ORIGINAL ARTICLE

Assessment of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Levels in Rice Produced in Khuzestan and Kohgiluyeh and Boyer Ahmad Provinces, Iran

Sahand Jorfi[1],
Sudabeh Pourfadakari[2],
Hakimeh Pourhosseini[3],
Mehdi Zarei[4],
Mehrnosh Abtahi[5],
Reza Saeedi[5]

[1] Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Environmental Technologies Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2] PhD Student in Environmental Health Engineering, School of Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] MSc in Environmental Health Engineering, School of Public Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 30, 2017 Accepted July 24, 2017)

Abstract

Background and purpose: Contamination of food materials such as rice to mycotoxins (aflatoxin B1 and Ochratoxin A) is a major health concern. This causes more concerns especially in countries that rice is the main food. Nephrotoxic, immunotoxic, mutagenic, teratogenic, and carcinogenic effects of such mycotoxins to human are reported by WHO and EPA. The main objective of current study was to determine the contamination of rice produced in Kohgiluyeh and boyer Ahmad and Khuzestan provinces to aflatoxin B_1 and Ochratoxin A.

Materials and methods: In a cross-sectional study, 85 samples were randomly collected from rice farms in Basht, Yasuj, Gachsaran and Dena in Kohgiluyeh and Boyer Ahmad province and Ramhormoz in Khuzestan province. Contaminations to Aflatoxin B_1 and Ochratoxin A were quantified using ELISA method and data was statistically analyzed by SPSS V18.

Results: The concentration of aflatoxin B1 was less than the limits specified by the Iran National standard and the Union of Europe standard value in 80.58% of the samples. Also, the levels of Ochratoxin A in 100% of the samples were less than standard limits. The average concentrations of aflatoxin B_1 and Ochratoxin were 4.70 ng/g and 2.02 ng/g in all samples, respectively. In addition, there was a positive correlation between Aflatoxin B_1 and temperature and humidity $P=0.001$.

Conclusion: This research showed a potential contamination to fungi and its toxins in rice. Increase in temperature and humidity directly increased aflatoxin B_1 levels.

Keywords: rice contamination, Aflatoxin B_1, Ochratoxin A, Kohgiluyeh and boyer Ahmad, Khuzestan

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (156): 66- 79 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۶ دی سال ۱۳۹۶ (۷۹-۶۶)

ارزیابی میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در برنج های تولید شده دو استان خوزستان و کهگیلویه و بویراحمد

سهند جرفی[۱]
سودابه پورفداکاری[۲]
حکیمه پورحسینی[۳]
مهدی زارعی[۴]
مهرنوش ابطحی[۵]
رضا سعیدی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی مواد غذایی به خصوص برنج به مایکوتوکسین‌هایی چون آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A، نگرانی اصلی در کشورهایی است که برنج سهم قابل توجهی در منبع غذایی عمومی دارد. اثرات نفروتوکسیک، ایمونوتوکسیک، موتاژنیک، تراتوژنیک و کارسینوژنیک مایکوتوکسین ها روی سلامت انسان توسط WHO-EPA گزارش شده است. هدف اصلی از مطالعه حاضر، تعیین آلودگی برنج تولیدی به آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در استان خوزستان و کهگیلویه و بویر احمد بود

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، تعداد ۸۵ نمونه از برنج های مصرفی از کشاورزان شهرستان های باشت، یاسوج، گچساران و دنا از استان کهگیلویه و بویراحمد و شهرستان رامهرمز از استان خوزستان به صورت تصادفی جمع آوری شد و از نظر آلودگی به آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A، به کمک روش الایزای رقابتی مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج با نرم افزار SPSSنسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان دادکه غلظت آفلاتوکسین B_1 در ۸۰/۵۸ درصد از نمونه‌ها کم‌تر از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران و اتحادیه اروپا بوده است. سطح اکراتوکسین A در ۱۰۰ درصد از نمونه‌ها کم‌تر از حد استاندارد بود. میانگین غلظت آفلاتوکسین B_1 و اکراتوکسین در نمونه‌ها به ترتیب ۴/۷۰ نانوگرم برگرم و ۲/۰۲ نانوگرم برگرم بود. بین آفلاتوکسین B_1 و دما و رطوبت ارتباط معنی‌داری وجود داشت. p value=۰/۰۰۱

استنتاج: نتایج مطالعه نشان دادکه آلودگی بالقوه به قارچ و سم ناشی از آن وجود دارد. با افزایش دما و رطوبت میزان سم آفلاتوکسین B1 افزایش یافت.

واژه های کلیدی: آلودگی برنج، آفلاتوکسین B1، اکراتوکسین A، استان های کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان

مقدمه

برنج مهم‌ترین محصول و منبع غذایی بیش از یک سوم جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد. طی دو دهه اخیر میزان مصرف سرانه برنج کشور از ۱۵ تا ۲۰ کیلوگرم به ۳۸ تا ۴۰ کیلوگرم افزایش یافته است(۱). ایران با داشتن نزدیک به ۶۳۰ هزار هکتار زمین کشاورزی اختصاص‌یافته برای کشت برنج و تولید

مولف مسئول: سهند جرفی- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده بهداشت Email: sahand369@yahoo.com
۱. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات فناوری های زیست محیطی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. کارشناس ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴. دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۵. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۱/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۵/۲

سالانه نزدیک به ۲/۵ میلیون تن برنج، رتبه جهانی ۲۳ در تولید و ۲۶ در زمین‌های تحت کشت و ۱۳ در مصرف آن را به خود اختصاص داده است(۲،۳).

بسیاری از محصولات کشاورزی، از اولین مراحل کشت تا هنگام مصرف در معرض آلوده شدن به قارچ‌ها قرار دارند. چنان‌چه قارچ آلوده کننده از سویه‌های توکسین‌زا باشد، ممکن است در مراحلی از رشد خود به عنوان متابولیت ثانویه ایجاد مایکوتوکسین نماید(۴،۵). برنج یکی از اقلام پر مصرف غذایی است که در معرض آلودگی به مایکوتوکسین‌ها قرار داد. در حال حاضر به خوبی ثابت شده است که متابولیت‌های سمی قارچ‌ها یا مایکوتوکسین‌ها مسئول بسیاری از اپیدمی‌ها در جوامع انسانی و دامی به ویژه در دوران اخیر بوده‌اند. آلودگی قارچی برنج مورد مصرف غذایی انسان، به طور مستقیم از مسیر گوارشی و یا غیرمستقیم در اثر امکان تولید مایکوتوکسین‌ها در دانه‌ها، حیات و سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد(۶،۷). به طور کلی، رطوبت نسبی بالاتر از ۶۵ درصد و درجه حرارت بیش‌تر از ۵ -۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در انبار، شرایط را برای فعالیت میکروبی آماده می‌کند(۸).

