

Seasonal Variation of Aflatoxin M1 Contamination in Raw, Pasteurized and School Milk in Shahrood, Iran

Khalilollah Moeinian¹,
Tayyabeh Rastgoo²

¹ Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Damghan Faculty of Health, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

² BSc Environmental Health Engineering, Damghan Faculty of Health, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, and MSc Student in Environmental Engineering, Faculty of Environment and Energy, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received July 12, 2014 ; Accepted November 22, 2014)

Abstract

Background and purpose: Aflatoxin M1 is a toxic compound that is placed in class IIB (carcinogenic) by the WHO- International Agency for Research on Cancer, so its monitoring in milk is a great public health issue. The purpose of this study was to determine the concentration of aflatoxin M1 in raw, pasteurized milk and samples of milk produced for school milk project in Shahrood, Iran.

Materials and methods: In this descriptive-analytical study, 130 raw milk samples were collected from 4 collection centers and 14 production sites. Also, samples of 28 pasteurized milk from 3 producing company and 13 samples prepared for school milk project (in autumn and winter) from two brands were collected in summer and winter and analyzed by HPLC-fluorescence following immunoaffinity purification.

Results: In samples of raw milk the mean concentration of Aflatoxin M1 in summer and winter were 110.3 ± 137.5 and 24.8 ± 36.5 ng/kg, respectively. In summer and winter the level of Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk and school milk were 52.1 ± 36.6 , 16.8 ± 13.0 , 28.1 ± 14.8 , and 32.5 ± 171 ng/kg, respectively. In all samples significant differences were observed between seasons. The minimum and maximum levels of aflatoxin M1 in raw milk were determined zero (undetectable) in winter and 743 ng/kg in summer, respectively.

Conclusion: Significant differences in the mean concentration of aflatoxin M1 in studied seasons, indicates the necessity for appropriate monitoring on animal food in summer and winter and more controlling measurements in summer on type, processing and storage of animal food.

Keywords: raw milk, pasteurized milk, School milk, Aflatoxin M1

به طیف گسترده افراد مصرف کننده و مقدار مصرف شیر و محصولات آن، توجه به کیفیت بهداشتی آن از نظر آفلاتوکسین M1 امری ضروری است که در سال‌های اخیر به طور جدی مورد توجه جهانی قرار گرفته و در بسیاری از کشورهای جهان برای آن استانداردهای مشخص تدوین شده است. حداکثر غلظت مجاز آفلاتوکسین M1 در شیر خام در ایالات متحده آمریکا ۵۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم (۱۶) و بر اساس مقررات اتحادیه اروپا ۵۰ نانوگرم در کیلوگرم برای بزرگسالان و ۲۵ نانوگرم در کیلوگرم برای کودکان (۱۷، ۱۶، ۳) تعیین شده است. استاندارد قبلی ایران در مورد آفلاتوکسین M1 شیر خام ۵۰۰ نانوگرم در کیلوگرم بوده است (۱۸) اما در بازنگری انجام شده در سال ۱۳۸۹ به ۱۰۰ نانوگرم در کیلوگرم کاهش یافته است (۱۹). در مورد مقدار آفلاتوکسین M1 در انواع شیر و محصولات لبنی، مطالعات زیادی در سطح جهان (۲۹-۲۰) و ایران (۱۳-۱۱، ۳۳-۳۰) انجام شده است. شهرستان شاهرود با ارتفاعی معادل ۱۳۸۰ متر از سطح دریا، در شمال شرقی استان سمنان و در حد فاصل دو نوع آب و هوای خشک و کویری در جنوب، و مرطوب و پرباران در شمال قرار گرفته است و آب و هوایی معتدل (متوسط درجه حرارت سالانه ی ۱۴ درجه سانتی گراد و میانگین بارندگی ۱۸۰ میلی‌متر در سال) دارد. با توجه به شرایط جغرافیایی مذکور، هم امکان پرورش دام و تولید شیر در شاهرود و هم شرایط رشد و تکثیر قارچ‌ها از نظر دما و رطوبت مهیا است. تا کنون در مورد غلظت آفلاتوکسین M1 شیر در محل‌های تولید شیر در شهرستان شاهرود اطلاعاتی منتشر نشده است. این مطالعه برای اولین بار با هدف تعیین مقدار آفلاتوکسین M1 در شیر خام، پاستوریزه و شیر مدارس بر حسب محل تولید و نیز بررسی تاثیر فصل در غلظت آن در شهرستان شاهرود طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی-تحلیلی در شهرستان شاهرود

