نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۳/ سال ۱۳۹۳

بررسی پتانسیل توکسین‌زایی جدایه‌های *Aspergillus tubingensis* جدا شده از انگور و کشمش در نواحی جنوبی استان آذربایجان‌شرقی

علی خدایی*[۱]، اسداله بابای اهری[۲]، جواد حصاری[۳]، مهدی ارزنلو[۴] و امیرعباس متین[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۷

[۱] دانشجوی دکترای گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۲] استاد گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۳] دانشیار گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۴] دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۵] استادیار گروه شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
* مسئول مکاتبه: Email:khd_l@yahoo.com

چکیده

پتانسیل توکسین‌زایی جدایه‌های گونه *Aspergillus tubingensis* جداسازی شده از انگور و کشمش در نواحی جنوبی استان آذربایجان‌شرقی با استفاده از سه روش بخار آمونیاک، عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور جدایه‌های قارچی روی محیط‌های کشت Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA) و Coconut Cream Agar (CCA) کشت داده شدند و تولید اوکراتوکسین آ (OTA) ردیابی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که تولید توکسین با استفاده از روش بخار آمونیاک، عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش و HPLC به‌ترتیب در ٦٩٪، ٤١٪ و ٦٥٪ از جدایه‌ها قابل تشخیص بود. میزان هم‌خوانی روش بخار آمونیاک با HPLC، HPLC با عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش، بخار آمونیاک با عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش و سه روش مذکور با هم‌دیگر به‌ترتیب ٥٠٪، ٦٩٪، ٦٢٪ و ٤٢٪ بود. بر اساس نتایج این تحقیق کارآیی عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش در مقایسه با بخار آمونیاک در ردیابی جدایه‌های توکسین‌زای *A. tubingensis* بیش‌تر بود. میزان توکسین تولید شده توسط جدایه‌های قارچی با استفاده از HPLC بین ۲۹ تا ۱۰۸۹ میکروگرم بر کیلوگرم تعیین گردید.

واژگان کلیدی: اکراتوکسین آ، انگور، کشمش، *Aspergillus tubingensis*

مقدمه

اکراتوکسین آ[1] یکی از توکسین‌های قارچی است که به‌طور مکرر به‌عنوان عامل آلودگی در تعداد زیادی از محصولات کشاورزی از جمله انگور و فرآورده‌های آن در سراسر دنیا شناخته شده است (بِلّی و همکاران ۲۰۰٤؛ بائو و همکاران ۲۰۰۵). این توکسین توسط تعدادی از گونه‌های جنس *Aspergillus* و گونه‌ی *Penicillium verrucosum* تولید می‌شود و دارای اثرات سمی و سرطان‌زایی روی کلیه در انسان و جانوران دیگر می‌باشد. اکراتوکسین آ عموماً در غلات و فرآورده‌های آن یافت می‌شود، اگرچه گزارش شده است که در دامنه وسیعی از محصولات دیگر از جمله انگور و فرآورده‌های آن نیز آلودگی به این توکسین دیده شده است (پوهلند و همکاران ۱۹۹۲). خیلی از محققان اثرات ضد سلامتی (اساساً روی کلیه و کبد) و متعاقباً پتانسیل سرطان‌زایی اکراتوکسین آ را تایید کرده‌اند (پرایکا و همکاران ۱۹۹۹). هم‌چنین اکراتوکسین آ با یک بیماری اندمیک کلیه[2] در کشورهای بالکان که در آن‌ها ژامبون خوک مصرف می‌شود، مرتبط بوده است (استوو ۱۹۹۸). روش‌های ردیابی و کمیت‌سنجی اکراتوکسین آ در محصولات کشاورزی عموماً شامل استخراج اکراتوکسین آ با حلال‌های آلی است که به‌دنبال آن با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌ی نازک[3]، میزان اکراتوکسین آ با مقایسه‌ی مستقیم با یک نمونه‌ی استاندارد با استفاده از شدت نور فلورسنت در زیر نور ماورای بنفش برآورد می‌شود (اسکات ۱۹٦٥). به همین جهت روش‌های ردیابی ساده‌تر مخصوصاً روش حلقه‌ی آگاری[4] ابداع شده است (فیلتنبورگ و فرایزود ۱۹۸۰؛ فیلتنبورگ و همکاران ۱۹۸۳).

با توجه به اینکه فرآورده‌های انگور و مخصوصاً کشمش از نظر صادرات برای کشور و منطقه مهم می‌باشند و با توجه به وجود گزارش‌های غیرمکتوب از ردیابی توکسین در کشمش‌های صادراتی این منطقه که مشکلاتی را برای این محصول در بازارهای جهانی بوجود آورده است، لذا تحقیق حاضر با هدف شناسایی جدایه‌های توکسین‌زای گونه‌ی *Aspergillus tubingensis* جدا شده از انگور و کشمش در نواحی جنوبی آذربایجان‌شرقی انجام گردید.

در این پژوهش سه روش متفاوت شامل استفاده از بخار آمونیاک[5]، عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج ۳٦٦ نانومتر و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[6] برای ردیابی جدایه‌های توکسین‌زای *Aspergillus tubingensis* مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد و حلال‌های شیمیایی

مواد مورد استفاده در این پژوهش به‌قرار زیر بوده است:

آمونیاک ۲۵٪ (مرک، آلمان)، متانول (با درجه خلوص HPLC؛ مرک، آلمان)، کاغذ صافی با قطر سوراخ‌های ۱۲۵ میکرومتر (واتمن، انگلستان)، آب‌مقطر (با درجه خلوص HPLC؛ مرک، آلمان)، استونیتریل (با درجه خلوص HPLC؛ مرک، آلمان)، اسید استیک یخی (با درجه خلوص HPLC؛ مرک، آلمان) و استاندارد OTA (مرجعان خاتم، ایران).