مایکوتوکسین‌ها (Mycotoxins) دسته بزرگی از این سموم طبیعی را شامل می‌شوند و در سطح جهان به عنوان آلوده کننده‌های مواد غذایی مطرح می‌باشند. مایکوتوکسین‌ها ترکیباتی با ساختمان شیمیایی متفاوت و با وزن مولکولی کم می‌باشند که متابولیت ثانویه قارچ‌ها و کپک‌ها هستند(۹،۱۰). مایکوتوکسین‌هایی مانند زرالنون، آفلاتوکسین، فومونیزین و اکراتوکسین جزء مایکوتوکسین‌های سرطان زا می‌باشند که مصرف اغذیه آلوده به این مایکوتوکسین‌ها با وقوع موارد متعددی از سرطان ازوفاژیال، کبد، کلیه و عوارض سوء دیگر در انسان و حیوان همراه بوده است(۱۱). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی(WHO) ، میزان حد مجاز سم آفلاتوکسین در کشورهای مختلف متفاوت بوده و تا ۵۰ Kg/µg در ماده غذایی می‌باشد (۱۲).

هم‌چنین حد مجاز تعیین شده اتحادیه اروپا برای اکراتوکسین A Kg/ µg5 بیان شده است(۱۳).

از مهم‌ترین قارچ‌های آلوده کننده اغذیه که در بروز مسمومیت‌ها نقش مهم‌تری دارند، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشند. سموم مترشحه از این قارچ‌ها، آفلاتوکسین نام دارد. آفلاتوکسین‌ها از دسته مایکوتوکسین‌ها، ترکیبات مقاومی هستند که در چرخه طبیعت به مدت طولانی گردش نموده و از طریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان می‌شوند. هرچند مقادیر سموم مصرفی در انسان بسیار اندک است، ولی به دلیل خاصیت تجمعی مایکوتوکسین‌ها، در بلند مدت عوارضی از جمله تضعیف سیستم ایمنی، سرطان کبدی، اختلالات گوارشی، خونی، کلیوی، جلوگیری از ساخته شدن RNA و پروتئین و هموآگلوتیناسیون ایجاد می کند (۱۴، ۱۵). انواع آفلاتوکسین عبارتند از B1 ، B2، M1 ، M2، G1 ، G2 ، P1و Q1که آفلاتوکسین B1 از نظر بیولوژیکی، فعال‌ترین مشتق آفلاتوکسین از بین آفلاتوکسین‌های شناخته شده است(۱۶،۱۷).

آژانس بین المللی تحقیقات سرطان، آفلاتوکسین B1 را در گروه جهش‌زای انسانی که عضو هدف آن کبد است، طبقه‌بندی کرده است(۱۸). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، میزان بیشینه آفلاتوکسین B1 و مجموع انواع آفلاتوکسین‌ها در برنج را به ترتیب ۵ و ۳۰ نانوگرم بر گرم مشخص نموده است(۱۹).

اکراتوکسین A یک مایکوتوکسین ایزوکومارین کلرینه مشتق از فنیل آلانین است که توسط گونه‌های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم تولید می‌شود. اکراتوکسین A در همه‌گیری نفروپاتی بالکان و سرطان بخش فوقانی مجاری ادراری نقش دارد. به علاوه، مطالعه روی حیوانات نشان داده است که اکراتوکسین A یک سم کبدی، مختل کننده دستگاه ایمنی و یک عامل بالقوه سرطان زا است. اکراتوکسین A در گروه ۲ Bطبقه‌بندی آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer -

(IRACدر سال ۲۰۰۴ قرار دارد(۲۰). بر اساس استاندارد شماره ۵۹۲۵ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مقدار اکراتوکسین A در برنج ۵ نانوگرم بر گرم می‌باشد(۲۱).

در مطالعه انجام گرفته توسط نجفیان در ارقام مختلف برنج‌های تولید داخل و وارداتی از نظر میزان آفلاتوکسین نتایج نشان داد که نمونه های داخلی نسبت به نمونه های وارداتی آلودگی کم‌تری داشتند. هم‌چنین در همه موارد برنج پخته نسبت به برنج خام آلودگی کم‌تری داشت(۱۲). در مطالعه دیگری که توسط رحیمی و همکارانش روی آلودگی اکراتوکسین A در برنج‌های عرضه شده در اصفهان انجام گرفت، نتایج نشان داد که از بین ۱۲۰ نمونه بررسی شده، غلظت اکراتوکسین A در ۳/۳ درصد نمونه‌ها بیش از حد مجاز تعیین شده توسط اتحادیه اروپا برای غلات بوده است(۲۲). در مطالعه‌ای که توسط محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای بررسی آفلاتوکسین در برنج‌های وارداتی در شهر بوشهر انجام شد، نتایج نشان داد که ۷۵ درصد نمونه‌ها، آلودگی آفلاتوکسین B1 داشتند که در محدوده ۳/۳-۰/۹ نانوگرم بر گرم بوده و میزان آلودگی در هیچ کدام از نمونه‌های نامبرده بالاتر از حداکثر میزان مجاز تعیین شده (۳۰ نانوگرم بر گرم) توسط سازمان تحقیقات و استاندارد صنعتی ایران نبوده است. از ۱۵۲ نمونه آنالیز شده، حدود ۷۶/۹۷ درصد آلوده به آفلاتوکسین کل بوده و رنج میانگین آن‌ها ۰/۶۷ نانوگرم بر گرم بوده که کم‌تر از حداکثر میزان مجاز تعیین شده توسط سازمان تحقیقات و استاندارد صنعتی ایران بوده است. محدوده غلظت آفلاتوکسین کل ۴/۲۷-۰/۱۵ نانوگرم بر گرم است. آلودگی برنج‌ها به آفلاتوکسین در ماه‌های متفاوت شبیه به هم بود. بیش‌ترین سطح آلودگی مربوط به آفلاتوکسین B1 و کل در نمونه‌های برنج وارداتی در ماه سپتامبر و کم ترین سطح در ماه نوامبر تشخیص داده شد(۲۳).