محدودی از آن‌ها خطرات بهداشتی دارند که آفلاتوکسین‌ها شناخته شده‌ترین آن‌ها هستند (۱). آفلاتوکسین‌ها، متابولیت‌های ثانویه قارچ‌های رشته‌ای عمدتاً آسپرژیلوس‌ها بوده و با برخی از سرطان‌ها به خصوص سرطان کبد، جهش‌زایی، تاثیر بر سیستم ایمنی و مسمومیت حاد و مزمن ارتباط دارند (۲). آفلاتوکسین‌های M1 و M2 به ترتیب متابولیت‌های هیدروکسیله شده آفلاتوکسین‌های B1 و B2 هستند. آفلاتوکسین‌های B1 و M1 توسط آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان به ترتیب در کلاس 1 و IIB طبقه‌بندی شده‌اند (۴، ۳). آفلاتوکسین‌های M1 ترکیبات پایداری هستند که هیچ کدام از فرایندهای ذخیره، نگهداری شیر و فرآیندهایی مانند پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون نمی‌توانند آن را تخریب نمایند (۵، ۳، ۲). آفلاتوکسین M1 در شیر حیواناتی که مواد غذایی آلوده به قارچ‌های آسپرژیلوس مصرف کردند، یافت می‌شود (۶-۱۰). رشد قارچ‌های رشته‌ای که منجر به تولید آفلاتوکسین‌ها می‌گردد به عوامل متعددی از جمله شرایط تولید، فرآوری و نگهداری خوراک دام و نیز شرایط مناسب رشد قارچ‌ها از جمله رطوبت و دمای مناسب بستگی دارد (۱۳-۱۱) بنابراین تابع شرایط محل تولید شیر (نوع خوراک دام مصرفی، فرآوری و نگهداری آن)، شرایط جغرافیایی و فصل است. از آنجایی که شیر و مواد لبنی حاصل از آن مواد غذایی بسیار مفیدی هستند که تعداد زیادی از مواد مغذی و ضروری بدن را تامین نموده و در حفظ سلامتی افراد تاثیر بسزایی دارند، لذا بر مصرف آن توسط تمامی گروه‌های سنی به خصوص کودکان و نوجوانان، مادران و افراد مسن تاکید می‌شود. توجه به این نکته نیز ضروری است که مصرف شیر در کودکان در مقایسه با دیگر گروه‌های سنی بالاتر بوده و حتی در شیرخواران تنها غذای کودک می‌باشد. با افزایش مصرف شیر و محصولات لبنی خطر مواجهه با آفلاتوکسین M1 و میزان دریافت آن توسط افراد و بروز آثار بهداشتی آن بر مصرف کننده گان افزایش می‌یابد (۱۵-۱۳). با توجه

استان سمنان اجرا گردید. نمونه های شیر خام از ۴ مرکز جمع آوری و ۱۴ محل تولید و نمونه های شیر پاستوریزه و نیز شیر مدارس از ۳ شرکت شهرستان (دو برند)، در دو فصل تابستان و زمستان (برای شیر مدارس در پاییز و زمستان) جمع آوری شد. برآورد تعداد نمونه با توجه به نتایج مطالعات مشابه در ایران و بر اساس وضعیت آلودگی آفلاتوکسین و حدود اطمینان مورد نیاز انجام گردید. به طور کلی از هر محل تولید شیر خام، هر محل تولید شیر پاستوریزه و هر نوع شیر مدارس ۱۰ نمونه و در مجموع ۱۷۱ نمونه بر اساس روش استاندارد ملی نمونه برداری شد. برای نمونه برداری از شیر خام، به طور مستقیم از تانکر حامل شیر خام مورد نظر ۲ لیتر شیر برداشت شد و از این ۲ لیتر شیر، ۲ نمونه در دو ظرف نمونه برداری 50°C (فالكون) تهیه و در فریزر -20° درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس تمامی نمونه ها به صورت یخ زده به آزمایشگاه فاروق در تهران منتقل شدند. برای نمونه برداری از شیر پاستوریزه و شیر مدارس نیز با هماهنگی مسئولین مربوطه به محل تولید و توزیع مراجعه شد و اقدام به نمونه برداری شد. برای اندازه گیری غلظت آفلاتوکسین MI بر اساس استاندارد شماره ۷۱۳۳ سازمان ملی استاندارد، از ستون ایمنوافینیتی و روش High-performance liquid chromatography (HPLC) استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا نمونه شیر با استفاده از حمام آب تا دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد گرم و از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت گردشی ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و چربی آن جدا گردید. نمونه شیر بدون چربی آماده شده، به ستون ایمنوافینیتی تزریق و نمونه خالص به دست آمده از ستون به دستگاه کالیبره شده با نمونه های استاندارد، وارد و غلظت آفلاتوکسین MI نمونه شیر تعیین گردید. برای انجام آزمایش ها از دستگاه Alliance 2695 Separation Modules, HPLC (Waters, U.S.A model 474)، دکتور فلوروسنس (Sanning Fluorescence Detector, Waters, U.S.A