جدایه‌های قارچی

جدایه‌های *Aspergillus* مورد استفاده در این آزمایش، در تابستان سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ از روی نمونه‌های محصول انگور جمع‌آوری شده از باغات انگور و نیز کشمش موجود در بازار در منطقه‌ی جنوب آذربایجان‌شرقی شامل شهرستان‌های مراغه، آذرشهر، بناب، عجب‌شیر و ملکان جداسازی شده بود و هویت مولکولی آن‌ها در موسسه‌ی قارچ‌شناسی فرهنگستان علوم کشور هلند تایید شده بود.

[1]- Ochratoxin A (OTA)
2 - Balkan Endemic Nephropathy
[3]- Thin layer chromatography (TLC)
[4]- Agar plug

[5]- Ammonia vapor
6 - High performance liquid chromatography (HPLC)

محیط‌های کشت

در این پژوهش از دو نوع محیط کشت CYA[1] (جدول ۱) و CCA[2] (جدول ۲) استفاده گردید. آماده‌سازی محیط کشت عصاره‌ی نارگیل آگار بدین صورت انجام گرفت که ابتدا مقدار ۶۰۰ میلی‌لیتر آب ولرم در یک بشر دو لیتری ریخته شد و مقدار ۱۰۰ گرم از پودر نارگیل تجاری به آن افزوده گردید و ضمن به‌هم زدن با یک میله شیشه‌ای تا آستانه‌ی جوش حرارت داده شد. بعد از اینکه مخلوط حاصل دو مرتبه از پارچه‌ی ململ دو لایه صاف گردید، حجم عصاره به ۶۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و مقدار نه گرم از پودر آگار به آن اضافه گردید. مخلوط به‌دست آمده در اوتوکلاو استریل شد و در نهایت حدود ده میلی‌لیتر از محیط کشت در زیر هود میکروبیولوژی که قبلاً به‌مدت ۱۵ دقیقه با اشعه‌ی ماورای بنفش سترون شده بود، در ظروف پتری پلاستیکی هشت سانتی‌متری یک‌بار مصرف پخش گردید. محیط‌های آماده شده تا زمان استفاده در دمای اتاق نگه‌داری گردیدند تا اگر آلودگی احتمالی ایجاد شده باشد، خود را نشان دهد.

کشت جدایه‌های قارچی

برای کشت جدایه‌های قارچی با استفاده از یک سوزن سترون مرکز ظروف پتری حاوی هر دو نوع محیط کشت با اسپور جدایه‌های قارچی مایه‌زنی گردید، برای جلوگیری از پخش شدن اسپورها در موقع مایه‌زنی ظروف پتری به‌صورت وارونه نگه‌داشته شدند و عمل مایه‌زنی از زیر صورت گرفت. بعد از مایه‌زنی ظروف آماده شده در درون کیسه نایلونی سربسته قرار داده شدند و سپس به‌مدت سه روز (برای آزمون‌های استفاده از بخار آمونیاک و عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش) و هفت روز (برای آزمون کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا) در دمای ^{o}C ۲±۲۵ نگه‌داری گردیدند.

غربال جدایه‌های توکسین‌زای گونه‌های *Aspergillus*

برای غربال جدایه‌های توکسین‌زا از سه آزمون به‌شرح زیر استفاده گردید:

الف- آزمون استفاده از بخار آمونیاک

در این آزمون از کشت‌های سه روزه‌ی ۱۲۹ جدایه قارچی (۱۲۶ جدایه از گونه *A. tubingensis*، یک جدایه از *A. niger*، یک جدایه از *A. parasiticus* و یک جدایه از *A. welwitschiae*) که در روی محیط کشت عصاره‌ی نارگیل آگار و در دمای ^{o}C ۲±۲۵ نگه‌داری شده بودند، استفاده گردید. در ابتد با دوربین دیجیتال سونی مدل DSC-HX10V از قسمت پشتی همه‌ی ظروف پتری حاوی جدایه‌های مورد آزمایش عکس‌برداری شد، سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آمونیاک ۲۵٪ در زیر هود شیمیایی در قسمت مرکزی درپوش ظروف پتری که به‌صورت وارونه قرار گرفته بودند، اضافه شد و در نهایت ظروف پتری حاوی محیط کشت و ریسه‌ی قارچی روی درپوش محتوی آمونیاک گذاشته شدند، بعد از حدود ۳۰ دقیقه، مجدداً از قسمت پشتی ظروف پتری عکس‌برداری گردید و در نهایت عکس‌های مربوط به هر جدایه در کنار هم قرار داده شدند تا تغییر رنگ محیط در قسمت پشتی ظروف پتری، در محلی که حاوی هیف قارچی بود، مورد مقایسه قرار گیرد. تغییر رنگ از زرد تا قرمز نشان دهنده‌ی تولید توکسین بوده و با افزایش میزان توکسین تولیدی، میزان تغییر رنگ بیشتر بود.

