DOI: 10.22034/vj.2017.108435.1241
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی میزان آلودگی شیرهای خام به آفلاتوکسین M1 در شهرستان خوی

• امین صنعتگر
گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران.
• معصومه آقازاده (نویسنده مسئول)
گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران.
تاریخ دریافت: ۳۰-۰۸-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۲-۱۰-۱۳۹۵
Email: aghazadehchemist@gmail.com

چکیده

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی قارچ‌ها هستند که توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس تولید می‌شوند. این سموم در ایجاد بیماری‌هایی از قبیل سرطان کبد، هپاتیت مزمن و سیروز نقش بسیار مهمی دارند. هدف از این مطالعه تعیین میزان آفلاتوکسین M1 در شیر خام جمع‌آوری شده و بررسی وجود قارچ‌های مولد آن در خوراک دام شهرستان خوی می‌باشد. در یک مطالعه توصیفی- تحلیلی از شیرهای خام جمع‌آوری شده مناطق مختلف شهرستان خوی به طور تصادفی چند نمونه در فاصله زمانی نیمه دوم فصل تابستان تا نیمه اول فصل زمستان انتخاب گردید. بعد از سانتریفوژ کردن نمونه‌ها بخش فوقانی شیر سانتریفوژ شده که شامل چربی‌های شیر بود خارج و کنار گذاشته شد و بخش پائینی شیر سانتریفوژ شده که فاقد چربی بود، با روش الایزا و با کیت مخصوص ساخت شرکت R-biopharm، آنالیز و مقدار آفلاتوکسین آن‌ها تعیین شد. نتایج این تحقیق نشان داد از ۱۳۳ نمونه شیر خام که در نیمه دوم فصل تابستان (ماه‌های مرداد و شهریور) و نیمه اول فصل زمستان (ماه‌های مهر، آبان و آذر) در سال ۱۳۹۴ نمونه‌برداری شده و به روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفته اند، ۵۱/۰۶ درصد نمونه‌ها در نیمه دوم فصل تابستان با محدوده صفر تا ۸/۰ میکروگرم بر لیتر آلوده به آفلاتوکسین M1 بودند و در ۴۵/۵۱ درصد از نمونه‌های آلوده میزان میانگین آفلاتوکسین بیش از استاندارد اروپا (۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر) بود. همچنین ۵۲/۳۲ درصد نمونه‌ها در نیمه اول فصل زمستان با محدوده ۰/۵ تا ۸/۰ میکروگرم بر لیتر به آفلاتوکسین M1 آلوده بوده و در ۶۰/۴۷ درصد از نمونه‌های آلوده میزان میانگین آفلاتوکسین بیش از استاندارد اروپا (۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر) بود. گونه‌های *Rhizopus stolonifer (R. stolonifer)* و *Aspergillus flavus (A. flavus)* و *Aspergillus clavatus (A. clavatus)* به طور مشترک در همه گاوداری‌های مورد مطالعه بر روی خوراک‌های دام یافت شد. حضور آفلاتوکسین در لبنیات یک مشکل بسیار جدی و مهم برای سلامت عمومی است، مخصوصاً نوزادان و کودکان که بیشترین مصرف‌کننده این محصولات بشمار می‌روند. برای کاهش میزان آفلاتوکسین در شیر، کنترل تغذیه دام‌های شیرده که به نوعی از شیر آن‌ها استفاده می‌شود از لحاظ آلودگی به آفلاتوکسین M1 باید مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین M1، شیر خام،خوراک دام، خوی، الایزا

● Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 147-154

Aflatoxin M1 contamination of raw milk in Khoy city

By: Sanatgar, A., Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran. and Aghazadeh, M., (Corresponding Author) Department of Food Science, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran.
Email: aghazadehchemist@gmail.com