ستون جداسازی Chromolith و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد. به عنوان فاز متحرک از acetonitrile water/methanol/ با نسبت حجمی ۶۰/۳۰/۲۰ میلی لیتر و با دبی ۲/۵ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شده و آفلاتوکسین MI در طول موج های ۳۶۵ نانومتر (excitation) و ۴۶۵ نانومتر (emission) اندازه گیری گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون، از محلول استاندارد ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر آفلاتوکسین MI برای ساخت محلول های با غلظت های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱/۰، ۲/۰، ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵ و ۱۰/۰ نانوگرم در میلی لیتر استفاده شد این غلظت ها به دستگاه تزریق و با توجه به سطح زیر منحنی، معادله رگرسیون و خطی بودن آن تعیین گردید. بر اساس نسبت signal/noise برابر با ۳، مقدار LOD (Limit Of Detection) معادل ۳ نانوگرم در کیلوگرم و بر اساس نسبت signal/noise برابر با ۱۰، مقدار LOQ (Limit Of Quantification) معادل ۱۰ نانوگرم در کیلوگرم تعیین شد. برای اعتبار سنجی روش HPLC مورد استفاده، نمونه های اسپایک شده با غلظت های ۲۰ و ۳۰ نانوگرم در کیلوگرم، هر کدام در ۵ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت و ریکواری و ضریب تغییرات آن محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل داده ها نیز با استفاده از شاخص های مرکزی، پراکندگی، آزمون های دقیق فیشر و کای اسکوتر انجام شده است.

یافته ها

در هر ده سری از آزمایش نمونه ها، معادله منحنی کالیبراسیون و خطی بودن آن تعیین گردید که به عنوان نمونه در اولین سری آزمایش، معادله خط به صورت $y = 6E + 0.6x - 12280$ و $R^2 = 0.997$ به دست آمد و نتایج تکرارهای بعدی نیز بسیار نزدیک به مقادیر فوق بوده است. در اعتبار سنجی روش HPLC مورد استفاده و در ۵ تکرار اندازه گیری برای ۳۰ نانوگرم در کیلوگرم، ریکواری ۸۱/۷۲ درصد و ضریب تغییرات ۸/۸۱ درصد

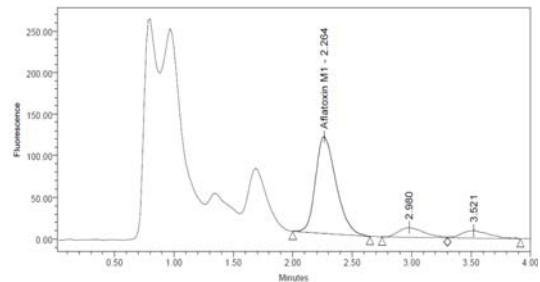
M1 در نمونه‌های شیر خام، پاستوریزه و مدارس به ترتیب برابر با $114/6 \pm 73/8$ ، $37/0 \pm 8/4$ و $29/5 \pm 16/9$ نانوگرم در کیلوگرم بود. هم‌چنین مینیمم و ماکزیمم غلظت آفلاتوکسین M1 شیر خام، پاستوریزه و مدارس به ترتیب برابر با صفر و 5 ، 743 و 142 و 11 و 55 نانوگرم در کیلوگرم بود.

جدول شماره ۱ توزیع غلظت آفلاتوکسین M1 شیر خام، پاستوریزه و مدارس به تفکیک مرکز جمع‌آوری، محل تولید و فصل را نشان می‌دهد. کم‌ترین مقدار آفلاتوکسین M1 برابر صفر (کم‌تر از حد تشخیص) و مربوط به فصل زمستان و بیش‌ترین مقدار آفلاتوکسین M1 مشاهده شده (743 نانوگرم در کیلوگرم) مربوط به فصل تابستان و مرکز جمع‌آوری A و محل تولید با کد ۴ می‌باشد. با کیفیت‌ترین شیر از نظر غلظت آفلاتوکسین M1 مربوط به محل تولید با کد ۹ از مرکز جمع‌آوری C با میانگین $7/0$ ، انحراف معیار $9/1$ ، مینیمم صفر و ماکزیمم 24 نانوگرم در کیلوگرم و بی‌کیفیت‌ترین شیر از نظر غلظت آفلاتوکسین M1 مربوط به محل تولید با کد ۵ از مرکز جمع‌آوری A با میانگین $318/6$ ، انحراف معیار $254/5$ ، مینیمم 11 و ماکزیمم 743 نانوگرم در کیلوگرم بوده است.