ب- آزمون استفاده از اشعه‌ی ماورای بنفش

برای انجام این آزمون نیز کشت‌های سه روزه‌ی ۱۲۹ جدایه‌ی قارچی (۱۲۶ جدایه از گونه‌ی *A. tubingensis*، یک جدایه از گونه‌ی *A. niger*، یک جدایه از گونه‌ی *A. parasiticus* و یک جدایه از گونه‌ی *A. welwitschiae*) کشت شده در روی محیط کشت عصاره‌ی نارگیل آگار، که در دمای ^{oC} ۲±۲۵ نگه‌داری شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش نیز قبل از عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش، با استفاده از دوربین دیجیتال سونی مدل DSC-HX10V از قسمت پشتی ظروف پتری عکس‌برداری شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل‌داک مدل (VILBER LOURMAT EXC-F20.M, FRANCE) مجدداً عکس‌برداری انجام گرفت و در

[1]- Czapek yeast autolysate agar
[2]- Coconut cream agar

نهایت دو تصویر مربوط به هر جدایه در کنار هم چیده شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

ج- آزمون با دستگاه HPLC

این آزمون برای مقایسه‌ی نتیجه‌ی دو آزمون قبلی انجام گرفت، تا میزان هم‌خوانی دو آزمون فوق در غربال جدایه‌های توکسین‌زا مورد مقایسه قرار گیرد. برای این‌کار جدایه‌های مورد آزمایش در چهار گروه شامل: ۱- جدایه‌هایی که در هر دو آزمون بخار آمونیاک و عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش، واکنش مثبت نشان دادند، ۲- جدایه‌هایی که در هر دو آزمون فوق واکنش منفی نشان دادند، ۳- جدایه‌هایی که در آزمون آمونیاک واکنش مثبت و در آزمون عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش واکنش منفی را نشان دادند، ٤- جدایه‌هایی که در آزمون آمونیاک واکنش توکسین‌زایی منفی و در آزمون عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش واکنش مثبت را نشان دادند، قرار داده شدند. در نهایت از بین گروه‌های فوق به‌صورت تصادفی تعداد ۲۳ جدایه از گونه‌ی *A. tubingensis* به‌همراه سه جدایه از گونه‌های دیگر (یک جدایه از گونه‌ی *A. niger* (با قابلیت تولید OTA)، یک جدایه از گونه‌ی *A. parasiticus* (فاقد قدرت تولید OTA) و یک جدایه از گونه‌ی *A. welwitschiae* (قدرت تولید OTA، نامشخص)) انتخاب و در روی محیط کشت CYA با شرایطی که در بالا ذکر شد، کشت گردید. کشت‌ها بعد از مدت هفت روز برای ارزیابی تولید توکسین با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا مورد استفاده قرار گرفتند.

برای استخراج توکسین از جدایه‌های آسپرژیلوس از روش ارائه شده توسط اسمدگارد (۱۹۹۷) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا با استفاده از یک پیپت مقدار پنج میلی‌لیتر از متانول در درون ویال‌های ده میلی‌لیتری ریخته شد و سپس با استفاده از یک اسکالپل سترون کل پرگنه‌ی قارچی به‌همراه محیط کشت بریده شده و بعد از توزین به درون ویال‌های حاوی متانول انتقال داده شد و بعد از حدود ٦٠ دقیقه با استفاده از کاغذ صافی با قطر سوراخ‌های ۱۲۵ میکرومتری (شماره ۱) عصاره‌گیری گردید، عصاره‌ی حاصل درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و در نهایت ویال‌های آماده شده تا زمان آنالیز با دستگاه HPLC مدل Cecil 1100 در داخل فریزر با دمای ^{oC} ۱۸- نگه‌داری گردیدند.

شرایط دستگاه HPLC مورد استفاده در این آزمایش بدین صورت بود: ستون فاز ساکن Nucelosil C18 (mm ٦/٤×۲۵۰mm با اندازه‌ی ذرات ۵ میکرومتر)، فاز متحرک شامل استونیتریل – آب – اسید استیک (به‌ترتیب به نسبت ۵۰-٤۹-۱)، سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، دتکتور UV سری CE1200 با طول موج ۲۱۵ نانومتر.

برای ترسیم منحنی کالیبراسیون OTA، بعد از روشن کردن سیستم و هواگیری حلال‌ها، اجازه داده شد تا سیستم بدون تزریق نمونه‌ای به مدت ۱۵ دقیقه جهت آماده شدن برای آزمون روشن بماند، بعد از سپری شدن مدت مذکور ابتدا یک تزریق خالی صورت گرفت تا از خالی بودن ستون از هر ماده‌ای اطمینان حاصل گردد، سپس برای تعیین زمان بازداری[1] OTA، چند تزریق با استفاده از استانداردهای ۳۳۳ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر انجام گرفت و مدت زمان لازم برای اتمام آنالیز ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. با توجه به کروماتوگرام‌های به‌دست آمده (شکل ۱) مدت زمان بازداری OTA و مدت زمان لازم برای تزریق‌ها، تعیین گردید و نمونه‌های استاندارد به‌غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۳۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر (به‌مقدار ۲۵ میکرولیتر) تزریق گردیدند و در نهایت سطح زیر پیک هر غلظت (جدول ۳) یادداشت شد و با استفاده از آن منحنی کالیبراسیون OTA (شکل ۲) ترسیم گردید و معادله‌ی لازم برای تعیین غلظت OTA در نمونه‌های مورد آزمایش به‌دست آمد.

برای ردیابی توکسین در نمونه‌های مورد آزمایش، بعد از کالیبره کردن سیستم، ابتدا یک نمونه‌ی خالی، سپس OTA استاندارد به غلظت ۳۳۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر و نمونه‌های مورد نظر و در نهایت استانداردهای به‌غلظت

[1]- Retention time

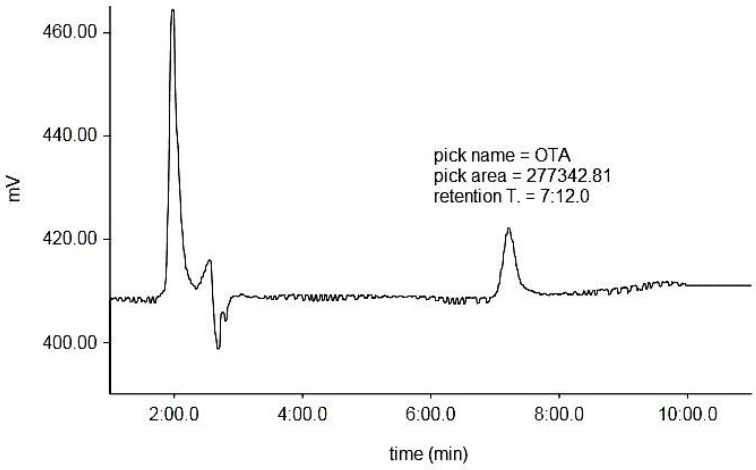
۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تزریق گردیدند.