با توجه به موارد فوق و هم‌چنین مخاطرات بهداشتی ناشی از وجود آفلاتوکسین و اکراتوکسین در رژیم غذایی مصرف‌کنندگان، لزوم شناسایی و تعیین انواع و میزان مایکوتوکسین‌ها در غلات به ویژه برنج که از میزان مصرف بسیار بالایی برخوردار است، توجیه می‌گردد. پژوهش فعلی، با هدف تعیین آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در برنج جمع آوری شده از شهرستان‌های یاسوج، گچساران، دنا و باشت از استان کهگیلویه و بویراحمد و شهرستان رامهرمز از استان خوزستان به روش الایزای رقابتی انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری

نحوه نمونه برداری، مقدار نمونه و بسته بندی و نشانه گذاری نمونه‌های آزمایشگاهی جهت تشخیص و تخمین میزان آفلاتوکسین طبق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به شماره ۲۵۸۱ صورت گرفت. به این صورت که به ازای هر ۵۰ تن برنج، یک نمونه مورد نیاز می‌باشد(۲۴). طبق این استاندارد در هر هکتار حدود ۱۰ تن برنج برداشت می‌شود که از میان کل نمونه‌ها، ۱۰ درصد انتخاب شد. این نمونه‌گیری چند مرحله‌ای بود که در مرحله اول طبقه، شهرستان، در مرحله دوم طبقه، بخش و در مرحله سوم طبقه، روستا انتخاب شد (روستاهایی که حجم تولید کم‌تر داشتند، خود بخود حذف شدند). تعداد نمونه‌های هر شهرستان برحسب زمین‌های زیر کشت برنج انتخاب شدند. نمونه‌ها از کیسه‌های برنج موجود در انبار کشاورزان با استفاده از بمبو، از سه قسمت مختلف کیسه (دو طرف کیسه و وسط کیسه) برداشت شدند. این نمونه‌ها روی هم ریخته و پس از مخلوط کردن یک پیمانه (۵۰۰ گرمی) از آن به عنوان نمونه نهایی برداشت شد.

آماده سازی نمونه‌ها و سنجش

آنالیز آفلاتوکسین B1

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی و از جنس پایه‌ای – مقطعی می‌باشد. در این مطالعه از روش الایزا به دلیل داشتن مزایایی هم چون استفاده از مواد بی خطر، حساسیت، آماده سازی و عملیات آسان نمونه‌ها و تشخیص سریع استفاده شد. در این مطالعه از کیت‌های یوروپروکسیما استفاده شده که قابلیت سنجش ۹۶ نمونه با همدیگر را دارد. کیت مورد نظر از شرکت EuroProximaB.V. و ساخت کشور هلند بود. در کیت‌های یوروپروکسیمای استفاده شده جهت این مطالعه، ایمنوگلوبولین موش و خرگوش جایگذاری شده و در صورتی که آفلاتوکسین B1 در نمونه وجود داشت، با ایمنوگلوبولین باند می‌شد و بعد از انکوبه و شستن، نمونه‌هایی که در آن آفلاتوکسین B1 وجود داشت، به علت باند شدن شسته نمی‌شدند و قابلیت شناسایی شدن نداشتند. نمونه‌های که در آن‌ها سم وجود نداشت، شسته شده و در پلیت باقی نمی‌مانند. برای آماده سازی نمونه‌ها، طبق دستور عمل کیت، ۵۰ تا ۱۰۰ گرم از نمونه‌ها را آسیاب نموده و ۳ گرم از نمونه‌های همگن شده و ۹ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد را به آن اضافه و سپس نمونه در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه به طور کامل شیک گردید. عصاره توسط کاغذ واتمن شماره ۴۲ فیلتر شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول صاف شده با ۱۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده، رقیق گردید. به این ترتیب محلولی با متانول ۲۰ درصد تهیه شد. در مرحله‌ی اول، ۱۰۰ و ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد صفر به ترتیب در چاهک H1 و A1 ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین B1 (۰/۰۳۱۳، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ نانوگرم در میلی لیتر) در شش چاهک باقی مانده از ستون اول) از B1 تا (G1 اضافه گردید. ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده به طور جداگانه در چاهک‌های پلیت ریخته شد. ۲۵ میکرولیتر از محلول کونژوگه (HPR–و ۲۵ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی به تمامی چاهک‌ها به جز چاهک H1 افزوده شد. به مدت چند ثانیه، پلیت آماده شده شیک شد و مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس سه مرتبه با بافر شست و شو شستشو داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شدند. در مرحله‌ی بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر چاهک‌ها اضافه شد. پلیت در دستگاه الایزا قرار داده شد و جذب در ۴۵۰ نانومتر در دستگاه خواننده الایزا اندازه‌گیری شد.

آنالیز اکراتوکسین A

میکروپلیت مورد استفاده جهت انجام تست اوکراتوکسین A در دمای دو تا هشت درجه و در پاکت مخصوص نگهداری شدند. نحوه ی آماده‌سازی معرف‌های ذیل طبق دستورالعمل کیت صورت گرفته است. بافر شستشو قبل از استفاده آماده شد. برای آماده‌سازی محلول مورد نیاز، ۳۸ میلی لیتر آب مقطر به ۲ میلی لیتر محلول بافر شست و شو اضافه شد و با این کار ۴۰ میلی لیتر محلول آماده جهت هر کیت وجود داشت. برای استفاده از بافر استخراج کننده باید غلظت آن به یک پنجم کاهش یابد، برای این کار ۵۲ میلی لیترآب مقطر به ۱۳ میلی لیتر از محلول بافر استخراج اضافه شده و بدین ترتیب ۶۵ میلی لیتر محلول رقیق شده‌ی بافر استخراج کننده آماده استفاده، به دست آمد. بافر رقیق کننده موجود در کیت یوروپروکسیما برای تست اکراتوکسین نیز همانند دو محلول قبل نیاز به آماده سازی قبل از استفاده داشت. این محلول نیز با آب مقطر رقیق شده و غلظت آن تا یک چهارم کاسته شد. برای این کار ۶۰ میلی لیتر آب مقطر به ۲۰ میلی لیتر بافر رقیق کننده اضافه شد، ترکیب به دست آمده را در دمای اتاق با سرعت تکان داده و سپس محلول موجود در یخچال و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. طبق