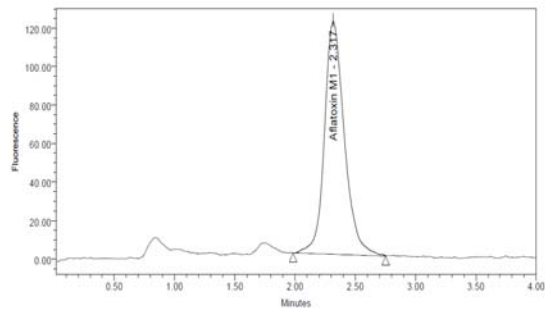
درصد فراوانی نمونه‌های آلوده به آفلاتوکسین M1 به تفکیک فصل، نوع شیر و مرکز تولید در جدول شماره ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، آلودگی نمونه‌های شیر خام به آفلاتوکسین M1 در تابستان بیش‌تر از زمستان و به ترتیب برابر $98/53$ و $80/66$ درصد و به‌طور کلی (در دو فصل) 90 درصد بوده است. این در حالی است که درصد آلودگی به آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر پاستوریزه و مدارس در تابستان و زمستان برابر و 100 درصد بوده است که در مورد هر نوع شیر درصد بالایی را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۳ نیز توزیع فراوانی غلظت آفلاتوکسین M1 شیر خام، پاستوریزه و مدارس را بر اساس استانداردهای دو کشور ایران و اتحادیه اروپا نشان

و در ۵ تکرار اندازه‌گیری برای 20 نانوگرم در کیلوگرم، ریکآوری $84/60$ درصد و ضریب تغییرات $16/59$ درصد مشاهده گردید. نمودار شماره ۱ یک مورد از کروماتوگرام نمونه‌ی استاندارد (الف) و یک نمونه مجهول (ب) را نشان می‌دهد.



| Peak Results | | | | | |
|----------------|-------|---------|--------|--------|-------|
| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
| 1 Aflatoxin M1 | 2.264 | 1401040 | 115049 | | |



| Peak Results | | | | | |
|----------------|-------|---------|--------|--------|-------|
| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
| 1 Aflatoxin M1 | 2.317 | 1384225 | 121275 | | |

نمودار شماره ۱: کروماتوگرام نمونه استاندارد (الف) و نمونه ی مجهول (ب)

در این مطالعه 130 نمونه شیر خام (68 نمونه در تابستان و 62 نمونه در زمستان) از مراکز جمع‌آوری شیر خام شهرستان شاهرود (شامل ۴ مرکز جمع‌آوری با کدهای A، B و C، D و 13 محل تولید با کدهای ۱ تا 13)، 28 نمونه شیر پاستوریزه (از ۳ محل تولید با کدهای E، F و G و 13 نمونه شیر مدارس (از دو شرکت شیر پاستوریزه با کدهای H و I) در دو نوبت تابستان و زمستان جمع‌آوری و آزمایش شده است. به‌طور کلی 91 درصد از نمونه‌های شیر خام و 100 درصد نمونه‌های شیر پاستوریزه و مدارس، آلوده به آفلاتوکسین M1 بودند. میانگین کلی و انحراف معیار غلظت آفلاتوکسین

جدول شماره ۱: غلظت آفلاتوکسین M1 در انواع شیر به تفکیک نوع شیر، محل تولید، مرکز جمع آوری و فصل