جدول ۱- نوع و مقدار مواد تشکیل دهنده‌ی محیط کشت CYA

نوع ماده	مقدار لازم	نوع ماده	مقدار لازم
نیترات سدیم	۳ گرم	سولفات آهن با هفت مولکول آب	۰/۰۱ گرم
عصاره‌ی مخمر	۵ گرم	سولفات مس با پنج مولکول آب	۰/۰۰۵ گرم
ساکارز	۳۰ گرم	سولفات روی با هفت مولکول آب	۰/۰۱ گرم
فسفات هیدروژن پتاسیم با سه مولکول آب	۱/۳ گرم	آگار	۱۵ گرم
سلفات منگنز با هفت مولکول آب	۰/۵ گرم	آب مقطر	یک لیتر
کلرید پتاسیم	۰/۵ گرم		

جدول ۲- نوع و مقدار مواد تشکیل دهنده‌ی محیط کشت CCA

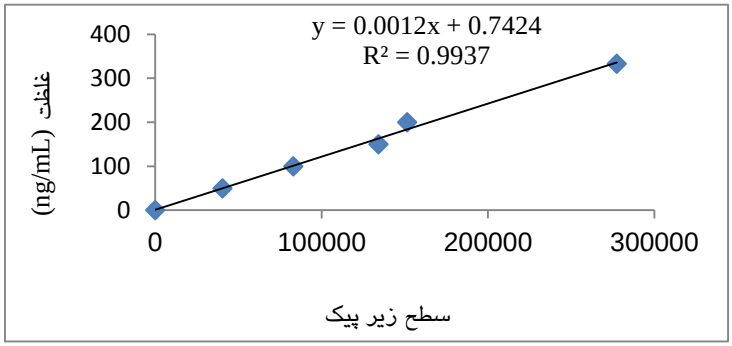
نوع ماده	مقدار لازم	نوع ماده	مقدار لازم
پودر نارگیل تجاری	۱۰۰گرم	آب مقطر	۶۰۰ میلی‌لیتر
آگار	۹ گرم		



شکل ۱- کروماتوگرام به‌دست آمده از تزریق OTA استاندارد به غلظت ۳۳۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر

جدول ۳- سطح زیر پیک اکراتوکسین A برای نمونه‌های استاندارد

غلظت برای نمونه استاندارد (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	سطح زیر پیک
۰	۰
۵۰	۴۰۳۴۰
۱۰۰	۸۲۹۷۰
۱۵۰	۱۳۴۱۵۰
۲۰۰	۱۵۱۳۲۰
۳۳۳	۲۷۷۳۴۳



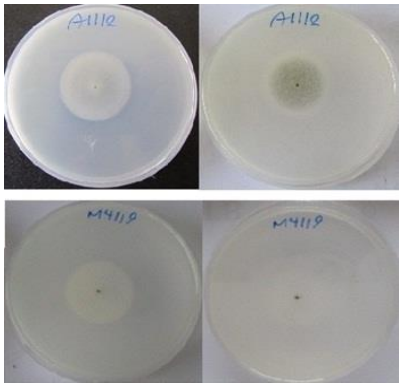
شکل ۲- منحنی کالیبراسیون اکراتوکسین A با استفاده از محلول‌های استاندارد

نتایج و بحث

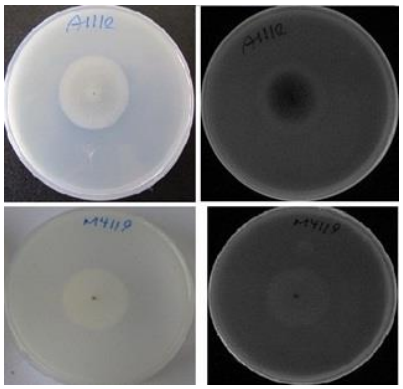
نتایج آزمایش در جدول‌های ٤ تا ٧ نشان داده شده است. بر اساس جدول ٤ در آزمون تغییر رنگ کلنی با بخار آمونیاک (شکل ٣) از مجموع ١٢٩ جدایه‌ی مورد آزمایش، تعداد ٧٦ جدایه (٥٩٪) واکنش منفی داشتند و مطابق این آزمون فاقد توانایی تولید توکسین بودند، در حالی‌که تعداد ٥٣ جدایه (٤١٪) دارای واکنش مثبت بوده و به‌عبارتی توانایی تولید توکسین را داشتند. در آزمون عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش (شکل ٤)، ٤٠ جدایه (٣١٪) واکنش منفی و ٨٩ جدایه (٦٩٪) واکنش مثبت نشان دادند. با مقایسه‌ی این دو آزمون (جدول ٤) مشاهده می‌شود که میزان هم‌خوانی این دو آزمون در غربال جدایه‌ها، ٥٦٪ است به‌طوری‌که تعداد ٣٦ جدایه از مجموع جدایه‌ها، در هر دو آزمون فاقد توانایی تولید توکسین بودند و فقط چهار جدایه (O7222, O9215, R613, R6224) در آزمون عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش فاقد قدرت توکسین‌زایی ولی در آزمون آمونیاک دارای قابلیت توکسین‌زایی بودند. در مقابل تعداد ٤٩ جدایه، در هر دو آزمون دارای توانائی تولید توکسین بودند ولی ٤٠ جدایه‌ی دیگر هرچند در آزمون عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش واکنش مثبت داشتند ولی در آزمون دیگر واکنش منفی از خود نشان دادند. از نگاه دیگر بر اساس این تحقیق این دو آزمون در غربال جدایه‌های توکسین‌زا از غیرتوکسین‌زا، فقط ٦٦٪ (٨٥ جدایه) هم‌خوانی داشته و در ٣٤٪ (٤٤ جدایه) مغایرت نشان دادند.