Received: 2016-11-20 **Accepted: 2017-01-11**

Aflatoxins are toxic mold metabolites produced by different Aspergillus species. These toxins have an important role in the pathogenesis of liver diseases such as cancer, chronic hepatitis and cirrhosis. The aim of this study was to determine the level of aflatoxin M1 in raw milk and the presence of the fungus in animal feed collected in Khoy city. In a cross-sectional study, random samples were selected from the collected raw milk in different parts of Khoy city in a time interval between the second half of the summer and the first half of the winter. After centrifugation of samples, upper part of centrifuged milk containing milk fat was removed and the lower portion of fat-free milk was used to analyze the aflatoxin level by ELISA kit manufactured by R-biopharm Company. Results showed that 51.06% of samples collected in the second half of summer (July and August) and 52.32% of samples collected in the first half of winter (October, November and December) in 1394, were contaminated with aflatoxins with a range of 0-8 µg/L and an average of 0.5-8 µg/L, respectively. The average of the aflatoxin contamination was over Europe standard (0.05µg/L) in 60.47% of samples. *R. stolonifer, A. flavus and A. clavatus* species were found in all studied cattle feeds. The presence of aflatoxin in dairy products is a very serious and important problem to public health, especially to infants and children who are considered as the largest consumers of these products. To reduce the amount of aflatoxin in milk, dairy animal feeds must be controlled in terms of contamination with M1 aflatoxin.

Key words: M1 aflatoxin, raw milk, cattle feed, Khoy, ELISA

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها هستند که دارای اثرات سمي، سرطان‌زايي و ناقص‌الخلقه‌زايي می‌باشند. واژه مایکوتوکسین از لغت يوناني Myke به معني قارچ و لغت Toxin به معني سم گرفته شده است. آفلاتوکسین‌ها مایکوتوکسین‌هايي هستند که توسط سه نوع کپك به نام‌های *Aspergillus flavous* (آسپرژیلوس فلاووس)، *Aspergillus parasiticus* (آسپرژیلوس پارازیتیکووس) و *Aspergillus nomius* (آسپرژیلوس نومیوس) ایجاد مي شوند. کلمه Aflatoxin مشتق از ابتداي کلمات آسپرژیلوس فلاووس و توکسین به معناي سم است (۱). در میان مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین آن‌ها هستند و بیماری‌های ناشي از تغذیه مواد آلوده به آفلاتوکسین، خطرات قابل ملاحظه‌ای برای انسان، دام و طیور به همراه دارد. ۱۷ نوع آفلاتوکسین در طبیعت تشخیص داده شده است که بین آن‌ها آفلاتوکسین‌های G1, B2, B1 و G2 مهم‌ترین هستند. اگر آفلاتوکسین B۱ به تنهايي یا همراه آفلاتوکسین‌های دیگر در خوراك دام بوسیله حیوانات خورده شود، به توکسین‌های دیگري در ترشحات و بافت‌های آن‌ها تبدیل می‌شود که به سم شیر معروف است. این سم آفلاتوکسین M نام دارد که این نام شاخصي از منبع جداسازی آن یعني شیر بود. انواع آفلاتوکسین شامل M1،M2 و M4 می‌باشد که آفلاتوکسین M1 به نام سم شیر نامگذاري شده است (۲ و ۳). آخرین ارزیابي حد مجاز آفلاتوکسین M1 نیز توسط کمیته کارشناسی مشترك WHO و FAO در زمینه افزودنی‌های مواد غذایی (JECFA)، در سال ۲۰۰۱ انجام پذیرفته است. براساس این ارزیابي‌ها با درنظر گرفتن حداکثر توان ایجاد سرطان و بالاترین میزان مصرف شیر بر اساس آمار مصرف سرانه سازمان بهداشت جهاني، آلودگی شیر مابین حدود ۰/۵و ۰/۰۵ بخش در میلیارد (ppb) وجود داشته است (۴). حداکثر مجاز باقیمانده آفلاتوکسین M1 در شیر بر اساس استاندارد FDA آمریکا، اروپا و ایران به ترتیب ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۱میکروگرم بر لیتر مي‌باشد (۵).

عواملی که در میزان تولید مایکوتوکسین‌ها موثر می‌باشند به عوامل فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیك تقسیم شده‌اند. عوامل فیزیکی، عواملي را در بر می‌گیرد که بر روی وضعیت محیطي موثر در ایجاد کلني‌های قارچی مانند دما، رطوبت نسبی و آلودگی با حشرات تاثیرگذار مي‌باشد. از اثرات شیمیایی مي‌توان به کاربرد انواع قارچ‌کش‌ها اشاره نمود و از اثرات بیولوژیك مي‌توان تاثیرات سایر گونه‌های قارچی در زمان رشد آسپرژیلوس اشاره کرد (۶). انجام نمونه‌برداری فصلي برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین به دلیل شرایط و موقعیت خاص اکولوژیك و نیز عوامل تاثیرگذار منطقه مورد مطالعه، تنوع و گوناگونی دامداری‌ها