| نوع شیر | محل تولید و مرکز جمع آوری | فصل | | | | | | | | | |
|----------|---------------------------|-------------|---------|--------------|-------|--------|-------------|---------|--------------|-------|--------|
| | | تابستان | | | | | زمستان | | | | |
| | | تعداد نمونه | میانگین | انحراف معیار | کمینه | بیشینه | تعداد نمونه | میانگین | انحراف معیار | کمینه | بیشینه |
| خام | مرکز A | ۴ | ۱۰۰/۳ | ۴۷/۸ | ۶۵ | ۱۷۰ | ۴ | ۱۶/۰ | ۳/۷ | ۱۱ | ۲۰ |
| | مرکز B | ۵ | ۸۰/۲ | ۴۹/۲ | ۴۹ | ۱۶۷ | ۵ | ۷/۴ | ۲/۳ | ۵ | ۱۱ |
| | مرکز C | ۵ | ۵۴/۰ | ۷/۸ | ۴۵ | ۶۲ | ۵ | ۹/۰ | ۴/۰ | ۴ | ۱۴ |
| | مرکز D | ۵ | ۵۳۳/۲ | ۱۵۹/۸ | ۳۴۸ | ۷۴۳ | ۵ | ۱۰۴/۰ | ۷۱/۵ | ۱۱ | ۲۰۸ |
| | مرکز E | ۵ | ۹۲/۸ | ۵۲/۸ | ۴۱ | ۱۵۹ | ۵ | ۱۱/۲ | ۲/۴ | ۷ | ۱۳ |
| | مرکز F | ۵ | ۷۷/۲ | ۲۰/۴ | ۵۸ | ۱۰۰ | ۵ | ۱۰/۲ | ۶/۱ | ۱۰ | ۱۵ |
| | مرکز G | ۵ | ۱۵۱/۰ | ۸۶/۹ | ۲۷۲ | ۲۷۲ | ۵ | ۲۸/۶ | ۲۸/۶ | ۵ | ۶۸ |
| | مرکز H | ۳۴ | ۱۵۷/۱ | ۱۷۵/۶ | ۷۴۳ | ۷۴۳ | ۳۴ | ۳۳/۲ | ۳۳/۲ | ۲۰۸ | ۲۰۸ |
| | مرکز I | ۵ | ۴۴/۰ | ۹/۸ | ۳۴ | ۶۰ | ۵ | ۷/۲ | ۱۰/۰ | ۵ | ۲۰ |
| | مرکز J | ۵ | ۷۵/۶ | ۲۲/۲ | ۵۴ | ۱۰۲ | ۴ | ۹/۲ | ۱۳/۰ | ۹ | ۲۰ |
| | مرکز K | ۵ | ۸۰ | ۶/۷ | غ | ۱۶ | ۴ | ۱۲/۰ | ۶/۰ | ۴ | ۲۴ |
| | مرکز L | ۵ | ۱۵۴/۶ | ۵۱/۶ | ۱۰۸ | ۲۳۳ | ۵ | ۲۰/۱ | ۱۴/۰ | ۵ | ۴۸ |
| | مدارس | مرکز M | ۱۴ | ۸۴/۵ | ۶۸/۶ | غ | ۲۳۳ | ۱۳ | ۱۷/۹ | ۱۹/۳ | ۷۵ |
| مرکز N | | ۵ | ۶۹/۸ | ۱۶/۱ | ۵۳ | ۸۹ | ۵ | ۴/۴ | ۴/۰ | ۱۰ | ۱۱ |
| مرکز O | | ۵ | ۲۰/۴ | ۳/۵ | ۱۶ | ۲۵ | ۵ | ۴/۲ | ۵/۴ | ۱۰ | ۱۱ |
| مرکز P | | ۵ | ۴۰/۰ | ۴/۳ | ۳۷ | ۴۵ | - | - | - | - | - |
| مرکز Q | | ۱۵ | ۴۲/۹ | ۲۳/۰ | ۱۶ | ۸۹ | ۱۰ | ۶/۷ | ۳/۱ | ۳ | ۳ |
| کل مراکز | | ۶۸ | ۱۱۰/۳ | ۱۳۷/۵ | غ | ۷۴۳ | ۶۲ | ۲۴/۸ | ۳۶/۵ | ۲۰۸ | ۲۰۸ |
| مرکز R | | ۴ | ۶۸/۰ | ۸/۵ | ۵۹ | ۷۹ | ۵ | ۱۲/۲ | ۵/۴ | ۵ | ۱۹ |
| مرکز S | | ۵ | ۶۱/۰ | ۵۳/۰ | ۱۰ | ۱۴۲ | ۴ | ۲۴/۰ | ۸/۸ | ۱۷ | ۳۶ |
| مرکز T | | ۵ | ۴۴/۸ | ۱۸/۵ | ۳۰ | ۷۴ | ۵ | ۱۵/۶ | ۵/۲ | ۱۱ | ۲۴ |
| کل | | ۱۴ | ۵۲/۱ | ۳۶/۶ | ۱۰ | ۱۴۲ | ۱۴ | ۱۶/۸ | ۱۳/۰ | ۵ | ۳۶ |
| مرکز U | | ۴ | ۱۹/۵ | ۱۱/۹ | ۱۱ | ۳۷ | - | - | - | - | - |
| مرکز V | | ۵ | ۳۹/۵ | ۱۴/۱ | ۲۸ | ۵۵ | ۴ | ۳۲/۵ | ۱۷/۱ | ۱۶ | ۵۴ |
| کل | | ۹ | ۲۸/۱ | ۱۴/۸ | ۱۱ | ۵۵ | ۴ | ۳۲/۵ | ۱۷/۱ | ۱۶ | ۵۴ |

غ = غیر قابل تشخیص

نمونه برداری از شیر مدارس در فصل های پائیز و زمستان انجام شده است.