دستورالعمل کیت جهت آماده سازی محلول استاندارد، ۲ میلی لیتر از بافر رقیق کننده به ظرف استاندارد اکراتوکسین A موجود در کیت اضافه نموده و به خوبی مخلوط شد. بدین ترتیب محلول ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر استاندارد اکراتوکسین A تهیه شد. طبق دستورالعمل کیت، با ایجاد یک تناسب ساده در ظروف مختلف محلول های ۵ و ۲ و ۱ و ۰/۵ و ۰/۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر تهیه شده و این محلول در جای تاریک و در دمای ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بعد از جمع آوری نمونه‌ها، ۵۰ گرم از هر نمونه توسط آسیاب پودر و از الک نرم با قطر چشمه ۲ میلی متر گذرانده می‌شد. سپس ۵ گرم از نمونه‌ی برنج همگن شده به لوله پروپیلن تمیز منتقل شد. ۱۰ میلی‌لیتر فسفوریک اسید ۰/۵ مولار به آن اضافه شد. با استفاده از مخلوط کن به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید و سپس ۲۰ میلی لیتر دی کلرومتان نیز افزوده شده و مجدد به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. در این مرحله ترکیب به دست آمده را به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و بعد از سانتریفیوژ در لوله‌ی آزمایش دو لایه‌ی مجزا بر روی هم تشکیل شد. لایه بالایی فسفوریک اسید است، با کمک پیپت این لایه خارج گردید. مابقی ترکیب خوب مخلوط شده و مجددا به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول حاصله با کمک کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردید. در این مر حله، ۱۲ میلی لیتر از محلول صاف شده به یک لوله شیشه‌ای منتقل شده و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تبخیر و خشک گردید (از بن ماری ۵۰ درجه استفاده شد). بعد از ۲۴ ساعت که ترکیب کاملا خشک شد، ۱/۵ میلی لیتر بافر استخراج و به ترکیب اضافه شد و سپس ۲ میلی لیتر ان - هگزان افزوده شد و به مدت یک دقیقه کل ترکیب مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در این مرحله نیز لایه‌ای در بالای ترکیب ایجاد شد ان - هگزان بود و حذف شد. ۵۰ میکرولیتر از لایه زیرین با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده رقیق شد و در نهایت ۵۰ میکرولیتر از این عصاره برای هر چاهک در آزمون مورد استفاده قرار گرفت (۲۵، ۲۶). تمام قرائت‌ها دو بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

نتایج حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از نرم افزار Exel و SPSS۱۸ تجزیه و تحلیل گردید. با کمک آزمون آماری کولموگروف اسمیرنوف، وضعیت توزیع داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون t-Test جهت مقایسه میانگین سم‌ها بین مناطق سردسیری و گرمسیری استفاده گردید. برای مقایسه میانگین سم‌های شهرستان‌های مختلف نیز از آزمون ANOVA استفاده گردید. در ادامه با آزمون پارامتریک پیرسون، ارتباط میان میزان سم آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A با دما و رطوبت و مدت زمان انبار داری سنجیده شد و رگرسیون خطی آن‌ها رسم گردید.

یافته ها

غلظت آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A

نتایج میزان بررسی آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در نمونه‌های برنج جمع آوری شده بر حسب شهرستان در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول شماره ۱: میانگین آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در نمونه‌های جمع آوری شده

شهرستان	تعداد نمونه	غلظت آفلاتوکسین (ng/g)	غلظت اکراتوکسین (ng/g)
یاسوج	۳۱	۳/۶ ± ۲/۹۷	۱/۵۱ ± ۰/۹۶
رامهرمز	۲۶	۸/۶۱ ± ۶/۵۴	۲/۳۷ ± ۰/۶۷
دنا	۱۸	۳/۸۷ ± ۳/۳۶	۲/۲۳ ± ۰/۳۲
گچساران	۶	۳/۳۵ ±۱/۵۵	۱/۶ ± ۰/۷۶
باشت	۴	۴/۴۱ ± ۳/۹۰	۲/۰۴ ± ۲/۰۴
جمع	۸۵	۴/۷۰ ± ۳/۶۶	۲/۰۲ ± ۰/۹۵

نتایج به دست آمده از جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که میانگین میزان آفلاتوکسین B1 در کل نمونه‌ها، ۴/۷۰ نانوگرم بر گرم می‌باشد. بیش‌ترین میزان سم، ۸/۶۱ نانوگرم بر گرم بوده که در برنج‌های شهرستان رامهرمز و کم‌ترین میزان، ۳/۳۵ نانوگرم بر گرم مربوط به شهرستان گچساران بوده است.

میانگین میزان اکراتوکسین A در کل نمونه‌ها، ۲/۰۲ نانوگرم بر گرم می‌باشد. بیش‌ترین میزان سم با ۲/۳۷ نانوگرم بر گرم در برنج‌های شهرستان رامهرمز و کم‌ترین میزان سم با ۱/۵۱ نانوگرم بر گرم مربوط به شهرستان یاسوج بود. حد مجاز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A بر اساس استاندارد ایران، ۵ نانوگرم /گرم بوده است.

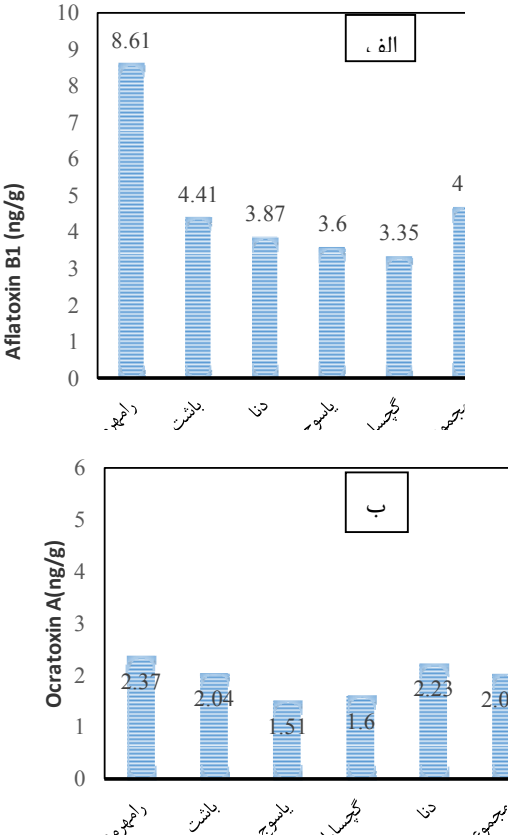
میانگین دو سم موجود در نمونه‌های شهرستان مختلف در جداول شماره ۲ و ۳ و نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۲: میانگین آفلاتوکسین B1 در نمونه های مورد بررسی بر حسب نانوگرم بر گرم

شهرستان	میزان سم آفلاتوکسین B1 بر حسب ng/g			
	میانگین	انحراف معیار	کمینه	بیشینه
یاسوج	۳/۶۰	۲/۹۷	۰/۱۲	۱۲/۶۲
رامهرمز	۸/۶۱	۶/۵۴	۱/۳۸	۲۳/۲۲
دنا	۳/۸۷	۳/۳۶	۰/۵۷	۱۱/۰۳
گچساران	۳/۳۵	۱/۵۵	۱/۳۲	۵/۶۹
باشت	۴/۴۱	۳/۹۰	۰/۲۵	۸/۵۸
کل نمونه ها	۴/۷۰	۴/۹۰	۰/۱۲	۲۳/۲۲

جدول شماره ۳: میانگین اکراتوکسین A در نمونه های مورد بررسی بر حسب نانوگرم بر گرم

شهرستان	میزان سم اکراتوکسین A بر حسب ng/g			
	میانگین	انحراف معیار	کمینه	بیشینه
یاسوج	۱/۵۱	۰/۹۶	۰/۱۰	۲/۷۱
رامهرمز	۲/۳۷	۰/۳۲	۰/۶۷	۲/۹۷
دنا	۲/۲۳	۰/۳۲	۱/۶	۲/۸۱
گچساران	۱/۶۰	۰/۷۴	۰/۴۹	۲/۲۴
باشت	۲/۰۴	۰/۲۱	۱/۸۱	۲/۲۸
کل نمونه‌ها	۱/۹۶	۰/۷۶	۰/۱۰	۲/۹۷



نمودار شماره ۱: الف) مقایسه میانگین آفلاتوکسین B1، ب) مقایسه میانگین اکراتوکسین A در نمونه های شهرستان های مورد مطالعه با حد مجاز استاندارد ایران

طبق نتایج، غلظت آفلاتوکسین B1 در ۸۰/۵۸ درصد کل نمونه‌های شهرستان مختلف، کم‌تر از حد مجاز بود. هم‌چنین در هیچ کدام از شهرستان‌ها، آلودگی بالاتر از ۵ نانوگرم بر گرم به سم اکراتوکسین A مشاهده نشد.