در دو قالب سنتي و صنعتي و عوامل مختلف اقتصادي و فرهنگي تاثير گذار در مورد نحوه تغذيه دام در هر يك از اين دو گروه از گاوداری‌ها در کشور ما، می‌تواند به عنوان عوامل تاثیرگذار مهم دیگري در ميزان دريافت آلودگی شير در هر دو مقوله فوق باشد. هدف کلی از انجام این پژوهش بررسی میزان آفلاتوکسین M1 در شیرهای خام و وجود قارچ‌های مولد آن در خوراک دام شهرستان خوی واقع در شمال استان آذربایجان غربی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق با مراجعه به ده گاوداری شهرستان خوی ۱۳۳ نمونه شیر خام ۱/۵ لیتری از ظروف ۴۰ لیتری در نیمه دوم فصل تابستان و نیمه اول فصل زمستان در سال ۱۳۹۴ برداشت شد. پس از اخذ نمونه، نمونه‌ها در شرایط بهداشتی و کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی انتقال داده شد (۷). چربی شیر پس از سانتریفوژ کردن جدا شد و از شیر بدون چربی برای تعیین میزان آفلاتوکسین M1 به روش الایزا و به کمک کیت آماده AFM۱ ساخت شرکت R-Biopharm آلمان استفاده گردید. لازم به ذکر است نمونه‌های شیر که غلظت آفلاتوکسین M1 آن‌ها به حدی نبود که روش الایزا قادر به شناسایی میزان آن باشد، شاخص آلودگی ۲/۵ نانوگرم در لیتر (۱/۲ حداقل غلظت قابل شناسایی) در نظر گرفته شد (کیت مورد استفاده دارای حداقل تشخیص ۵ نانوگرم در لیتر آفلاتوکسین M1 در شیر می‌باشد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد (پنج، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ بخش در تریلیون (ppt)) و نمونه‌های شیر آماده‌سازی شده به کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتری به حفره های میکروپلیت اضافه شد و به مدت یک ساعت به دور از نور و در درجه حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس مایع موجود در میکروپلیت خارج شد و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن به صورت وارونه بر روی کاغذهای جاذب رطوبت، مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد. سپس همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شدند. هر بار بعد از تخلیة مایع شستشو، میکروپلیت به طور واژگون بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار گرفت تا کاملاً باقیمانده آب شستشو خارج شود. به این ترتیب موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده بودند، خارج شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول آفلاتوکسین کونژوگه شده با آنزیم (کیت R-Biopharm-Aflatoxin M۱, Germany) به حفره‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در انکوباتور ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از این زمان، مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه و سپس همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شد. عمل شستشو دو بار تکرار گردید و هر بار بعد از تخلیه مایع شستشو، میکروپلیت به طور واژگون بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار گرفت تا باقیمانده آب شستشو کاملا خارج شود. سپس ۵۰ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر کروموژن به هر حفره اضافه شد. بعد از مخلوط کردن به آرامی، میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک نگهداری شد. در پایان، واکنش رنگی صورت گرفت بدین صورت که در نبود آفلاتوکسین M1 در نمونه (منفی بودن نمونه) واکنش رنگی با رنگ آبی مشخص می‌گردید که شدت رنگ با مقدار آفلاتوکسین موجود در نمونه‌ها رابطه غیرمستقیم داشت. بدین معنی که با افزایش مقدار سم در حفره‌ها از شدت رنگ کاسته می‌شد و حفره‌های بی رنگ معرف وجود آفلاتوکسین بودند. در نهایت برای توقف واکنش، محلول قطع واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد و رنگ آبی موجود نیز به رنگ زرد تغییر یافت. نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید و اطلاعات مربوط به میزان جذب (OD) هر حفره به تفکیک ثبت شد. با کسر میزان جذب نمونه‌ها و استانداردها (صفر، پنج، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ ppt) بر میزان جذب استاندارد صفر، ضرب در ۱۰۰، درصد جذب طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

۱۰۰× جذب استاندارد صفر/ جذب استاندارد (یا نمونه) = درصد جذب

بر اساس درصد جذب نمونه‌های استاندارد و میزان آفلاتوکسین M1 موجود در نمونه‌های استاندارد، منحنی کالیبراسیون رسم شد. به دنبال آن بر اساس درصد جذب هر نمونه شیر و انطباق با منحنی کالیبراسیون میزان آفلاتوکسین M1 (میکرو گرم بر لیتر) هر نمونه به دست آمد.

