدات نگارنده). تاکنون نیز گونه‌های مختلف آسپرژیلوس از بافت‌های زعفران و خاک مزارع زعفران گزارش گردیده است (Noorbakhsh et al., 2009; Saeedizadeh, 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 آنجایی‌که برداشت گل و تفکیک کلاله زعفران در مزارع کوچک در زمان بسیار کوتاهی صورت می‌گیرد، معمولاً آلودگی گل‌ها کم خواهد بود. با این‌وجود، 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 به‌سرعت به گونه‌های مختلف آسپرژیلوسی که اسپورهای 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 آسپرژیلوس 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 آنجایی‌که اثر این پدیده در کوتاه‌مدت دیده نمی‌شود معمولاً به آن توجهی نمی‌گردد، درحالی‌که از نظر قارچ‌شناسی و مطالعات جمعیتی قارچ آسپرژیلوس، اهمیت بسیار بالایی دارد.

کلونیزاسیون بافت‌های تلقیح شده

یک هفته پس از تلقیح بافت‌های گیاهی مورد مطالعه، همگی پوششی از ریسه قارچ داشتند. توده میسلیومی و پوشش ریسه قارچ روی بافت گیاهی در بافت خشک زعفران کم ولی در بافت مرطوب کاملاً مشخص و توده سبزرنگ اسپور قارچی روی آن به‌خوبی مشخص بود. برنج‌هایی که با اسپور قارچ تلقیح شده بودند هم توده کاملاً مشخص از ریسه قارچ را داشتند ولی روی سطح برنج‌هایی به عصاره زعفران آغشته شده بود، به میزان زیادی پوشش میسلیومی قارچ کاهش یافته بود. معمولاً ۳-۲ روز پس از تلقیح بافت‌های گیاهی توسط قارچ آسپرژیلوس، پوشش سفیدرنگ و سپس سبزرنگ قارچ روی بافت مشاهده گردید. میزان رطوبت بافت در این مرحله برای گسترش توده ریسه‌ای بسیار اهمیت دارد.

قارچ آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس 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 خشک‌شده زعفران جذب می‌گردد که می‌تواند برای رشد قارچ آسپرژیلوس بر روی بافت مناسب باشد. به‌غیر از گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلین 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 این‌گونه‌های قارچی مساعد است.

برنج‌های تلقیح شده، پس از ۳ روز کاملاً سفیدرنگ 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

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 کلاله ایجادشده، گسترش یافته و باعث تولید آفلاتوکسین گردد.

بر اساس نتایج این پژوهش، پوشش قارچ آسپرژیلوس روی تمام بافت‌های مطالعه شده تشکیل گردید ولی در میزان کلونیزاسیون بافت و توده میسلیومی 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 آسپرژیلوس آن را کلونیزه خواهد کرد که این پدیده ممکن است منجر به تولید آفلاتوکسین B1 گردد. آغشته کردن موادغذایی به عصاره زعفران به‌منظورکاهش آلودگی به گونه‌های آسپرژیلوس، 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 کروماتوگرافی آن بر روی کاغذ TLC، بافت‌های خشک زعفران که به اسپور قارچ آلوده شده و در رطوبت محیطی بالا نگه‌داری 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 محیط، آلوده‌شده 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 با هم 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 ا میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 مشاهده گردید (شکل ۱). این میزان توکسین در مدت‌زمان 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 (جداول 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

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

پس از قرار دادن عصاره هرکدام 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 B_1 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 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. دربافت‌های 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.

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان تولیدآفلاتوکسین B1 ناشی ازکلونیزاسیون 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 TissueColonization	4	223.0440	55.7610	*	*
خطا Error	10	0.0000	0.0000		
مجموع Total	14	223.0440			

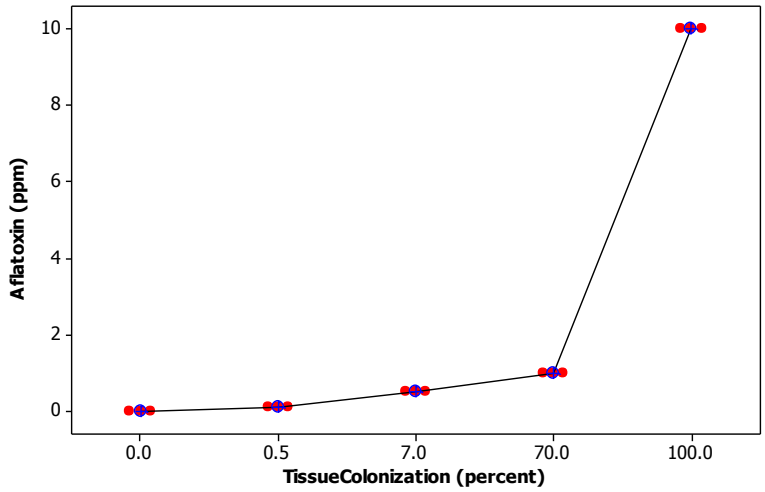
*: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