جهت بررسی اختلاف میانگین غلظت میان شهرستان‌های مختلف از آزمون آماری آنالیز واریانس استفاده گردید. نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که اختلاف معناداری از نظر میزان سم آفلاتوکسین B1 بین شهرستان‌های مختلف وجود دارد) p.value = ۰/۰۰۱ , f= ۵/۵ .(این امر در رابطه با سسم اکراتوکسین A نیز مصداق دارد) f= ۷/۲۳, p.value =۰/۰۰۰ .(جهت مقایسه میانگین در بین مناطق گرمسیر و سردسیر از

آزمون تی مستقل استفاده گردید. میانگین سم آفلاتوکسین B1 در مناطق سردسیر، ۳/۷۰ نانوگرم بر گرم و در مناطق گرمسیر، ۷/۲۷ نانوگرم بر گرم بود. این اختلاف با توجه به مقدار p.value≤۰/۰۵ معنادار است.

جدول شماره ٤: تحلیل واریانس (ANOVA) برای مقایسه میانگین سم آفلاتوکسین B1 در شهرستان های مختلف

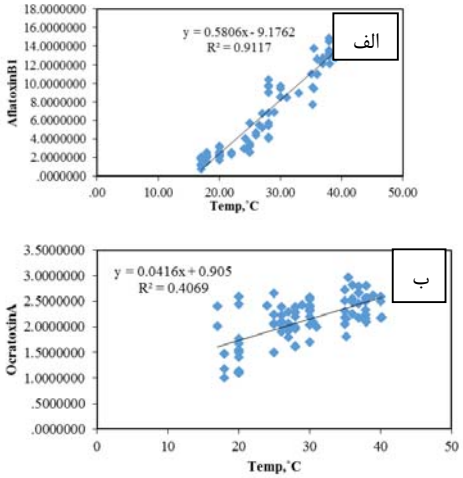
نام شهرستان	میانگین	انحراف معیار	f	سطح معنی داری
یاسوج	۳/۶	۲/۹۷		
دنا	۳/۸۷	۳/۳۶		
باشت	۴/۴۱	۳/۹۰	۵/۵	۰/۰۰۱
گچساران	۳/۳۵	۱/۵۵		
رامهرمز	۸/۶۱	۶/۵۴		

جدول شماره ٥: تحلیل واریانس (ANOVA) برای مقایسه میانگین سم اکراتوکسین A در شهرستان های مختلف

نام شهرستان	میانگین	انحراف معیار	f	سطح معنی داری
یاسوج	۱/۵۱	۰/۹۶		
رامهرمز	۲/۳۷	۰/۳۲		
دنا	۲/۳۳	۰/۳۲	۷/۳۳	۰/۰۰۰
گچساران	۱/۶۰	۰/۷۴		
باشت	۲/۰۴	۰/۲۱		

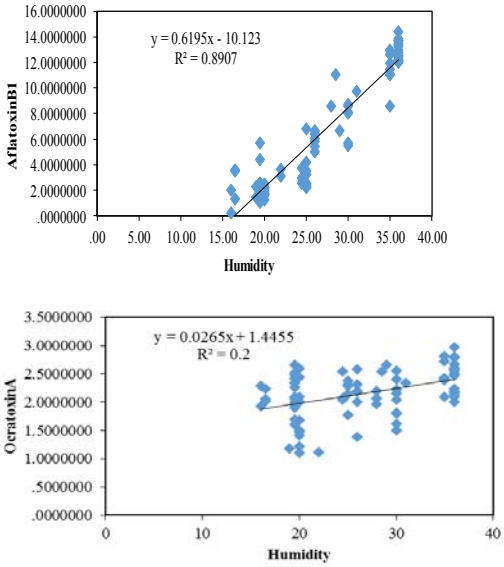
تعیین ارتباط عوامل محیطی با میزان سموم

با توجه به ماهیت نمونه‌ها، آزمون پارامتریک پیرسون و رگرسیون خطی جهت بررسی ارتباط و همبستگی متغیرهای مستقل (دما، رطوبت، زمان نگهداری با پوسته) استفاده شد. بنابر نمودار شماره ۲-الف، بین میزان سم آفلاتوکسین B1 و دما یک رابطه خطی قوی (R2 =۰/۹۱۱۷) و معنادار وجود دارد (۰۴/ p value =۰). بنابر نمودار شماره ۲-ب، بین میزان اکراتوکسین A و دما، ارتباط معناداری مشاهده نشد (R2 = ۰/۰۸).



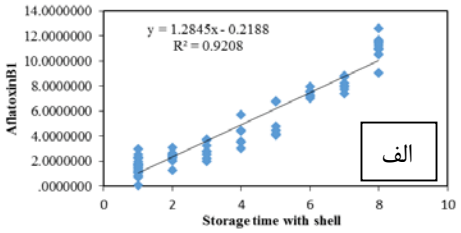
نمودار شماره ۲: همبستگی بین دما و میزان سموم. الف) آفلاتوکسین B1 و ب) اکراتوکسین A

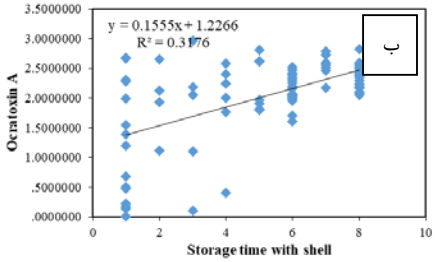
بنابر نمودار شماره ۳-الف، ارتباط بین میزان سم آفلاتوکسین B1 و رطوبت رابطه خطی با R2 =۰/ ۸۹۰۷ معنادار است (p value =۰ /۰۵). هم‌چنین بنابر نمودار شماره ۳-ب، بین میزان اکراتوکسین A و رطوبت ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (R2 =۰/۲و p = ۰/۱۱ value).



