تاثیر فیلم های بسته بندی حاوی نانو نقره بر رشد آفلاتوکسین پسته (رقم اکبری)

فائزه عابدینی[۱]، محمدحسین عباسپورفرد[۲*]، محمودرضا گلزاریان[۳]، پریسا طاهری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هئیت علمی گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هئیت علمی گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- عضو هیئت علمی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

* ایمیل نویسنده مسئول:abaspour@um.ac.ir

چکیده

پسته یکی از دانه‌های خوراکی می‌باشد و ایران یکی از بزرگترین تولید کننده‌های آن است. آلودگی پسته به آفلاتوکسین یکی از بزرگترین مشکلات تولید کننده‌ها می‌باشد. آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی قارچی هستند که توسط برخی از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی مواد غذایی انسان و دام تولید می‌شوند. بدلیل خواص جهش زا و سرطان زایی، مقابله با تولید آفلاتوکسین و یا حذف آن‌ها از مواد غذایی، توجه محققین را به خود جلب کرده است. تحقیقات گسترده‌ای در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره اثرات ضدمیکروبی مناسبی در برابر طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها و ویروس‌ها داشته است. در این تحقیق برای تولید نانو کامپوزیت‌های نقره با درصد وزنی ۱، ۳ و ۵، از نانو ذرات نقره و آب دیونیزه و گلیسیرول استفاده شده است و پس از ساخت فیلم، آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد. تصاویر حاصل از این آزمون‌ها نشان دهنده پخش یکنواخت نانوذرات نقره بر سطح فیلم می‌باشد. همچنین پس از کشت قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آلوده نمودن پسته به این قارچ و بسته بندی آن، پس از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که میزان سم آفلاتوکسین در بسته بندی حاوی ۱ درصد وزنی نانونقره به ۶/۹۴ ppb ، ۳ درصد وزنی به ۳/۷۶ ppb و در بسته بندی حاوی ۵ درصد وزنی نانو نقره به ۲/۹۴ ppb کاهش پیدا کرده است.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین، پسته، نانو ذرات نقره

مقدمه

پسته دانه خوراکی درخت پسته[۱] می باشد که در مناطق مختلف جهان توسط کشورهای گوناگون تولید شده و در این بین ایران یکی از بزرگترین تولیدکننده های پسته می باشد (ژنگ، ۲۰۱۱؛ لیو همکاران، ۲۰۱۱؛ مندس و

[1] Pistachio Vera L.

همکاران، ۲۰۱۲). پسته نیمه گرمسیری از خانواده آناکاردیاسه و جنس پتاسیا است که در سال ۱۷۳۷ میلادی توسط لینه نامگذاری شد. درخت پسته مقاوم به کم آبی و خشکی بوده و علاوه بر این پس از خرما، مقاوم ترین درخت در برابر شوری می باشد (ابریشمی، ۱۳۷۳). ایران در بین کشورهای تولیدکننده ی پسته، به عنوان بزرگترین و مهمترین کشور تولید کننده و صادر کننده به شمار می رود.

یکی از مشکلات موجود در حوزه ی محصولات کشاورزی، آلودگی آن ها با مایکوتوکسین ها و به ویژه آفلاتوکسین است که امروزه تولید کننده ها با آن مواجه هستند (دینی و همکاران، ۲۰۱۳). آفلاتوکسین متابولیت های ثانویه پلی کتاید است که توسط برخی از گونه های قارچ آسپرژیلوس پاراژیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس تولید می شود (چراغی و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش شده است که پسته در میان محصولات مختلف با بالاترین خطر آلودگی به آفلاتوکسین مواجه است (پیتت، ۱۹۹۸).