جدول ۴- مقایسه‌ی واکنش جدایه‌ها به آزمون توکسین‌زایی با آمونیاک و عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش

توکسین‌زایی در آزمون با		تعداد جدایه ها	درصد جدایه ها
اشعه‌ی ماورای بنفش	آمونیاک		
–	–	٣٦	٢٨
–	+	٤	٣
+	–	٤٠	٣١
+	+	٤٩	٣٨
جمع		١٢٩	١٠٠



شکل ۳- جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا با تست آمونیاک: بالا: مثبت، پایین: منفی، چپ: قبل از افزودن آمونیاک، راست: بعد از افزودن آمونیاک



شکل ۴- جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا با آزمون عکس‌برداری با اشعه‌ی ماوری بنفش: بالا: مثبت، پایین: منفی، چپ: عکس‌برداری با نور معمولی، راست: عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش

مطابق جدول ۵ در روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، اکراتوکسین آ در ۱۷ جدایه از ۲۶ جدایه‌ی مورد آزمایش ردیابی گردید ولی در نه جدایه که یکی از آن‌ها متعلق به گونه‌ی *A. parasiticus* بود، اثری از اکراتوکسین آ مشاهده نشد. لازم به یادآوری است که دو جدایه‌ی دیگر از ۱۷ جدایه‌ی فوق به گونه‌های *A. welwitschiae* و *A. niger* تعلق داشتند. هم‌چنین بر اساس همین جدول تعداد جدایه‌های با و بدون قابلیت توکسین‌زایی در روش بخار آمونیاک مساوی بودند در حالی‌که در روش عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش، ۱۹ جدایه توکسین تولید نمودند ولی در هفت جدایه‌ی دیگر توکسین ردیابی نشد. با مروری بر جدول ٦ می‌توان دریافت که میزان تطابق روش‌های بخار آمونیاک با کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا با عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش، عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش با بخار آمونیاک و هر سه روش به‌صورت توام به ترتیب ۵۰٪، ٦۹٪، ٦۲٪ و ٤۲٪ بوده است. با توجه به نتایج بالا می‌توان گفت که میزان هم‌خوانی دو روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش نسبت به روش بخار آمونیاک بیش‌تر می‌باشد. به‌همین سبب نیز میچی‌هیکو و مچیدا (۱۹۹۹) روش عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش را برای غربال جدایه‌های تولید کننده آفلاتوکسین در گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* مفید دانسته‌اند. ضمن این‌که روش عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش، در مقام مقایسه با روش کروماتوگرافی مایع با

کارآیی بالا بسیار ساده‌تر، سریع‌تر و مقرون به صرفه‌تر نیز می باشد.

جدول ۵- مقایسه‌ی قابلیت توکسین‌زایی جدایه‌ها با هر سه روش مورد آزمایش.

واکنش	نوع آزمون		
	کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا	آمونیاک	عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش
+	۱۷	۱۳	۱۹
-	۹	۱۳	۷

جدول ۶- مقایسه‌ی میزان هم‌خوانی روش‌های مورد آزمایش در ردیابی OTA.

هم‌خوانی یا ناهم‌خوانی	مقایسه‌ی روش‌های مورد مقایسه			
	HPLC, ammonia	HPLC, UV	UV, ammonia	HPLC, UV, ammonia
هم‌خوانی	۱۳	۱۸	۱۶	۱۱
درصد هم‌خوانی	۵۰	۶۹	۶۲	٤۲
ناهم‌خوانی	۱۳	۸	۱۰	۱۵
درصد ناهم‌خوانی	۵۰	۳۱	۳۸	۵۸

براساس جدول ۷ مقدار توکسین ردیابی شده در ارزیابی با روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا از ۲۹ میکرولیتر بر کیلوگرم در جدایه‌ی R6221 تا ۱۰۸۹ میکرولیتر بر کیلوگرم در جدایه‌ی A2215 (متعلق به گونه‌ی *A. awamori*)، متغیر بود و میانگین توکسین ردیابی شده ۳۲۱ میکرولیتر بر کیلوگرم برآورد گردید که بالاتر از که حد نهایی مورد قبول کمیسیون اروپا (5ng/ml) در آب میوه می‌باشد. البته بایستی در نظر داشت که غلظت بالای توکسین در این آزمایش ممکن است ناشی از شرایط آزمایشی از قبیل دما باشد و لازم است تا در کارهای بعدی قابلیت توکسین‌زایی در روی محصولات کشاورزی نیز مورد بررسی قرار گیرند، چرا که تفاوت در محتوای OTA در آب انگور، در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است و بیان شده است که ممکن است ناشی از به‌کارگیری روش‌های مختلف نمونه‌برداری، اثرات فصلی و یا روش‌های آزمایشگاهی به‌کار گرفته شده در مطالعات مختلف باشد. تفاوت در سطوح OTA، احتمالاً به‌دلیل تفاوت در شرایط آب‌وهوایی نواحی نمونه‌برداری شده باشد، اما در سال‌های متفاوت، نیز تفاوت در سطوح OTA توسط پیه‌تری و همکاران (۲۰۰۱)، لوپز دسراین و همکاران (۲۰۰۲) و باتیلانی و همکاران (۲۰۰٦) گزارش شده است. امروزه استفاده از پروفیل متابولیت‌های ثانوی قارچ‌ها، بخش مهمی از رده‌بندی و شناسایی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهد (پیت و سامسون ۱۹۹۰). در بعضی از حالات برای دست‌یابی به پروفیل کاملی از متابولیت‌های ثانوی، استفاده از فرایندهای عصاره‌گیری اختصاصی ضرورت می‌یابد. در چنین حالاتی یک روش غربال سریع و آسان لازم و ضروری است. با این‌که روش‌های متنوعی مثل استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا برای تعیین متابولیت‌های ویژه توصیف شده‌اند، فقط تعداد اندکی از آن‌ها برای غربال عمومی کشت‌ها مناسب هستند (فرایزود و تران ۱۹۹۳).