نمودار شماره ۳: همبستگی بین رطوبت و میزان سموم الف) آفلاتوکسین B1 و ب) اکراتوکسین A

بنابر نمودار شماره ۴-الف، بین میزان آفلاتوکسین B1 و زمان نگهداری برنج با پوسته ارتباط معنی داری مشاهده شد (R2 = ۰/۹۲۰۸ و p value = ۰/۰۱). هم‌چنین بنابر نمودار شماره ۴-ب، بین اکراتوکسین Aو مدت زمان نگهداری ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (R2 = ۰/۳۱ و p value = ۰/۰۹).





نمودار شماره ٤: همبستگی بین زمان نگهداری برنج با پوسته و میزان سموم. الف) آفلاتوکسین B1 و ب) اکراتوکسین A

جهت بررسی تاثیر همزمان متغیرهای مستقل (دما، رطوبت، زمان نگهداری با پوسته) بر روی متغیر وابسته آفلاتوکسین B1 از آزمون رگرسیون چند متغیره استفاده گردید که تحلیل نتایج آن در جدول شماره ۲ ارائه شده و منجر به استخراج معادل ۱ می‌شود.

جدول شماره ٦: بررسی تاثیر همزمان متغیرهای دما، رطوبت، زمان نگهداری با پوسته بر روی آفلاتوکسین B1

متغیرهای مستقل	سطح معنی داری	t	انحراف معیار	B
ثابت ها	۰/۰۰	-۵/۱۱۷	۱/۹۶	-۱۰/۰۴
دما	۰/۰۴	۲/۹۷۶	۰/۰۸۱	۰/۲۴۲
رطوبت	۰/۰۵	۲/۷۹۱	۰/۰۷۰	۰/۱۹۵
زمان نگهداری با پوسته	۰/۰۲	۴/۰۵۲	۰/۱۹۸	۰/۸۰۳

$$Y=-10/04+0/242T+0/195\ H+0/S \qquad (1)$$

Y=میزان غلظت سم آفلاتوکسین B1

T=میانگین دمای هوا در طول دوره نگهداری

H= میانگین رطوبت نسبی هوا در طول دوره نگهداری

S=مدت زمان نگهداری برنج با پوسته

طبق معادله شماره ۱، بین دما، رطوبت و مدت زمان نگهداری برنج با پوسته و میزان سم آفلاتوکسین B1 به صورت هم‌زمان ارتباط مثبت و معنی‌دار وجود دارد، به طوری که میزان سم آفلاتوکسین B1 به ازای افزایش هر یک درجه سانتی گراد دما، ۰/۲۴ نانوگرم، به ازای افزایش یک درصدی رطوبت نسبی، ۰/۱۹۵ نانوگرم و هم‌چنین به ازای هر یک ماه نگهداری برنج با پوسته، ۰/۸۰۳ نانوگرم افزایش می‌یابد (علت ضعیف بودن ارتباط آفلاتوکسین با رطوبت نسبت به ارتباط آفلاتوکسین با دما ناشی از میانگین خیلی پایین رطوبت در زمان نگهداری با پوسته بوده است).

بحث

بر اساس جدول شماره ۱، میانگین میزان سم آفلاتوکسین B1 در نمونه های مورد بررسی، ۴/۷۰ نانوگرم بر گرم بوده است که در ۸۰/۵۸ درصد نمونه‌ها، کم‌تر از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران و اتحادیه اروپا (۵ نانوگرم بر گرم) بوده است. بررسی‌هایی در خصوص تعیین وضعیت آلودگی برنج به آفلاتوکسین B1 در سرتاسر جهان انجام شده است و نتایج بسیار متغیری را نشان می‌دهد. در این رابطه، مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۱۳) میزان سم در محدوده ۷۵/۲ تا ۹۴/۷ درصد برای آفلاتوکسین‌های تکی و کل را نشان

داد. اندازه‌گیری سم در برنج‌های جمع شده از بازارهای محلی در چین نشان داد که تنها یک نمونه از برنج قرمز KOJIC حاوی ۹/۲ میکروگرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 بود(۲۷). در مطالعه ای که توسط Suárez-Bonnet و همکاران (۲۰۱۳)، برای شناسایی و تعیین کمیت آلودگی آفلاتوکسین B1، B2، G1و G2) بر روی ۶۷ نمونه برنج کشت شده در مکزیک و اسپانیا و برنج‌های وارداتی انجام شد، نتایج نشان داد که متوسط آفلاتوکسین توتال در برنج اسپانیایی ۳۷/۳ میکروگرم بر کیلوگرم بود که محدوده آن‌ها ۱/۶ تا ۳۱۳۸ میکروگرم بر کیلوگرم بود. متوسط آفلاتوکسین توتال در برنج‌های مکزیک، ۱۶/۹ میکروگرم بر کیلوگرم، در برنج وارداتی از فرانسه به اسپانیا ۲۶/۶ میکروگرم بر کیلوگرم، در برنج وارداتی پاکستان، ۱۸/۴ میکروگرم بر کیلوگرم، در محصولات وارداتی از ایالات متحده امریکا، ۱۴/۴ میکروگرم بر کیلوگرم و اروگوئه، ۱۵/۶ میکروگرم بر کیلوگرم بود(۲۸). هم‌چنین بنابر تحلیل‌های آماری، میزان سم آفلاتوکسین B1 در دماهای بالاتر، بیش‌تر است و با افزایش دما، میزان سم افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که میزان آلودگی به آفلاتوکسین B1 در رطوبت بالاتر، بیش‌تر بوده و این اختلاف از نظر آماری معنادار بوده است. نتایج مطالعه‌ای که توسط Afsah و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد نشان داد که نگهداری محصولات کشاورزی در دما و رطوبت نسبی بالا، آلودگی بیش‌تری به مایکوتوکسین‌ها دارند(۲۹). هم‌چنین در مناطق گرمسیری، میزان سم بالاتر از مناطق سردسیری است. در مطالعه‌ای که توسط Pitt و Hocking صورت پذیرفت، مشخص گردید که رشد قارچ ها در دماهای بالاتر، بیش تر اتفاق می‌افتد و میزان مایکوتوکسین‌ها با دما ارتباط مثبت دارد(۳۰). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Bhat R و همکاران صورت پذیرفت، مشخص گردید که رشد قارچ آسپرژیلوس که مولد مایکوتوکسین در دوران نگهداری است، با میزان دما ارتباط مثبت و مستقیم دارد(۳۱). فراجی و همکاران (۱۳۸۹) نیز با مقایسه‌ی نتایج حاصل از اندازه‌گیری آفلاتوکسین در دو فصل نمونه برداری (تابستان/زمستان) تفاوت معنی داری را یافتند. بدین صورت که میانگین میزان آفلاتوکسین در نمونه‌ها، در فصل تابستان بیش‌تر از زمستان است که علت احتمالی آن سرمایی می‌باشد که در زمستان مانع رشد بهینه قارچ شده و از تولید آفلاتوکسین جلوگیری به عمل می‌آورد(۹). مقایسه آلودگی نمونه‌ها به قارچ آسپرژیلوس و سم آفلاتوکسین نشان می‌دهد که در برخی نمونه‌ها با وجود بالا بودن آلودگی قارچی، میزان آفلاتوکسین پایین بوده است، ولی در برخی نمونه‌های دیگر با وجودی که میزان آلودگی قارچی به ظاهر زیاد نبود، اما همان مقدار قارچ، تولید سم کرده است. نکته قابل ذکر این که هر یک از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس در شرایط ویژه‌ای قادر به تولید سم می‌باشند. گاهی با وجود آلودگی قارچی بالا در یک نمونه، فرصت کافی و شرایط مناسب برای تولید توکسین ایجاد نمی‌گردد(۳۲). به عنوان مثال دمای مطلوب و زمان لازم برای تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس فلاووس، ۲۵ درجه سانتی گراد در ۷ تا ۹ روز می‌باشد. در ۳۰ درجه سانتی گراد، زمان لازم ۵ تا ۷ روز و در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، مدت لازم برای تولید سم به ۱۱ تا ۱۳ روز می‌رسد.