روش های مختلفی نظیر شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی با هدف کاهش سم آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفته اند. از معایب روش های ذکر شده می توان به گران بودن تجهیزات، تاثیرگذاری کم، کاهش کیفیت محصول و ایجاد اثرات نامطلوبی بر سلامتی انسان اشاره کرد (رهایی و همکاران، ۲۰۱۰). تحقیقات گسترده در سال های اخیر نشان می دهند که نانو ذرات نقره اثرات ضدمیکروبی مناسبی در برابر طیف گسترده ای از باکتری ها، قارچ ها، جلبک ها و ویروس ها دارند (مندس و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین این امکان وجود دارد تا با اضافه نمودن مواد ضدمیکروبی نظیر نقره در بسته بندی مواد غذایی ضمن اطمینان از بی خطر بودن برای سلامتی انسان، باعث بهبود ماندگاری و حفظ کیفیت مواد غذایی با ایجاد تاخیر و به حداقل رساندن رشد میکروارگانیسم ها شد (برودی و همکاران، ۲۰۰۸).

ذرات نقره با سازوکارهایی نظیر دخالت در فعالیت حیاتی سلول از طریق اتصال دی سولفیدی در سطح پروتئین های غشا و سایر آنزیم ها، پایان دادن به همانند سازی DNA و غیرفعال سازی استرس اکسیداتیو و تولید گونه های هوازی می تواند اثر کشندگی و ضدمیکروبی داشته باشد (دانکن، ۲۰۱۱).

بنابراین در این تحقیق به بررسی تاثیر نانو ذرات نقره در بسته بندی پسته به منظور کنترل سم آفلاتوکسین پرداخته شده است. مشکلی که همواره تهدید جدی در امر صادرات این محصول حیاتی به کشورهای دیگر بوده است.

مواد و روش ها

مواد

جهت انجام این پژوهش، نانو ذرات نقره از شرکت نانو ماد تحت نظر ستاد نانو، پلی وینیل الکل از شرکت آلدریچ آلمان، گلیسرول از شرکت مرک آلمان و آب یون زدایی شده برای ساخت نانو کامپوزیت مورد استفاده قرار گرفت، همچنین پسته رقم اکبری (رقم متداول و تجاری در کشور) از جهاد کشاورزی مشهد، اسپور قارچ آسپرژِلوس فلاووس از گروه گیاهپزشکی دانشگاه فروسی مشهد، محیط کشت PDA از شرکت آروین بهروش دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید.

ساخت نانو کامپوزیت نقره

برای تهیه محلول پلی وینیل الکل، گلیسیرول با درصد وزنی ۱/۳۳ به آب یون زدایی شده اضافه گشته و با همزن مغناطیسی مخلوط شدند، سپس پلی وینیل الکل با درصد وزنی ۵ به محلول اولیه اضافه شد. برای حل شدن کامل پلی وینیل الکل، مواد به مدت ۳ ساعت در محدوده دمایی بین ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس مخلوط شدند. پودر نانو ذرات نقره در سه سطح ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی به محلول پلی وینیل الکل اضافه شدند. برای حصول محلول همگن، فرایند اختلاط به وسیله ی همزن مغناطیسی به مدت یک شبانه روز ادامه یافت. به منظور تشکیل لایه ی کامپوزیتی حاوی نقره، مقدار مشخصی از محلول نهایی در داخل پتری دیش ریخته شد. سپس پتری دیش در داخل آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا محلول ریخته گری شده به طور کامل خشک شود. سپس لایه ی کامپوزیتی شکل گرفته شده به راحتی از سطح پتری دیش جدا شد (Ahangar et al., 2014).

ریخت شناسی[1] نانو فیلم

برای ریخت شناسی سطحی نمونه ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی[2] مدل (LEO 1450VP) در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی استفاده شد. نمونه ها ابتدا به مدت کوتاهی در نیتروژن مایع فرو برده شدند. پس از چند ثانیه نمونه ها ترد شده به طوری که با یک اشاره و کمترین تنش ممکنه از مقطع عرضی برش خوردند. سپس نمونه های برش خورده بر روی پایه های استوانه ای قرار گرفته و پوشش دهی طلا روی آن ها انجام گرفت و برای عکسبرداری آماده شدند (عابدینی و همکاران، ۲۰۱۴).