جدول ۷- اطلاعات مربوط به غلظت OTA در جدایه‌های مورد آزمایش با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و مقایسه‌ی این روش با دو روش دیگر

جدایه	غلظت (μkg^{-1})	HPLC	ammonia	UV	جدایه	غلظت (μkg^{-1})	HPLC	ammonia	UV
745 (niger)	۱۰۰	+	+	+	K1111	۱۸۱	+	+	+
A2215 (welwitschiae)	۱۰۸۹	+	+	+	M4114	ND	−	-	+
NR14 (parasiticus)	ND*	-	-	-	N112	ND	-	+	-
A2211	ND	-	+	+	O3119	۸۸٤	+	-	+
A3117	ND	-	-	+	O9213	۳۸۳	+	-	+
A4119	۲۳٥	+	-	+	O9214	ND	-	-	-
B1119	ND	-	+	+	O9223	۱٤۲	+	-	+
B3112	۷۹	+	-	+	R6221	۲۹	+	-	-
B3115	ND	-	-	-	R6224	۳۰۷	+	+	-
B3116	۲٥٦	+	+	+	R711	ND	-	+	+
B3117	۱٥۲	+	+	+	S113	٦۰	+	+	+
C211	۲۷٤	+	+	+	S213	٤۹۱	+	-	+
C213	۳۰۰	+	+	-	Y1142	٤۹۲	+	+	+

*– غیر قابل تشخیص

یک روش استاندارد عمومی برای ردیابی مایکوتوکسین‌ها و سایر متابولیت‌ها در محیط‌های کشت قارچی قبلاً توسط فرایزود و تران (۱۹۸۷) ارائه شده بود. اما روش آن‌ها دشوار بوده و از مقدار زیادی از حلال‌های آلی در آن استفاده می‌گردید و در اغلب مطالعات فقط تعداد محدودی از نمونه‌ها بررسی می‌گردیدند. روش جایگزین برای روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالای استاندارد، روش حلقه‌ی آگاری (فرایزود و همکاران ۱۹۸۹) می‌باشد که یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای تعیین مستقیم پروفیل متابولیت‌های ثانوی در محیط‌های کشت قارچی است. اگرچه در این روش دامنه‌ی خیلی وسیعی از متابولیت‌های ثانوی قارچ‌ها با استفاده از سیستم‌های حلال بهینه‌سازی شده و معرف‌های اختصاصی، به‌صورت نقاط رنگی مشخص می‌گردند ولی فاقد حساسیت و اختصاصیت لازم در مقایسه با روش‌های بر پایه‌ی کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا می‌باشد. با این‌حال این روش سریع بوده و به‌طور گسترده‌ای برای رده‌بندی قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (سامسون و همکاران ۱۹۹۵؛ میلز و همکاران ۱۹۹۵).

چندین روش ردیابی توکسین‌های قارچی روی مواد غذایی و محیط کشت برای غربال جدایه‌های توکسین‌زا وجود دارد (وارگا و همکاران ۲۰۰۱). عمده‌ترین روش‌هایی که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند، عبارتند از: کروماتوگرافی لایه‌ی نازک، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و سنجش جذب ایمنی متصل به آنزیم[1]. برای کمیت‌سنجی اکراتوسین آ در انگور، غالباً خالص‌سازی نمونه‌ها با استفاده از ستون‌های ایمونوآفینیتی[2] و به‌دنبال آن کمی‌سنجی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا به‌کار گرفته شده است (بِلّی و همکاران ۲۰۰۲). برای غربال سریع جدایه‌های قارچی، تولید اکراتوکسین آ می‌تواند به‌صورت in situ

1- Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA)
2- immunoaffinity Column (IAC)

روی محیط کشت CCA و با مشاهده‌ی نور فلورسنت آبی طبیعی ناشی از تولید توکسین در زیر طول موج پایین نور فرابنفش، ردیابی شود (هینان و همکاران ۱۹۸۸). در روش دیگری برای غربال جدایه‌های توکسین‌زا، جدایه‌ی قارچی در روی محیط کشت رشد داده شده، اکراتوکسین آ با استفاده از یک حلال آلی، از قطعات آگار عصاره‌گیری شده و بعد از صاف کردن مستقیماً به درون HPLC تزریق می‌گردد تا کمیت‌سنجی شود (براگولات و همکاران ۲۰۰۱). امروزه علاقه به استفاده از روش‌های ایمونولوژیک مانند استفاده از کیت‌های الایزا به‌دلیل نیاز به حجم کم نمونه و ساده‌تر بودن روش تلخیص نمونه نسبت به روش‌های کروماتوگرافی لایه‌ی نازک و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا افزایش یافته است (تراکسس ۲۰۰۱). اخیراً بر پایه سنجش ایمنی اکراتوکسین آ، یک روش شیب افقی جهت ردیابی توکسین عصاره‌گیری شده از قطعات آگار توسعه داده شده است (دانکز و همکاران ۲۰۰۳).