همچنین نمونه‌برداری از ترکیبات خوراک دام‌های مورد استفاده در این ده گاوداری اطراف شهر خوی در سال ۱۳۹۴ در نیمه دوم فصل تابستان و نیمه اول فصل زمستان انجام گردید. مقدار ۲۰۰ گرم از هریک از ترکیبات مورد استفاده در خوراک دام‌ها از مکان‌های مختلف انبار برداشت و در کیسه‌های برچسب دار کاغذی استریل و به آزمایشگاه منتقل شد. علایم اختصاری برای هر نمونه تعیین و وجود یا عدم وجود هریک از قارچ‌ها برای هر گاوداری ارزش‌گذاری گردید تا در ثبت داده‌ها و انجام آنالیز آماری استفاده شوند. کلیه نمونه‌های شیر و خوراك دام سریعا به آزمایشگاه منتقل و در فریزر۲۰- درجه تا زمان آزمایش که حداکثر دو ماه بود، نگهداری شد. هر یک از کپک‌های شناسایی شده درون پلیت‌ها جداسازی و در پلیت‌های استریل حاوی محیط سابورو دکستروآگار (دکسترین- آگار- پپتون) کشت داده شد و در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. جهت اطمینان از خلوص نمونه‌ها از روش کشت بر روی لام (Slide culture technique) نیز استفاده شد (۸). کلیه داده‌های آماری حاصل از مطالعات خوراک دام و آفلاتوکسین پس از ثبت، مرتب‌سازی و کدگذاری با استفاده از نرم‌افزارهای EXCEL مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

از ۱۳۳ نمونه شیر خام که در نیمه دوم فصل تابستان (ماه‌های مرداد و شهریور) و نیمه اول فصل زمستان (ماه‌های مهر، آبان و آذر) در سال ۱۳۹۴ نمونه‌برداری و به روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفته‌اند همانطور که جدول‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد، ۴۷ نمونه در نیمه دوم تابستان و ۸۶ نمونه در نیمه اول فصل زمستان در این شهرستان آلوده به آفلاتوکسین بودند. به این ترتیب که ۵۱/۰۶ درصد شیرهای تابستان با محدوده صفر تا هشت میکروگرم بر لیتر و ۵۲/۳۲ درصد شیرهای زمستان با محدوده نیم تا هشت میکروگرم بر لیتر آلودگی داشتند.

در تابستان شیر گاوداری S6 با ۳/۶۵ ± ۹/۹۵ میکروگرم در لیتر بیشترین مقدار و شیر گاوداری‌های S8،S6 وS9 با صفرمیکروگرم در

جدول ۱- محل و تعداد نمونه‌گیری گاوداری در نیمه دوم فصل تابستان

محل نمونه گیری گاوداری	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میانگین آلودگی (µg/L)	حد پایین (µg/L)	حد بالا (µg/L)
S۱	۱۰	۱	۱۰	۷/۸	۱/۶۲	۸/۵۱
S۲	۸	۸	۱۰۰	۸	۳/۲	۹/۴۷
S۳	۶	۱	۱۶/۶۶	۱/۳۳	۰/۳	۳/۳۲
S۴	۴	۱	۲۵/۰	۲	۱/۶۵	۳/۵۱
S۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰
S۶	۸	۸	۱۰۰/۰	۸	۳/۶۵	۹/۹۵
S۷	۳	۳	۱۰۰/۰	۸	۵/۳	۹/۵۱
S۸	۱	۰	۰	۰	۰	۰
S۹	۲	۰	۰	۰	۰	۰
S۱۰	۴	۲	۵۰	۴	۱/۶۵	۹/۷۶

جدول ۲- محل و تعداد نمونه‌گیری گاوداری در نیمه اول فصل زمستان

محل نمونه گیری گاوداری	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میانگین آلودگی (µg/L)	حد پایین (µg/L)	حد بالا (µg/L)
S۱	۱۰	۳	۳۰/۰	۲/۴	۰/۷۵	۵/۸۰
S۲	۸	۴	۵۰/۰	۴	۰/۳	۶/۱۱
S۳	۷	۲	۲۸/۵۷	۲/۲۸	۰/۲	۷/۵۰
S۴	۱۶	۱	۶/۲۵	۰/۵	۰/۰۱	۱/۵۶
S۵	۷	۷	۱۰۰/۰	۸	۱/۶۲	۸/۷۸
S۶	۱۰	۱۰	۱۰۰/۰	۸	۴/۱۳	۹/۹۷
S۷	۱۰	۷	۷۰/۰	۵/۶	۱/۶۲	۷/۵۱
S۸	۶	۳	۵۰/۰	۴	۰/۲	۶/۴۷
S۹	۷	۵	۷۱/۴۲	۵/۶۳	۰/۳	۷/۳۲
S۱۰	۵	۳	۶۰/۰	۴/۸	۱/۶۵	۹/۷۶