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی غلظت آفلاتوکسین M1 بر مبنای استاندارد کشور ایران و اتحادیه اروپا (۱۰۰ و ۵۰ نانوگرم در کیلوگرم)

| نوع شیر | استاندارد | فصل | | |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| | | تابستان | زمستان | کل |
| | | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) |
| خام | ≤ ۱۰۰ | ۵۰ (۷۳/۵) | ۶۰ (۹۶/۸) | ۱۱۰ (۸۴/۶) |
| | > ۱۰۰ | ۱۸ (۲۶/۵) | ۲ (۳/۲) | ۲۰ (۱۵/۴) |
| | ≤ ۵۰ | ۲۳ (۳۳/۸) | ۵۵ (۸۸/۷) | ۷۸ (۶۰/۰) |
| | > ۵۰ | ۴۵ (۶۶/۲) | ۷ (۱۱/۳) | ۵۲ (۴۰/۰) |
| پاستوریزه | ≤ ۱۰۰ | ۱۳ (۹۲/۹) | ۱۴ (۱۰۰) | ۲۷ (۹۶/۴) |
| | > ۱۰۰ | ۱ (۷/۱) | ۰ (۰) | ۱ (۳/۶) |
| | ≤ ۵۰ | ۶ (۴۲/۹) | ۱۴ (۱۰۰) | ۲۰ (۷۱/۴) |
| | > ۵۰ | ۸ (۵۷/۱) | ۰ (۰) | ۸ (۲۸/۶) |
| مدارس | ≤ ۱۰۰ | ۱۴ (۱۰۰) | ۱۴ (۱۰۰) | ۲۸ (۱۰۰) |
| | > ۱۰۰ | ۰ (۰) | ۰ (۰) | ۰ (۰) |
| | ≤ ۵۰ | ۸ (۸۸/۹) | ۳ (۷۵/۰) | ۱۱ (۸۴/۶) |
| | > ۵۰ | ۱ (۱۱/۱) | ۱ (۲۵/۰) | ۲ (۱۵/۴) |

نمونه برداری از شیر مدارس در فصل های پائیز و زمستان انجام شده است

جدول شماره ۴: فراوانی نمونه های آلوده به آفلاتوکسین M1 به تفکیک نوع شیر، مرکز جمع آوری و فصل

| نوع شیر | مرکز جمع آوری | تابستان | زمستان | کل |
|--------------|-------------------|---------|--------|-------|
| خام | A | ۱۰۰/۰ | ۹۴/۱۲ | ۹۷/۰۷ |
| | B | ۱۰۰/۰ | ۸۰/۰ | ۹۰/۰ |
| | C | ۹۲/۸۶ | ۵۳/۸۵ | ۷۴/۰۷ |
| | D | ۱۰۰/۰ | ۷۰/۰ | ۸۸/۰ |
| پاستوریزه | کل مراکز جمع آوری | ۹۸/۵۳ | ۸۰/۶۶ | ۹۰/۰ |
| | E | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ |
| | F | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ |
| | G | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ |
| مدارس | کل شیر پاستوریزه | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ |
| | H | ۱۰۰/۰ | - | ۱۰۰/۰ |
| | I | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ |
| کل شیر مدارس | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ | |

نمونه برداری از شیر مدارس در فصل های پائیز و زمستان انجام شده است.

پاستوریزه بالاتر از استاندارد (غیر قابل مصرف) و در تمامی نمونه های شیر مدارس کم تر از استاندارد به دست آمده است. اگر استاندارد اتحادیه اروپا که با هدف حفاظت

می دهد. براساس استاندارد جدید ایران (۱۰۰ نانوگرم در کیلوگرم)، غلظت آفلاتوکسین M1 در ۱۵/۴ درصد از نمونه های شیر خام و ۳/۶ درصد از نمونه های شیر

بیش تر از سلامت مصرف کنندگان، سخت گیرانه تر از استاندارد ایران و برابر با ۵۰ نانوگرم در کیلوگرم است، مبنای قرار داده شود، ۴۰ درصد از نمونه‌های شیر خام، ۲۸/۶ درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه و ۱۵/۴ درصد از نمونه‌های شیر مدارس از استاندارد مذکور فراتر بوده و قابل مصرف نیستند. در تمامی موارد، درصد نمونه‌هایی که از حد استاندارد بالاتر بوده‌اند همواره در تابستان بیش تر از زمستان بوده است.