فرآیندهای تغلیظ و تصفیه ظاهراً موقعی الزامی می‌گردند که محدوده‌ی ردیابی پایینی مورد نیاز باشد (فستاس و همکاران ۲۰۰۰). روش‌های کلاسیک عبارت بودند از بخش‌بندی مایع مایع و استخراج فاز جامد[1]، ولی در مواردی تاثیر تصفیه برای ماتریکس‌های پیچیده کافی نبود. استفاده از ستون‌های ایمونوآفینیتی در مرحله‌ی تصفیه که مخصوصاً در مورد OTA مطالعه شده است، روش تصفیه را ساده‌تر نموده است. عمده‌ترین امتیاز این ستون‌ها این است که در آن‌ها OTA به‌طور اختصاصی به آنتی‌بادی‌ها متصل شده و دخالت ماتریکس تقریباً به‌طور کامل حذف می‌گردد. علاوه بر این ستون‌های ایمونوآفینیتی از نظر دقت و قابل قبول بودن در دامنه‌ی وسیعی از غلظت‌ها، کارآیی بهینه‌ای داشته و به‌طور قابل ملاحظه‌ای استفاده از حلال‌های خطرناک را کاهش می‌دهند. زیمرلی و دیک (۱۹۹۵، ۱۹۹۶) پیشنهاد کردند که استخراج OTA از فرآورده‌های الکلی اسیدی با کلروفرم انجام گرفته و سپس برای خالص‌سازی بعدی، بقایا در ستون ایمونوآفینیتی وارد گردند. سایر محققان همانند پیه‌تری و همکاران (۲۰۰۱)، بورداسپال و لگاردا (۱۹۹۹) و یا مارکاکی و همکاران (۲۰۰۱) عموماً از روش پیشنهادی این محققان با کمی تغییرات استفاده نمودند. بایستی تاکید گردد که عصاره‌گیری با کلروفرم بعد از اسیدی کردن در خیلی از موارد بنیادی است زیرا OTA به پروتئین متصل شده و بعضی از نمونه‌های غذایی نمی‌توانند مستقیماً در یک ستون ایمونوآفینیتی (والنتا ۱۹۹۸) به‌کار گرفته شوند. اما تمایلی برای به‌حداقل رساندن مقادیر حلال‌های هالوژنی و سمی به‌دلایل بهداشتی و زیست‌محیطی وجود دارد. علاوه بر این یک فرآیند تصفیه‌ی مناسب با مهیا کردن شرایط به‌کارگیری مستقیم نمونه در ستون‌های ایمونوآفینیتی می‌تواند زمان آنالیز را کاهش داده و امکان اتومات کردن را فراهم نماید.

دیوید و همکاران (۲۰۱۲) در شناسایی گونه‌های توکسین‌زای آسپرژیلوس‌ها در روی میوه‌ی انگور با استفاده از یک فرایند PCR-RFLP نشان دادند که ٦٣ نمونه (۱۷/۷٪) از ٣٥٦ نمونه‌ی آنالیز شده بین ۰/۰۵ تا ۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، OTA تولید نمودند. ایشان گزارش نمودند که سطح آلودگی فرآورده‌های الکلی تولید شده از انگورهای مورد آزمایش در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰٦، عموماً پایین‌تر بود اما در سال ۲۰۰۷ (۰/۱۵ میکرولیتر بر لیتر) نسبت به سال ۲۰۰٦ (۰/۰۹ میکرولیتر بر لیتر) بالاتر بوده است. نکته‌ی جالب این‌که در گونه‌های آزمایشی آن‌ها هیچ‌کدام از جدایه‌های گونه‌ی *A. niger* قدرت توکسین‌زایی نداشته ولی از گونه‌ی *A. tubingensis*، شش جدایه (۲۱/٤٪ جدایه‌ها) در سال ۲۰۰٦ و پنج جدایه (۱۱/٤٪ جدایه‌ها) در سال ۲۰۰۷ قادر بودند تا در شرایط آزمایشگاهی مقادیر پایینی از OTA را تولید نمایند. نتایج مشابهی را مدینا و همکاران (۲۰۰۵) و مارتینز کولبراس و رامون (۲۰۰۷) به‌دست آوردند. نتایج آزمایش حاضر نیز تولید توکسین در جدایه‌های گونه‌ی *A. tubingensis* را در شرایط آزمایشگاهی و با

1 - Solid phase extraction (SPE)

روش‌های به‌کار گرفته شده در این آزمایش، تایید می‌نماید (۵۳ جدایه از مجموع ۱۲۹ جدایه)، ولی آسنسی و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که جدایه‌های تولید کننده OTA متعلق به گونه‌ی *A. niger* بوده و هیچ‌کدام از جدایه‌های گونه‌ی *A. tubingensis* قادر به تولید OTA نبودند. تناقض در نتایج ممکن است در نتیجه‌ی متفاوت بودن ناحیه‌ی جغرافیایی منشاء جدایه‌های تهیه شده توسط محققان مختلف باشد. شرایط آزمایشی (محیط‌کشت، pH، زمان نگه‌داری و یا دما) مورد استفاده برای استخراج و ردیابی OTA، نیز ممکن است دلیل این تفاوت‌ها باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تامین بودجه‌ی لازم برای انجام این پژوهش و مهندس محمد مددی رئیس وقت اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی شهرستان مراغه به خاطر همکاری‌های صمیمانه‌شان ابراز می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

Accensi F, Abarca ML, Cano J, Figuera L and Cabañes FJ, 2001. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. Antonie Leeuwenhoek 79: 365 - 370.

Battilani P, Magan N and Logrieco A, 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. International Journal of Food Microbiology 111: S2- S4.

Bau M, Bragulat MR, Abarca ML, Minguez S and Cabañes FJ, 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. International Journal of Food Microbiology 98: 125- 130.

Bellí N, Pardo E, Marín S, Farré G, Ramos AJ and Sanchis V, 2004. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 541- 546.