[1] Morphology
[2] Scanning Electron Microscope

برای مشخص کردن ابعاد نانو ذرات و تعیین چگونگی توزیع اندازه ذره ها، از آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری[1] مدل (Leo 912AB) در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده شد. در این روش نمونه به صورت یک قرص به قطر ۳ میلی متر و ضخامت تقریبی ۵ میکرومتر درآورده می شود. باید برش های نمونه تهیه شده تا حدی نازک شود که به الکترون ها اجازه عبور بدهد (Nematollahi *et al*., 2016).

کشت قارچ آسپرژیلوس فلاووس

قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط PDA کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور قرار داده شد (مختاری و همکاران، ۱۳۹۱). برای آلوده نمودن نمونه های پسته به قارچ آسپرژیلوس فلاووس، ابتدا با کمک دستگاه هماسیتومتر از هر یک از جدایه های بیمارگر سوسپانسیون اسپور با غلظت $۱۰^{۶}$ لسپور میلی لیتر تهیه شد. در این آزمون برای هر جدایه سه گروه پسته به علاوه ی یک تیمار شاهد در نظر گرفته شد. پس از شست و شوی پسته ها با آب، برای ضد عفونی پسته ها در هیپوکلرید سدیم ۲٪ غوطه ور شد. سپس دو بار با آب استریل شست و شو داده شده و نهاتا به مدت ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۹۰ درصد غوطه ور شدند. در آخرین مرحله مقدار ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون اسپور با غلظت گفته شده ی قارچی تزریق شد (خالدی و همکاران، ۱۳۹۲).

برای اندازه گیری سم آفلاتوکسین در فواصل زمانی دو تا سه هفته (مرتضوی و همکاران، ۱۳۹۳) در نمونه های بسته بندی شده در فیلم حاوی ذرات نانو نقره و نمونه شاهد با استفاده از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ تحت عنوان (اندازه گیری آفلاتوکسین گروه G و B به طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص سازی با ستون ایمونو افینیتی) اندازه گیری شد.

نمونه های پسته آلوده و شاهد درون فیلم های پلیمری حاوی ذرات نانو نقره بسته بندی شده و به مدت سه هفته در بازه های مختلف درون انکوباتور قرار گرفت تا قارچ آسپرژیلوس فلاووس تولید سم آفلاتوکسین کند.

مقایسه آماری

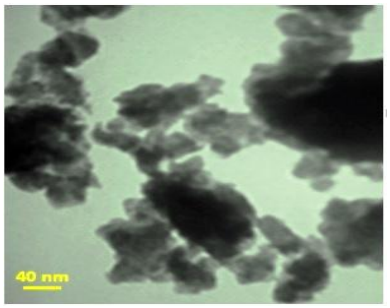
برای مقایسه فاکتورهایی از قبیل درصد وزنی نانونقره، مدت زمان، غلظت آلودگی و بررسی معنی داری اختلافات در سطوح مختلف نانو نقره با استفاده از نرم افزار Design expert.10 از آزمون طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین ها (آزمون دانکن) استفاده شد. سطح معنی داری در مورد تمامی فاکتورها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