لیتر کمترین مقدار آفلاتوکسین را نشان دادند. همین‌طور در زمستان شیر گاوداری S6 با ۹/۹۷±۴/۱۳ میکروگرم در لیتر بیشترین مقدار و شیر گاوداری‌های S4 با ۱/۵۶±۰/۰۱ میکروگرم در لیتر کمترین مقدار آفلاتوکسین را نشان دادند. همچنین مقایسه تراکم آفلاتوکسین فصلی در نمونه شیر گاوداری‌های مورد مطالعه در خوی نشان می‌دهد که میانگین مقادیر AFM1 در نمونه‌های شیر خام تابستان کمتر از زمستان بود.

بحث

آفلاتوکسین‌ها يك دسته مهم از سموم قارچی می‌باشند. آفلاتوکسین‌ها مواد سمي موتاژن، سرطان‌زا و تراتوژن هستند که عمدتا قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکووس تولید مي‌کنند. این قارچ‌ها نقش مهمي در فساد گندم، ذرت، جو، آرد، سبوس، نان و سایر مواد غذایی دارند. AFB1 یکی از متداول‌ترین و مهم‌ترین سرطان‌زاهاست و از راه مصرف خوراك آلوده به این سم در بدن به صورت AFM1 تغییر یافته و در شیرحیوان وارد می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ۵۱/۰۶ درصد نمونه‌ها در نیمه دوم فصل تابستان با محدوده صفر تا ۸/۰ میکروگرم بر لیتر آلوده به آفلاتوکسین M1 بودند و در ۴۵/۵۱ درصد از نمونه‌های آلوده میزان میانگین آفلاتوکسین بیش از استاندارد اروپا (۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر) بود. هم‌چنین ۵۲/۳۲ درصد نمونه‌ها در نیمه اول فصل زمستان با

جدول ۳- میزان و درصد آلودگی آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر خام

زمان آزمایش	روش آزمایش	تعداد نمونه	تعدادنمونه آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میزان آلودگی(µg/L)
نیمه دوم تابستان	ELISA	۴۷	۲۴	۵۱/۰۶ درصد	۰-۸/۰
نیمه اول زمستان	ELISA	۸۶	۴۵	۵۲/۳۲ درصد	۰/۵۰-۸/۰

جدول ٤- داده‌های حاصل از مطالعات خوراک دام و آفلاتوکسین شیر سالانه در گاوداری‌های مورد مطالعه خوی در نیمه دوم تابستان

ردیف	تعداد نمونه‌های شیر	تعداد نمونه‌های خوراک دام	*Aspergilus flavus*	*Aspergilus clavatus*	*Rhizopus stolonifer*	*Penicillium sp.*	*Saccharomyces cerevisiae*	Aflatoxin M ± SE µgr/L
S۱	۱۰	۱۲	+	+	+	-	-	۸/۵۱±۱/۶۲
S۲	۸	۱۴	+	+	+	+	-	۹/۴۷±۳/۲
S۳	۶	۷	+	+	+	+	+	۳/۳۲±۰/۳
S۴	۴	۶	+	+	+	-	-	۳/۵۱±۱/۶۵
S۵	۱	۶	+	-	+	-	-	۰±۰
S۶	۸	۱۰	+	+	-	-	-	۹/۹۵±۳/۶۵
S۷	۳	۱۶	+	+	+	-	-	۹/۵۱±۵/۳
S۸	۱	۱۴	-	+	-	-	+	۰±۰
S۹	۲	۳	-	-	+	+	-	۰±۰
S۱۰	۴	۳	+	+	+	+	-	۹/۷۶±۱/۶۵

علایم اختصاری: S: sample، اعداد کنار آن شماره گاوداری است، +: وجود، -: عدم وجود، SE:Standard Error، µgr/L: میکرو گرم بر لیتر.