*: 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



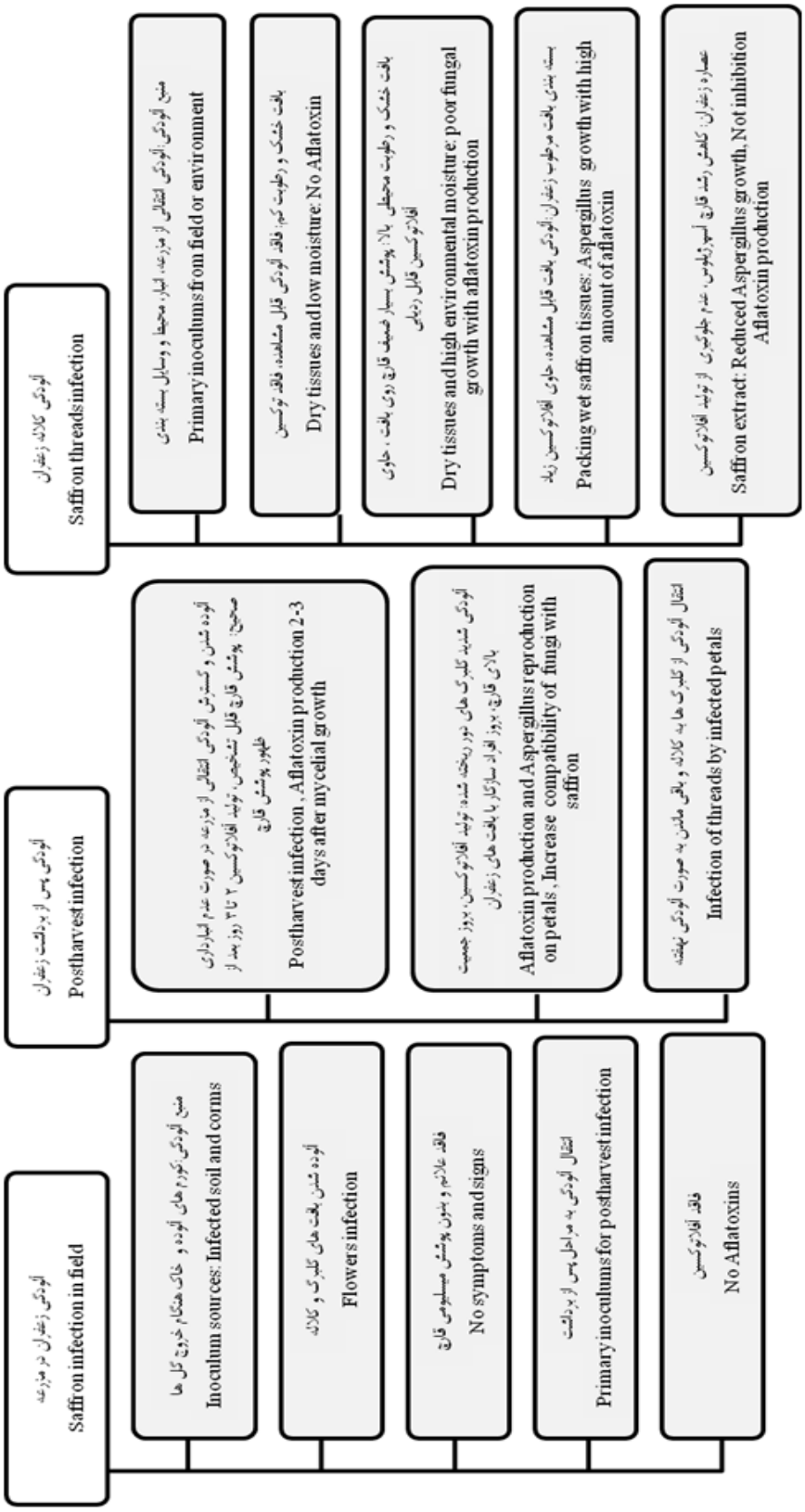
شکل ۱– میزان آلودگی بافت و تولید آفلاتوکسین B1 در بافت زعفران (خشک و مرطوب)، برنج زعفرانی و بدون عصاره زعفران

Figure1- Tissue infection and aflatoxin production in saffron tissues (dry and wet), rice grains with and without saffron extract

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که الگویترسیم شده در شکل ۲ درباره تولید آفلاتوکسین در بافت زعفران قابل‌مشاهده است. بافت زعفران حتی در زمانی که خشک‌شده‌است، 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 آفلاتوکسین B_1 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 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 آفلاتوکسین B_1 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.



شکل ۲-آلودگی بافت زعفران به‌وسیله *Aspergillus flavus* و تولید آفلاتوکسین 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 somexerophilic 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 andstyrene. 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.l.L. 2011. Fungal Xerophiles (Osmophiles). eLS.

Short Communication

A study on the possibility of aflatoxin B1 production in saffron

Abbas Mohammadi[1*], Simin Najjar[2] and Fahime Sangi Kazem Abad[2]

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 AflatoxinB1 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