علاوه بر درجه حرارت و زمان لازم، عوامل دیگری از قبیل ترکیبات مواد ماده غذایی و رطوبت برای قارچ اهمیت دارد. با pH و فشار اسمزی، توجه به شرایط ذکر شده می‌توان گفت نمونه‌هایی که به ظاهر دارای آلودگی قارچی کم‌تری نسبت به نمونه‌های دیگر بودند، ولی میزان سم اندازه‌گیری شده در آن‌ها بیش‌تر بود، در شرایط مناسب‌تری از لحاظ تولید سم قرار داشتند. از طرفی ممکن است قارچ‌ها در صورت نامطلوب شدن شرایط از بین بروند، اما سم تولید شده توسط آن‌ها هم چنان باقی می‌ماند(۳۳). Almeida و همکاران در سال ۲۰۱۲ وجود هم‌زمان آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1، G2 و اکراتوکسین A

در برنج برزیل را بررسی نمودند. میزان آفلاتوکسین توتال و اکراتوکسین A به ترتیب ۵۸/۷ و ۴۰ درصد بود. در ۵۵ درصد نمونه‌ها، سطح آفلاتوکسین توتال کم‌تر از ۰/۱۱ میکروگرم بر میکروگرم بود. وجود هم‌زمان آفلاتوکسین توتال و اکراتوکسین، ۲۴/۲ درصد بود(۳۴). رحمانی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ به بررسی آفلاتوکسین در برنج‌های جمع آوری شده از استان‌های مختلف ایران پرداختند. سطوح آلودگی برای آفلاتوکسین B1 و آفلاتوکسین توتال به ترتیب از محدوده ۵/۸-۰ نانوگرم بر گرم و ۶/۳-۰/۱ نانوگرم بر گرم بود. آفلاتوکسین B1 تقریبا برای تمام نمونه‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد که ۵۵ نمونه (۲۱/۵ درصد) به بیش از ۲ میکروگرم بر کیلوگرم آفلاتوکسن B1 آلوده بودند، در حالی که ۷ نمونه (۲/۷ درصد) بیش از ۴ میکروگرم بر کیلوگرم به آفلاتوکسین توتال آلوده بودند(۳۵). در مطالعه‌ای توسط Lai و همکاران (۲۰۱۵) بر روی ۳۷۰ نمونه برنج از شش استان چین جهت تعیین آفلاتوکسین و اکراتوسین A انجام شد نتایج نشان داد که ۶۳/۵ درصد و ۴/۹ درصد نمونه‌ها حاوی آفلاتوکسین و اکراتوسین A بودند که ۱/۴ درصد نمونه‌ها آفلاتوکسین و ۰/۳ درصد نمونه‌ها اکراتوسین A بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا داشتند(۳۶). بنا به گزارش Thompson و Henke در سال ۲۰۰۰، تولید آفلاتوکسین در صورت وجود شرایط مناسب، بدون توجه به طول مدت ذخیره و شرایط آب و هوایی انجام می‌گیرد(۳۷).

تولید آفلاتوکسین در تمام مراحل از عمل آوری تا ذخیره وجود دارد(۳۸). در تحقیقی که در چین بر روی اثر شرایط انبارداری بر میزان مایکوتوکسین‌ها صورت گرفته است، نشان داده شده که کاهش و افزایش دما به صورت دوره‌ای در اثر شرایط نامناسب انبارداری و عدم تهویه‌ی مناسب، نقش مهم‌تری در تحریک تولید مایکوتوکسین خواهد داشت(۳۹).

شرایط خوب بسته‌بندی در مورد غلات بسیار مهم است. زیرا عدم تهویه و وجود رطوبت و عدم فرآوری مطلوب می‌تواند از عللی باشد که غلات را به اقسام قارچ‌ها آلوده می‌نماید.

موضوع دیگر نگهداری مواد به صورت خرد شده یا سالم است. زیرا آلودگی قارچی، ابتدا به صورت فراوان در دانه‌های شکسته یا آسیب دیده به وجود می‌آید. انبارداری صحیح و اصولی، حفاظت از محصول در مقابل رطوبت، حشرات و فاکتورهای محیطی، نگهداری محصول روی سطح خشک و تمیز و استفاده از افزودنی‌هایی که رشد کپک‌ها را کاهش دهد، راهکارهایی هستند که باید در مراحل پس از برداشت برنج اجرا شود تا بتوان از سلامت مواد غذایی اطمینان حاصل نمود. جلوگیری از رشد قارچ‌ها در فرایندهای پس از برداشت و شرایط مناسب انبارداری می‌تواند تولید آفلاتوکسین و خطرات آن را کنترل نماید.

پیشنهاداتی نیز می‌توان در زمینه‌ی جلوگیری از آلودگی میکروبی فرآورده‌های غذایی ارائه نمود که از آن جمله رعایت یک چرخه‌ی کنترل بهداشتی دقیق در مراحل تولید، حمل و نقل، نگهداری مواد خام اولیه و محصول و بسته بندی در دمای کم‌تر از ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت کاهش فسادهای قارچی و میکروبی می‌باشد(۴۰).

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم حکیمه پورحسینی به شماره قرارداد ETRC ۹۳۲۷ می‌باشد.