بحث

در این مطالعه ۹۱/۰ درصد نمونه‌های شیر خام و ۱۰۰ درصد نمونه‌های شیر پاستوریزه و مدارس به آفلاتوکسین M1 آلوده بوده‌اند که نشان دهنده آلودگی درصد بالایی از نمونه‌ها به آفلاتوکسین M1 می‌باشد. در سایر مطالعات انجام شده درصد آلودگی در نمونه‌های شیر خام مقادیر: ۷۳/۶ درصد (۱)، ۷۶/۶ درصد (۱۲)، ۸۳ درصد (۲۵)، ۸۸ درصد (۳۴)، ۹۵ درصد (۲۱) و ۱۰۰ درصد (۲۳، ۳۰، ۳۳) گزارش شده است. آلودگی شیرهای پاستوریزه به آفلاتوکسین M1 در مطالعات مختلف با مقادیر متفاوت مانند: ۶۸ درصد (۱)، ۷۱/۵ درصد (۱۳)، ۸۷ درصد (۲۵)، ۹۶/۲ درصد (۳) و ۱۰۰ درصد (۲۱، ۳۰) گزارش شده است. تفاوت در درصد آلودگی را می‌توان به عواملی مانند موقعیت جغرافیایی و متوسط دما، رطوبت، نوع خوراک دام و روش فرآوری نسبت داد.

در مطالعه حاضر کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار آفلاتوکسین M1 مشاهده شده در شیر خام به ترتیب برابر صفر و ۷۴۳ نانوگرم در کیلوگرم تعیین شده است که محدوده زیادی را در بر می‌گیرد و بیش‌ترین مقدار آن بیش از ۷ برابر استاندارد ایران می‌باشد. بیش‌ترین مقدار گزارش شده آفلاتوکسین M1 (۷۴۳ نانوگرم در کیلوگرم) مربوط به یک محل تولید با کد ۴ و بیش‌ترین میانگین مشاهده شده (۹۳/۲ نانوگرم در کیلوگرم) مربوط به مرکز جمع‌آوری A (که محل تولید با کد ۴ نیز در همین مرکز قرار دارد) می‌باشد بنابراین با نظارت

و مداخله در فرایندهای تولید در این محل می‌توان هم بیش‌ترین مقدار آفلاتوکسین M1 (بیش‌ترین مقدار بعدی مشاهده شده برابر ۲۷۲ نانوگرم در کیلوگرم) و هم میانگین کلی را به شدت کاهش داد. به طور کلی با شناسایی محل‌های تولیدی که غلظت آفلاتوکسین M1 آن‌ها زیاد می‌باشد (محل‌های تولید با کد ۴، ۷ و ۱۰) و با اعمال مداخله‌های مناسب می‌توان میانگین کلی غلظت آفلاتوکسین M1 شیر خام شهرستان را بهبود بخشید. در مطالعاتی که توسط محققان دیگر انجام شده است گستره و میانگین غلظت آفلاتوکسین M1 شیر خام به ترتیب مقادیر متفاوتی مانند ۳ تا ۱۲۶ و ۶۰ نانوگرم در کیلوگرم (۱)، ۲ تا ۷۹۴ و ۱۱۰ نانوگرم در کیلوگرم (۳۴) و ۲۰ تا ۶۹۰ و ۱۴۳ نانوگرم در کیلوگرم (۲۱) گزارش شده است. هم‌چنین در این بررسی مینیمم و ماکزیمم غلظت آفلاتوکسین M1 شیر پاستوریزه و مدارس به ترتیب برابر با ۵ و ۱۴۲؛ و ۱۱ و ۵۵ نانوگرم در کیلوگرم و هم‌چنین میانگین آن‌ها به ترتیب برابر ۳۷/۰ و ۲۹/۵ نانوگرم در کیلوگرم به دست آمده است. در مطالعات دیگران بر روی شیر پاستوریزه، گستره و میانگین غلظت آفلاتوکسین M1 به ترتیب مقادیر ۳-۸۴ و ۳۰ نانوگرم در کیلوگرم (۱)، ۵۲۸-۶ و ۷۳/۸ نانوگرم در کیلوگرم (۱۳)، ۱۲۶-۱۹ و ۷۴/۹ نانوگرم در کیلوگرم (۳۰) و ۷۶۵-۸ و ۴۹۲ نانوگرم در کیلوگرم (۲۱) گزارش شده است. در این مطالعه آزمون‌های آماری نشان داده‌اند که میانگین آفلاتوکسین M1 شیر خام و پاستوریزه برای هر محل تولید، هر مرکز جمع‌آوری و کل شهرستان، در فصل تابستان از زمستان بیش‌تر بوده و تفاوت میانگین‌ها معنی‌دار بوده است. این تفاوت‌های اشاره شده نشان دهنده تاثیر فصل بر کیفیت خوراک دام و غلظت آفلاتوکسین در شیر می‌باشد که علت آن می‌تواند هم افزایش دما در تابستان و افزایش فعالیت قارچ‌ها و هم تفاوت نوع و کیفیت خوراک دام در دو فصل باشد. براساس مطالعات دیگران در مورد تاثیر فصل بر غلظت آفلاتوکسین M1 شیر، عموماً میانگین غلظت