محدوده ۰/۵ تا ۸/۰ میکروگرم بر لیتر به آفلاتوکسین M1 آلوده بود و در ۶۰/۴۷ درصد از نمونه‌های آلوده میزان میانگین آفلاتوکسین بیش از استاندارد اروپا (۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر) می‌باشد. همچنین مقایسه تراکم آفلاتوکسین فصلی در نمونه شیر گاوداری‌های مورد مطالعه در خوی نشان می‌دهد که میانگین مقادیر AFM1 در نمونه‌های شیر خام تابستان کمتر از زمستان بود. لوپز و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش الایزا، ۷۷ نمونه شیر را در آرژانتین در ماه‌های سپتامبر تا مارس (شیر زمستانی) مورد بررسی قرار دادند که در تمام موارد مقادیر آفلاتوکسین M1 پایین تر از حد توصیه شده برای فراورده‌های لبنی بود (۹). تحقیقات بر روی شیرهای غیربسته‌بندی در کشور آلبانی نشان داد که مقدار آفلاتوکسین M1 در شیر زمستان بیش از شیر تابستان است (۱۰). در مطالعه‌ای که با استفاده از روش TLC بر روی ۶۱ نمونه شیر (۵۲ نمونه شیر غیربسته‌بندی و هفت نمونه شیر بسته‌بندی) در ایران صورت گرفت، آلودگی شیرهای غیربسته‌بندی به آفلاتوکسین M1 برابر ۹۲/۳ درصد گزارش گردید و در همه نمونه‌های شیر بسته‌بندی نیز آلودگی دیده شد. در این مطالعه گیتی و همکاران میزان آلودگی در شیرهای غیربسته‌بندی را شش تا ده میکروگرم در لیتر و در شیرهای بسته‌بندی را یک تا پنج میکروگرم در لیتر گزارش نمودند (۱۱). در مطالعه دیگری کامکار و همکاران با استفاده از روش الایزا، آلودگی ۷۳ نمونه از شیرهای تحویلی به کارخانجات شیر بسته‌بندی به آفلاتوکسین M1 را ۸۲/۲ درصد با میانگین ۲۵۹/۵ نانوگرم در لیتر گزارش نمودند (۱۲). پورنورمحمدی و همکاران با تعیین میزان آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه مصرفی در استان کرمان نشان دادند که میزان آفلاتوکسین M۱ موجود در نمونه‌های مورد بررسی بین ۰/۰۰۲-۰/۱۴ میکروگرم بر لیتر قرار داشت که از حد مجاز توصیه شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (۰/۵ میکروگرم بر لیتر) بیشتر نبود (۱۳). البرزی و همکاران به بررسی میزان آفلاتوکسین M1 در ۶۲۴ نمونه شیر جمع‌آوری شده در شش ماهه تابستان در شیراز به روش الایزا پرداختند. در این تحقیق ۱۰۰ درصد نمونه‌ها آلوده بوده و در ۱۷/۸ درصد نمونه‌ها سطح آفلاتوکسین M1 بیش از حد استاندارد ۰/۵۰ میکروگرم بر لیتر بود (۱۴). در شهر سراب در سال ۸۴-۸۳، میزان آفلاتوکسین M1 توسط کامکار و همکاران اندازه‌گیری شد که در ۷۶ درصد کل نمونه‌ها میزان آفلاتوکسین بین ۰/۰۱۵-۰/۲۸ بود و ۴۰ درصد نمونه‌ها حاوی آفلاتوکسین M1 بیش از ۰/۵۰ میکروگرم بر لیتر بودند (۱۵).

بررسی محتویات خوراک دام، نسبت آن‌ها و مطالعات قارچ‌شناسی در این فصول نشان داد که گاوداری S۶ از نان خشک آلوده به کپک‌های آسپرژیلوس استفاده می‌کند در حالی که سه گاوداری S8،S4 و S9 حداقل مقدار آفلاتوکسین را در کلیه فصول نسبت به سایر گاوداری‌ها نشان

جدول ۵- داده‌های حاصل از مطالعات خوراک دام و آفلاتوکسین شیر سالانه در گاوداری‌های مورد مطالعه خوی در نیمه اول زمستان