[1] Transmission electron microscopy

نتایج و بحث

آزمایشات ساختاری نانو فیلم پلیمری

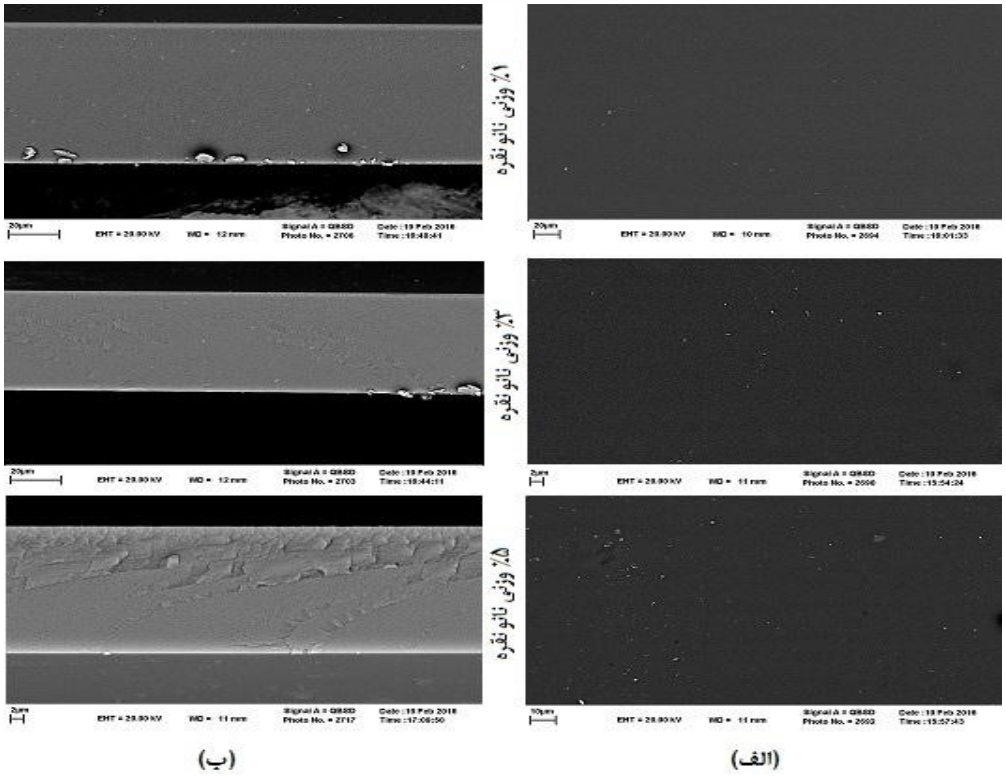
شکل ۱ نشان دهنده تصاویر TEM نانوذرات نقره است. نتایج تصویر شکل ۱ حاکی از ساختاری بی شکل[1] با اندازه ذرات تقریبی nm ۱۰ است.



شکل ۱ – تصویر میکروسکوپ عبوری TEM نانو نقره

در شکل ۲ تصاویر SEM فیلم پلی وینیل الکل خالص و نانو کامپوزیت پلیمری حاوی نانو ذرات نقره با غلظت های ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی مشاهده می شود. نتایج نشان می دهد که ذرات نانونقره به طور تقریبا یکنواخت در ماتریس پلیمری پراکنده شده اند. با افزایش درصد وزنی نانوذرات در ماتریس پلیمری تشکیل ساختاری غار شکل کاملا مشهود است. ساختارهای غار شکل تایید کننده پخش مناسب ذرات در ماتریس پلیمری بوده و منتج شده از عوامل مختلفی نظیر برهمکنش های واندروالسی، الکترواستاتیکی و یا پیوندهای کووالانسی می باشند. شایان ذکر است که شدت ساختارهای غار شکل با افزایش درصد وزنی ذرات در قسمت بالایی غشا افزایش می یابد. این پدیده می تواند به دلیل حرکت ذرات در محلول ریخته گری شده و در حین شکل گیری غشا (فرایند تبخیر حلال) اتفاق بیافتد. محلول ریخته گری شده دارای دمای تقریبی ۵۰ درجه سلسیوس بوده است و پس از ریخته گری بر روی سطح سردتر (شیشه)، لایه های زیرین از افت دمای بیشتری برخوردار بوده که افزایش گرانروی را به همراه دارد. لذا تحرک ذرات از لایه های فوقانی به لایه های میانی و در نهایت لایه های بالایی فیلم ریخته گری اتفاق می افتد. با افزایش غلظت ذرات نقره در لایه های بالایی شدت ساختار غار شکل افزایش می یابد که تصویر SEM مربوط به غشای حاوی ۵ درصد وزنی از ذرات نقره این پدیده را به وضوح به تصویر می کشد.

[1] Amorphous



شکل ۲ – تصویر میکروسکوپ الکترون روبشی SEM –الف) تصاویر سطوح نانو کامپوزیت نقره به ترتیب از بالا به پایین ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی- ب) تصاویر مقاطع نانو کامپوزیت نقره به ترتیب از بالا به پایین ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی

آلوده نمودن پسته ها به قارچ آسپرژیلوس فلاووس

پس از کشت اسپور قارچ آسپرژیلوس در محیط PDA طبق شکل ۳ (الف) پس از ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، قارچ آسپرژیلوس فلاووس تشکیل شد. همانطور که در (ب) مشاهده می شود پسته های آلوده شده به قارچ آسپرژیلوس تغییر رنگ داده و قارچ آسپرژِلوس در پسته رشد کرده است.