Bellí N, Marín S, Sanchis V and Romas AJ, 2002. Ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: Occurrence, regulation and methods for analysis. Food Science and Technology International 8: 325- 335.

Bragulat MR, Abarca ML and Cabañes FJ, 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. International Journal of Food Microbiology 71: 139- 144

Burdaspal PA and Legarda TM, 1999. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. Alimentaria 36: 107- 114.

Davide S, Patharajan S, Lorè A, Garibaldi A and Gullino M, 2012. Ochratoxigenic Black Species of Aspergilli in Grape Fruits of Northern Italy Identified by an Improved PCR-RFLP Procedure. Toxins 4: 42- 54

Danks C, Ostoja-Starzewska S, Flint J and Banks JN, 2003. The development of a lateral flow device for discrimination of OTA production and non-production fungi. Aspects of Applied Biology 68: 21- 28.

Festas I, Herbert P, Santos L, Cabral M, Barros P and Alves A, 2000. Ochratoxin A in some Portuguese wines: Method validation and screening in Port wine and Vinho verde. American Journal of Enology and Viticulture 51: 150- 154.

Filtenborg O and Frisvad JC, 1980. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure cultures. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 13: 128- 130.

Filtenborg O, Frisvad JC and Svendsen GA, 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Applied and Environmental Microbiology 45(2): 581- 585.

Frisvad JC, Filtenborg O and Thrane U, 1989. Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 18(3): 331- 335

Frisvad JC and Thrane U, 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). Journal of Chromatography A 404(1):195- 214.

Frisvad JC and Thrane U, 1993. Liquid column chromatography of mycotoxins. Pp. 253- 355. In: Betina V (ed). Chromatography of mycotoxins: techniques and applications. Amsterdam: Elsevier.

Heenan CN, Shaw KJ and Pitt JI, 1988. Ocratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* and detection using coconut cream agar. Journal of Food Mycology 1: 67- 72.

Lopez De Cerain A, Gonzáles-Peòas E, Jimenez AM and Bello J, 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. Food Additives and Contaminants 19: 105- 1064.

Markaki P, Delpont-Binet C, Grosso F and Dragacci S, 2001. Determination of Ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. Journal of Food Protection 64: 533-537.

Martínez-Culebras PV and Ramón D, 2007. An ITS-RFLP method to identify black Aspergillus isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. International Journal of Food Microbiology 13: 147- 153.

Medina A, Mateo R, López-Ocaña L, Valle-Algarra FM and Jimenez M, 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. Applied and Environmental Microbiology 71: 4696- 4702.

Michihiko S and Machida S, 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience 40: 205-208.

Mills JT, Frisvad JC, Seifert KA and Abramson D, 1995. Identification of Nephrotoxic *Penicillium* Species from Cereal Grains. Mycotoxin Research 11: 25-35.

Peraica M, Radic B, Lucic A and Pavlovic M, 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organization 77: 754-766.

Pitt JR and Samson R A, 1990. Approaches to *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Studies in Mycology 32: 77- 90.

Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L and Piva G, 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. Food Additives and Contaminants 18: 647- 654.

Pohland AE, Nesheim S and Friedman L, 1992. Ochratoxin A: A review. Pure and Applied Chemistry 64: 1029- 1046.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC and Filtenborg O, 1995. Introduction to food-borne fungi. 4th Edn. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Netherlands.

Scott de B, 1965. Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. Mycopathologia et Mycologia Applcata 14: 213- 222.

Smedgaard J, 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. Journal of Chromatography A 760: 264- 270.

Stoev SD, 1998. The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan Endemic Nephropathy and its risk evaluation. Veterinary and Human Toxicology 40: 352–360.

Trucksess MW, 2001. Rapid analysis (thin layer chromatography and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. Pp. 29- 40. In: de Koe WJ, Samson RA, Van Egmond HP, Gilbert J and Sabino M (eds). Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. The Netherlands, Wageningen

Valenta H, 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. Journal of Chromatography A 815: 75- 92.

Varga J, Rigó k, Téren J and Mesterházy A, 2001. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxin. Cereal Research Communications 29: 85- 92.

Zimmerli B and Dick R, 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up: Methodology and Swiss data. Journal of Chromatography B 666: 85- 99.

Zimmerli B and Dick R, 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants 13: 655- 668.

Evaluation of toxicogenic potential of *Aspergillus tubingensis* isolates from grape and raisin in southern regions of East Azarbaijan province

A Khodaei[1*], A Babai Ahari[2], J Hesari[3], M Arzanlou[4] and A A Matin[5]

Received: November 26, 2013 Accepted: May 17, 2014

[1]PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture University of Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[3]Associate professor, Department of Food Industries, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[4]Associate professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[5]Assistant professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Shahid Madani, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: E mail:khd_l@yahoo.com

Abstract

Toxicogenic potential of *Aspergillus tubingensis* isolates occurring on grape and raisin in southern regions of East Azerbaijan province were evaluated using of ammonia vapor, UV photography and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. For this purpose, fungal isolates were grown on Capek Yeast Autolysate Agar (CYA) and Coconut Cream Agar (CCA) media and Ochratoxin A (OTA) production was evaluated. The results of this study showed that toxin production was detectable on 69%, 41% and 65% of the isolates using ammonia vapor, UV photography and HPLC methods, respectively. The compatibility of ammonia vapor vs. HPLC, HPLC vs. UV, ammonia vapor vs. UV and three mentioned methods was 50%, 69%, 62% and 42%, respectively. According to the results of this study, UV photography method appeared to be more efficient for detection of toxigenic isolates of *A. tubingensis* in comparison to ammonia vapor. The amount of OTA produced by isolates was determined 29-1089 µg/kg using HPLC.

Keywords: *Aspergillus tubingensis*, Grape, Ochratoxin A, Raisin