ردیف	تعداد نمونه‌های شیر	تعداد نمونه‌های خوراک دام	*Aspergilus flavus*	*Aspergilus clavatus*	*Rhizopus stolonifer*	*Penicillium sp.*	*Saccharomyces cerevisiae*	Aflatoxin M ± SE µgr/L
S۱	۱۰	۱۱	+	+	+	-	-	۵/۸۰±۰/۷۵
S۲	۸	۱۳	+	+	+	-	-	۶/۱۱±۰/۳
S۳	۷	۶	+	+	+	-	+	۷/۵۰±۰/۲
S۴	۱۶	۶	+	+	+	-	-	۱/۵۶±۰/۰۱
S۵	۷	۶	+	+	+	+	-	۸/۷۸±۱/۶۲
S۶	۱۰	۹	+	+	+	-	-	۹/۹۷±۴/۱۳
S۷	۱۰	۱۶	+	+	+	-	-	۷/۵۱±۱/۶۲
S۸	۶	۱۴	+	+	+	-	+	۶/۴۷±۰/۲
S۹	۷	۳	+	+	+	+	-	۷/۳۲±۰/۳
S۱۰	۵	۳	+	+	+	+	-	۹/۷۶±۱/۶۵

علایم اختصاری: S: sample، اعداد کنار آن شماره گاوداری است، +: وجود، -: عدم وجود، SE: Standard Error، µgr/L: میکرو گرم بر لیتر.

دادند. بررسی محتویات و نسبت خوراک دام در این دو گاوداری در کلیه ماه‌ها نشان داد که آن‌ها از یک روش تغذیه‌ای استاندارد در کلیه ماه‌های آزمایش پیروی می‌کنند و این سبب کاهش مقدار آفلاتوکسین در شیر تولیدی آن‌هاست. گونه‌های *A. flavus* *R. stolonifer* و *A. clavatus* به طور مشترک در همه گاوداری‌های مورد مطالعه بر روی خوراک‌های دام یافت شد و سایر گونه‌های قارچ فقط در برخی از گاوداری‌ها و در بعضی از ماه‌ها مشاهده گردیدند (جدول‌های ۴ و۵). سالس و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه بر روی ۷۸ نمونه خوراک دام از کشورهای تایلند و ویتنام آلودگی ۹۴ درصد از نمونه‌ها را به گونه‌های *A. parasiticus* و *A. flavus* و سم آفلاتوکسین گزارش نمودند. همچنین مطالعه بر روی نمونه‌های مختلف گندم، آلودگی به قارچ *A. flavus* را نشان داد (۱۶). نتایج با مطالعات برگوفر و همکاران در استرالیا مطابقت دارد. آن‌ها در مطالعه بر روی گندم و آرد گندم مورد استفاده در خوراک دام گاوداری‌های مورد مطالعه، کپک‌های Aspergilus،Penicillium و Cladosporium را جداسازی و شناسایی نمودند (۱۷). در مطالعه‌ای بر روی دانه‌های گندم، جو و ذرت مورد استفاده در گاوداری‌های کشور کرواسی گونه *A. flavus* به عنوان عامل اصلی آلوده‌کننده گزارش شد (۱۸).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که در فصل تابستان مقدار کپک‌های آسپرژیلوس محدود و مقدار آفلاتوکسین پایین می‌آید. میزان آلودگی شیر در فصل زمستان بیشتر از سایر فصول می‌باشد که این خود می‌تواند به علت عدم در دسترس بودن علوفه تازه و همچنین استفاده از علوفه انبارشده و عدم رعایت شرایط نگهداری مناسب در انبارها باشد، ضمن این که در گاوداری‌های سنتی از رژیم غذایی استانداردی استفاده نمی‌شود. احتمال وجود آفلاتوکسین در گاوداری‌های سنتی همیشه بیشتر است و این سبب می‌شود که آفلاتوکسین تقریباً در طول سال تغییر چندانی نداشته باشد. متأسفانه به دلیل انبارداری نامناسب، عدم دسترسی به علوفه تازه به اندازه کافی، شرایط بد بازیافت و عدم نگه‌داری صحیح نان‌های خشک در هر زمانی ایجاد آلودگی می‌کند. از آنجا که منبع اصلی تأمین‌کننده شیر، گاوداری‌های سنتی و صنعتی هستند، آلودگی خوراک دام به آسپرژیلوس سبب تولید آفلاتوکسین در شیرهای بسته‌بندی هم می‌شود. نهایتاً از آن‌جا که منبع اصلی تهیه شیرهای بسته‌بندی و غیربسته‌بندی دامداری‌ها می‌باشند، پس کنترل آلودگی خوراک دام به کپک‌ها، بهترین روش برای جلوگیری از آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به آفلاتوکسین است که به بهبود سلامت جامعه کمک می‌کند. لذا لزوم بررسی علل و منابع آلودگی باید در اولویت قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

1. Frisvad J.C., P. Skouboe and R.A. Samson. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 28(5): 442-53.

2. Creppy E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.* 127(1-3): 19-28.

3. Faletto M.B. and H.L. Gurtoo. 1989. The effect of inducers of mixed-function oxidases on hepatic microsome-mediated aflatoxin B1 transformation in C3H/10T1/2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 98(2): 252-62.