شکل ۳-الف) کشت اسپور قارچ آسپرژیلوس فلاووس- ب) پسته های آلوده شده به قارچ آسپرژیلوس فلاووس

رشد و اندازه گیری سم آفلاتوکسین

پس از بسته بندی و آلوده نمودن، نمونه ها در ۳ بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از دستگاه HPLC مدل ۹۱۰۰ از شرکت یانگ لین کره، از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ سم آفلاتوکسین اندازه گیری شد. طبق نمودار ۵ نتایج حاکی از آن است که با افزایش میزان درصد وزنی ذرات نانو نقره سم آفلاتوکسین در ۳ بازه زمانی کاهش پیدا کرده است، طبق نتایج اوتهمن و همکاران در سال ۲۰۱۴ می باشد.

جدول ۱ – جدول تجزیه واریانس برای هر یک از عوامل موثر در کاهش آفلاتوکسین به همراه اثرات متقابل آن

	مجموع مربعات	درجه آزادی	متوسط مربعات	مقدار F	مقدار P	
مدل	۳۹/۰۱	۶	۶/۵۰	۲۳/۱۸	۰/۰۰۰۱	Significant
غلظت(A)	۶/۵۳	۱	۶/۵۳	۲۳/۳۰	۰/۰۰۱۳	
زمان(B)	۲۸/۸۸	۱	۲۸/۸۸	۱۰۲/۹۸	<۰/۰۰۰۱	
غلظت آلودگی(C)	۰/۰۱۴	۱	۰/۰۱۴	۰/۰۴۹	۰/۸۳۱۱	
AB	۳/۵۰	۱	۳/۵۰	۱۲/۴۷	۰/۰۰۷۷	
AC	۲/۰۲۵E-۰۰۳	۱	۲/۰۲۵E-۰۰۳	۷/۲۲۱E-۰۰۳	۰/۹۳۴۴	
BC	۰/۰۸۴	۱	۰/۰۸۴	۰/۳۰	۰/۵۹۸۹	
Residual	۲/۲۴	۸	۰/۲۸			
Lack of Fit	۲/۲۴	۶	۰/۳۷			
Pure Error	۰/۰۰۰	۲	۰/۰۰۰			
Cor Total	۴۱/۲۵	۱۴				

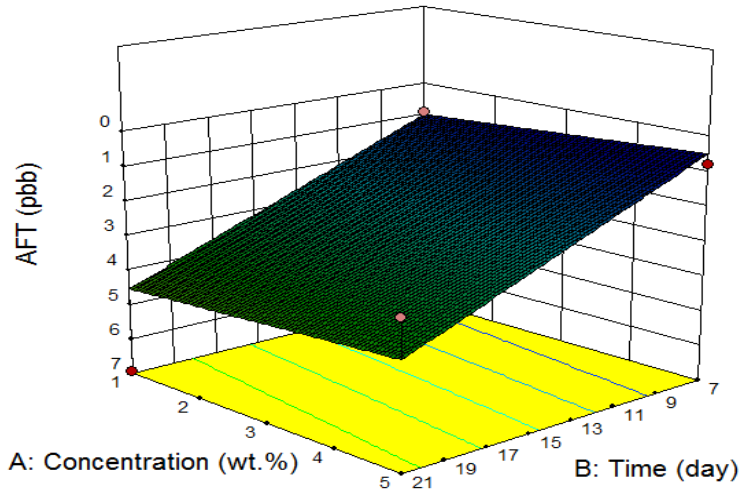
مجذور R به دست آمده برای تاثیر درصد وزنی نانو نقره ۰/۹۴۵۶ می باشد و به معنی این مـی باشـدکه حـدود ۹۹٪ از تنوع داده ها توسط این مدل توضیح داده می شود. مدل همبستگی شامل کلیه عوامـل مـوثر بـر آفلاتوکسـین اعـم از عوامل اصلی، اثرات دوگانه و مربعات، به صورت زیر بوده که بر حسب مقادیر کد شده عوامل نشان داده شده است:

میـــزان ســـم آفلاتوکســـین = 3.00-0.90*A+1.90*B-0.041*C-0.93*AB-0.023*AC+0.15*BC (۱)

A = درصد وزنی نانو نقره، B= بازه زمانی، C= غلظت آلودگی

جدول ۱ مقایسه‌ای بین مقادیر آزمایشگاهی و داده‌های به دست آمده از مدل آماری برای میـزان سـم آفلاتوکسـین نشان می‌دهد. همان‌طور که جدول ۱ نشان مـی‌دهـد مـدل بـه دسـت آمـده از کـارایی مناسـبی در تخمـین داده‌هـای آفلاتوکسین برخوردار است. طبق نتایج جدول واریانس، عوامل A، B به همراه اثر متقابـل AB از تـأثیر معنـی‌داری بـر مقدار سم آفلاتوکسین برخوردار هستند که در مدل ارائه شده نیز وجود دارند. طبق نتایج به دست آمده با افزایش میزان غلظت نانوذرات نقره میزان سم آفلاتوکسین کاهش یافته است. نانو ذرات نقره با دخالت در فعالیت حیاتی سـلول باعـث ایجاد پدیده هیپرتروفی شده و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره، فعالیت آن ها بیشتر شده در نتیجه منجربه آسیب دیـدن اسپور قارچ و درنهایت کاهش اسپور قارچ و تولید سم آفلاتوکسین بر حسب بخش در میلیارد (ppb) می شود (اوتهمن و همکاران، ۲۰۱۴). شکل ۵ تاثیر فاکتور غلظت بر کاهش سم آفلاتوکسین را نشان می دهد.

سنجش آفلاتوکسین در نمونه های کنترل شده نشان داد که بیشترین میزان تولید سم در هفته سوم (از روز ۱۴ تـا ۲۱) پس از کشت می باشد و پس از آن واکنش های تنظیمی موجب ثبات تولید سم مـی گـردد (طبـق شـکل ۵). از طـرف دیگر ثبات تولید سم در قارچ، احتمالا مربوط به کاهش میزان ترکیبات موثر در بیوسنتز سم در محیط نیسـت زیـرا اولا مقادیر ترکیبات محیط کشت در حد اشباع است و ثانیا میزان رشد قارچ دستخوش کاهش در دوره های زمـانی انتهـایی نمی گردد. میزان تولید آفلاتوکسین به هنگام مجاور شدن با نانو ذرات نقره در غلظت های ۳ و ۵ درصد وزنی به شـدت کاهش می یابد. عدم معنی دار بودن غلظت آلودگی در این تحقیق می تواند به این علت باشد که رشد و جمعیـت قـارچ تاثیر چندانی در تولید توکسین ندارد و هدف اصلی از این تحقیق تولید سم آفلاتوکسین بوده است.



شکل ۵ – نمودار تاثیر میزان درصد وزنی نانو نقره در کاهش آفلاتوکسین

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق پس از ساخت فیلم های نانو نقره و آلوده کردن پسته به قارچ آسپرژیلوس فلاووس، نتایج به دست آمده حاکی از آن است که ذرات نانو نقره میزان قارچ آسپرژیلوس فلاووس و سم آفلاتوکسین را کاهش داده است. همچنین با افزایش غلظت ذرات نانو، فعالیت ضدمیکروبی نانو نقره بیشتر شده و مقدار بیشتری از این سم را مهار کرده است. بنابراین می توان از این روش برای بسته بندی پسته به منظور افزاش زمان ماندگاری و کاهش سم آفلاتوکسین پیشنهاد داد.

منابع

ابریشمی، م. ۱۳۷۳. پسته ایران شناخت تاریخی. مرکز نشر دانشگاهی تهران، تهران.