References

1. Zamani GH, AliZadeh MR. Properties and Processing of Iranian Rice Varieties.Tehran, Eyelid publication. 2007 .(Persian)

2. Aghili SR, Shokohi T, Khosravi AR, Salmanian B. Mycoflora contamination of consumed rice in Mazandaran J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 21(86): 280-286 .(Persian)
3. Department of Planning and Economic. Information and Communication Technology Center, Agricultural statistics of field crop cultivation.Tehran, Ministry of Agriculture .2011 (Persian).
4. Khoda Bandeh N. Agriculture: Industrial Plants. Tehran; Sepehr. 2006 (Persian)
5. Riyazi poor M,Vatani H,Tavakoli HR, Mehrabi Tavana A, Afshari M A, Kachue R, etal.Assessment of T-2 toxin in Cereals Served in Centers of Tehran Miltary Earth Force in Winter 2007 .J Mil Med. 2008; 10(1): 35-44. (Persian).
6. Abdel-Wahab M, Kholif A. Mycotoxins in Animal Feeds and Prevention Strategies. Asian J Animal Sci. 2008, 2 (1):7-25.
7. Fink-Grernmels J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. Vet Q. 1999, 21(4):115-120.
8. Reddy KR, Reddy CS, Muralidharan K. Muralidharan, K. Detection of aspergillus spp. and aflatoxin B1 in rice in India. Food Microbiol. 2009; 26(1): 27–31.
9. Faraji H, Tabatabai Yazdi F, Kafilzadeh F, Nasiri MM. Investigation of total aflatoxins in consumed rice at Mashhad city in the summer and winter. J Food Science Technology. 2010; 2(2):11-16 [Persian].
10. Ghariby H, Takdastan A, Neisi A, Kuhpaee H, Rezazadeh H. Investigating Aflatoxin M1 Contamination in Buffalos Milk Using Immunoassay. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017; 26 (145): 248-256 (Persian).
11. Kazemi AH, Mahtadi Niya G ,Mahdavi R, Ghaemaghami J, Akbari N,Salehpour A,etal, Investigation the amount contamination in mycotoxin-produced fungi in consumer rice the province of East Azerbaijan. J Tabriz Univ Med Sci. 2009;30(3):111-118. (Persian).
12. Najafian M. Comparison the level of Aflatoxin in different varieties of internal and imported rice in different collection seasons and effect of cooking methods on the level of toxins. J Microbial World. 2014; 6(4): 328-336. (Persian).
13. Gonza´lez L, Juan C, Soriano MJ, Molto JC, Man˜es J. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. Int J Food Microbiol .2006; 107(2): 223 –227.
14. Bhatnagar D, Brown R, Ehrlich K, Cleveland T, Mycotoxin contaminating cereal grain crops: Their occurence and toxicity. Appl Microbiol Biotechnol .2004; 2 : 171-187.
15. Azadbakht N, Khosravi Nejad K,Tarahi M J. Wasted bread Aflatoxin contamination in Lorestan province. Seasonal Scientific Research J Lorestan Univ Med Sci. 2008;37:3–10.(Persian)
16. Mosayebi M, Mirzaee H, Determination of mycotoxin contamination and heavy metals in edible rice imported to golestan province, Iran. ijhe 2014; 6(4):503-514. (Persian).

17. Arafa A, Bloomer R, Wilson H, Simpson C, Harms R. Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxin. Br Poult Sci. 1981; 22(5):431-436.
18. WHO. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.Lyon. WHO .1993
19. Zuoxin L,Junxia G,YuJ. Aflatoxin in stored maize and rice grains in Liaoning, china. J Stored Prod Res. 2006; 42(4): 468–469.
20. Hadian Z, Yazdanpanah H, Azizi MH, Seyedahmaian F, Kooshki MR, etal .Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran, 2007. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2009; 4(2): 53-59. .(Persian)
21. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Man –trap feed maximum tolerance mycotoxins. ISIRI No. 5925.Tehran, Iran: 2001 (Persian).
22. Rahimi E, Jafarian M, Shakerian A, Kajbafi, M .Contamination rate of ochratoxin A in rice on Isfahan retail market. J Food Hygiene. 2012; 2(5):11-17. (Persian).
23. Mohammadi M, Mohebbi G, Hajeb P, Akbarzadeh S, Shojaee I. Aflatoxins in rice imported to Bushehr, a southern port of Iran. Am.-Eurasian J Toxicol Sci. 2012; 4(1):31-35.
24. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Sampling method of agricultural crops for aflatoxin test. ISIRI No. 2581 .Tehran, Iran. 2008 (Persian).
25. Ranjbar R. A review of different methods used for detection of toxins. J Mil Med. 2008, 1(10):1-10.(Persian)
26. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2009, 8:202-251.
27. Zhu Z, Liu G, Chen Y, Cheng J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. J Food Comp Anal. 2013, 31(2):252-258.
28. Suárez-Bonnet E, Carvajal M, Méndez-Ramírez I, Castillo-Urueta P, Cortés-Eslava J, Gómez-Arroyo S, et al. Aflatoxin (b1, b2, g1, and g2) contamination in rice of Mexico and Spain, from local sources or imported. J Food Scie. 2013; 78(11):T1822-T1829.
29. Afsah-Hejri L, Jinap S, Hajeb P, Radu S, Shakibazadeh S. A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study .Compr Rev Food Sci Food Saf. 2013;12(6):629-651.
30. Pitt JI, Hocking AD. Current mycotoxin issues in Australia and Southeast Asia. Microbiology Australia. 2003;24(3):4-6.
31. Bhat R, Rai RV, Karim A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2010;9(1):57-81.
32. Abou Donia MA. Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian spices and medicinal plants. Global Veterinaria. 2008; 2(4):175-181.
33. Boller RA, Schroeder HW.Influence of temperature on production of aflatoxin

in rice by aspergillus parasiticus. Phytopathology.1973, 64:283-286.

34. Almeida M, Almeida N, Carvalho K, Goncalves G, Silva C, Santos E, et al. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2012; 29(4):694-703.
35. Rahmani A, Soleimany F, Hosseini H, Nateghi L. Survey on the occurrence of aflatoxins in rice from different provinces of Iran .Food Addit Contam Part B Surveill. 2011; 4(3):185-190.
36. Lai X, Liu R, Ruan C, Zhang H, Liu C. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. Food Control. 2015;50:401-404.
37. Thompson C, Henke SE. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. J Wildl Dis 2000;36(1):172-179.
38. Henke SE, Gallardo VC, Martinez B, Bailey R. Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. J Wildl Dis. 2001;37(4):831-835.
39. Liu Z, Gao J, Yu J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. J Stored Products Res. 2006; 42(4):468-479.
40. Pier AC. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. J Animal Scie. 1992; 70(12):3964-3967.
41. Gonzalec E, Felicio JD, Pinto MM, Rossi C,Medina MJ,Simoni IC ,etal. Inhibition of aflatoxin production by Polymnia sonchifolia and its in vitro cytotoxicity. Arq Inst Biol São Paulo. 2003; 70 (2): 139-143.