4. European Commission. Commission Regulation 2001/466/EC of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance). *Off J Eur Commun.* L77: 1-13.

5. Berg T. 2003. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? *Food Control*. 14: 219-24.

6. Ismair Y. S. Ruston. 1996. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, Legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*. 59 (1): 57-67.

7. Torkar K.G. and A. Vengust. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control.* 19(6): 570-7.

8. Berghofer L.K., A.D. Hocking and D. Miskelly. 2003. Microbiology of wheat and flourmilling in Australia. *Int J Food Microbiol*. 85 (1-2): 137-149.

9. Lopez C.E., L.L. Ramos, S.S. Romadan and L.C. Bulacio. 2003. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control.* 14(1): 31-34.

10. Eaton D.L. and E.P. Gallagher. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis, *Annual review of pharmacology and toxicology*. 34: 135-72.

11. Giti K., V. Parvaneh and H. Kordi. 1982. Study of milk contamination to aflatoxin in Region Tehran. *Iranian J of Hygiene.* 1-3.

12. Kamkar A. 2002. Study on the contamination of "UHT" milks whit aflatoxin M1 in city of Tehran. *Veterinary J of Tehran Univ.* 57 (4): 5-8 (In Persian).

13. Pornourmohamadi Sh., M. Ansari and L. Nazakati Olfati. 2008. Determination of aflatoxin M1 in pasteurized milk consumed in Kerman Province. *J Kerman Univ Med Sci.* 16 (3): 271-80 (In Persian).

14. Alborzi S., B. Pourabbas, M. Rashidi and B. Astaneh. 2006. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). *Food Control*. 17(7): 582-584.

15. Kamkar A. 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control.* 16(7): 593-9.

16. Sales A.C. and T. Yoshizawa. 2005. Updated profile of aflatoxin and aspergillus section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *J of Toxicol.* 22: 429-439.

17. Berghofer L.K., A.D. Hocking and D. Miskelly. 2003. Microbiology of wheat and flourmilling in Australia. *Int J Food Micro-*

biol. 85 (1-2): 137-149.
18. Deshpande S.S. 2002. Fungal Toxins in S.S. Deshpande, Handbook of food toxicology, 387-456.
19. Ersali, A. and F. Bahaaddin Beigy. 2010. The transfer of aflatoxin from feed to milk and pasteurized milk in Shiraz and suburbs, *Journal of University of Medical Sciences and Health Sadoghi Yazd*, (3): 175-183. (In Persian).
20. Karim, G., S. Bokaeeand and A.Khorasani. 2000. The level of aflatoxin contamination of milk delivered to factories pasteurized milk Tehran M1 using ELISA, *Research and Construction*, 40: 49-55. (In Persian).
21. Pornormohamadi, Sh., M. Ansari, L. Nezakati Olfati and M. Kazemipour. 2010. Determination of Aflatoxin M1 in pasteurized milk consumption in the province of Kerman, *Kerman Medical Journal*, XVI(3): 271-280. (In Persian).
22. Taj Karimi, M., S.S. Ghaemmaghami and A. Matlabi. 2008. Quarterly review of aflatoxin M1 in raw milk of 15 Milk Industry Factory Iran (Pegah). *Research and development in cattle breeding and aquaculture,* 75: 2-9. (In Persian).
23. Gholipour, M., L. Karimzadeh, F. Ali Nia and Z. Babaei. 2012. The measurement of aflatoxin M1 in milk factory in Mazandaran province in the first half of 1390, *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences,* 22(93): 39-46. (In Persian).
24. Hazhir, M.S., N. Sanobar Tahaei, K. Rashidi, R. Rezaei and H. Sheikhi. 2009. The amount of aflatoxin M1 in raw milk delivered to milk pasteurization factory in Sanandaj, *Kurdistan University of Medical Sciences Journal,* XIII: 44-50. (In Persian).