محمدی مقدم، م.، افشاری، ح.، محمدی گل تپه، حکم آبادی، ح. و راد، س. ۱۳۹۰. بررسی میزان تاثیر پوسته مغز پسته (Testa) در کاهش رشد Aspergillus flavus آفلاتوکسین زا و تولید آفلاتوکسین B1 در مغز ارقام مختلف پسته. نشریه علوم باغبانی، ۲۵ (۱): ۷۳ تا ۸۱.

رهای، س.، رضوی، ه. و امام جمعه، ز. ۱۳۸۹. بررسی توانایی گونه مخمر ساکارو مایسس سرویزیه جهت کاهش آفلاتوکسین موجود در پسته. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۷ (۱).

مختاری، ع، ر.، خسروی، ع، ر.، صالحی، ت. ۱۳۹۱. بررسی اثر ضد قارچی و تغییرات مورفولوژیکی اسانس زیره سبز بر روی جداره های قارچ فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس جداسازی شده در ایران. پاتوبیولوژی مقایسهای، علمی ـ پژوهشی، ۹ (۲)، ۷۱۴–۷۰۵.

خالدی، ن.، امینیان، ح.۱۳۹۲. بررسی روشهای اتمسفر تعدیل یافته، کنترل بیولوژیک و اثرات ضدقارچی عصاره گیاهی چریش بر میزان رشد و توکسین زایی قارچ. دانشگاه تهران.

مرتضوی، س، م.، طباطبائی یزدی، ف.، فراجی، ح.، غفوریان، م.، فراجی، ح. ۱۳۹۲. بررسی میزان آفلاتوکسین پسته و تاثیر ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی. مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۶(۱).

Abedini, R., M. Omidkhah, and F. Dorosti. 2014. Hydrogen separation and purification with poly (4-methyl-1-pentyne)/MIL 53 mixed matrix membrane based on reverse selectivity, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39: 7897–7909.

Ahangar, E. G., M. H. Abbaspour-Fard, N. Shahtahmassebi, M. Khojastehpout, and P. Maddahi. 2014. Preparation and characterization of PVA/ZnO nanocomposite. Food Processing and Preservation.

Al-Othaman, M. R., A. R. M. A. E.-. Aziz, M. A. Mahmoud, S. A .Eifan, M. S. El-Shikh and M. Majrashi. 2014. Application of silver nanoparticles as antifungal and antiaflatoxin B1 produced by aspergillus flavus. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 9(1): 151-157.

Brody, A. L., B. Bugusu, J. H. Han, C. K. Sand, and T. H. Mchugh. 2008. Innovative food
packaging solutions. *Food Science, 73(8): 107–116.*

Cheraghali, A. M., H. Yazdanpanah, G. Abouhossain, M. Hassibi, and S. Ali-Abadi, 2007.
Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology, 45:812-816.*

Dini, A., P. Khazaeli, A. Roohbakhsh, A. Madadlou, M. Pourenamdri, L. Setoodeh, A. Askarian, N. Doraki, H. Farrokhi, H. Moradi, and H. Khodadadi. 2013. Aflatoxin contamination level in Iran's pistachio nut during years 2009 e 2011. *Food Control, 30: 540-544.*

Duncan, T. V . 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety:

Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and InterfaceScience, 1-24.*

Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q. S., Duan, S. S., Ouyang, Y. S. and Chen, Y. B. 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus Aureus. *An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine, 24(1): 135-141*.

Mendes, E., R. Piletti, T. Barichello, C. M. Oliveira, C. T. Kniess, E. and Angioletto. 2012. The influence of particle size and AgNO3 concentration in the ionic exchange process on the fungicidal action of antimicrobial glass. *Materials Science and Engineering 32(6): 1518–1523.*

Nematollahi, M. H., A. H. Saeedi Dehaghani, R. Abedini. (2016). CO_2/CH_4 separation with poly (4-methyl-1-pentyne) (TPX) based mixed matrix membrane filled with Al_2O_3 nano-particles, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33: 657–665.

Pittet 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds e an updated review. *Revue de Medecine Veterinaire, 149: 479-492.*

Zheng, Z. 2011. World production and trade of pistachios: The role of the U.S. and factors

affecting the export demand of U.S. pistachios. *University of Kentucky Master's Theses: 12*