آفلاتوکسین M1 در زمستان بیش تر از تابستان بوده و در برخی موارد این تفاوت معنی دار (۳۳،۲۳،۱۲،۷،۶) و در مواردی نیز تفاوت مشاهده شده معنی دار نبوده است (۳۵). به نظر می آید علت تفاوت آن است که در شهرستان مورد مطالعه تاثیر افزایش دما از زمستان به تابستان بر فعالیت قارچ ها بیش از تغییر در خوراک دام می باشد.

غلظت آفلاتوکسین M1 در شیر خام در ۲۶/۵ درصد از نمونه های تابستان، ۳/۲ درصد از نمونه های زمستان و ۱۵/۴ درصد از تمام نمونه های شیر خام از استاندارد ایران (۱۰۰ نانوگرم در کیلوگرم) بیش تر بوده است. وقتی استاندارد اتحادیه اروپا (۵۰ نانوگرم در کیلوگرم) مبنا قرار داده شود ۶۶/۲ درصد از نمونه های تابستان، ۱۱/۳ درصد از نمونه های زمستان و ۴۰/۰ درصد از تمام نمونه های شیر خام از استاندارد اتحادیه اروپا فراتر بوده اند. غلظت آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه در ۷/۱ درصد از نمونه های تابستان، صفر درصد از نمونه های زمستان و ۳/۶ درصد از تمام نمونه های شیر خام از استاندارد ایران بیشتر بوده است اما وقتی استاندارد اتحادیه اروپا مبنا قرار داده شود ۵۷/۱ درصد از نمونه های تابستان، صفر درصد از نمونه های زمستان و ۲۸/۶ درصد از تمام نمونه های شیر خام از استاندارد اتحادیه اروپا فراتر بوده اند. خوشبختانه غلظت آفلاتوکسین M1 شیر مدارس در هیچ نمونه ای از استاندارد ایران بیش تر نبوده است لکن وقتی استاندارد اتحادیه اروپا مبنا قرار داده شود ۱۱/۱ درصد از نمونه های تابستان، ۲۵/۰ درصد از نمونه های زمستان و ۱۵/۴ درصد از تمام نمونه های شیر مدارس از استاندارد اتحادیه اروپا فراتر بوده اند که نشان می دهد شیر مدارس بهترین وضعیت را داراست. همان گونه که قبلا نیز بیان گردید با مشخص بودن محل های تولیدی که غلظت آفلاتوکسین M1 آن ها زیاد می باشد (مثلا محل های تولید شیر خام با کد ۴، ۷ و ۱۰) و با اعمال مداخله های مناسب می توان میانگین کلی غلظت آفلاتوکسین M1 شیر خام، پاستوریزه و مدارس شهرستان را بهبود بخشیده

و میزان آن را به کم تر از استاندارد ایران و یا حتی اتحادیه اروپا کاهش داد (جدول شماره ۲).

باتوجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، نظارت و پایش خوراک دام و غلظت آفلاتوکسین M1 در تابستان از اهمیت بیش تری دارد و البته توجه به این نکته نیز ضروری است که این مطالعه در شهرستانی در مرکز ایران و با آب و هوای گرم و خشک صورت گرفته است که تفاوت فصل تابستان و زمستان بیش از آن که به میزان رطوبت مربوط باشد به درجه حرارت مربوط است که از این نظر شرایط مساعدتری برای رشد قارچ ها در تابستان فراهم می باشد. به طور کلی تفاوت غلظت آفلاتوکسین M1 در محل های تولید نشان می دهد که نوع خوراک دام، فراوری و نگهداری آن ها اهمیت زیادی دارد و پایش و کنترل محل های تولیدی که غلظت آفلاتوکسین M1 شیر آن ها بیش تر است می تواند به کاهش میانگین کلی و حذف غلظت های فراتر از استاندارد ایران و اتحادیه اروپا منجر گردد. با توجه به مطالبی که بیان گردید و با عنایت به نتایج به دست آمده از این مطالعه، از آن جایی که تفاوت غلظت آفلاتوکسین M1 بین فصل تابستان و زمستان معنی دار بوده است پیشنهاد می گردد کیفیت خوراک دام از نظر نوع، فراوری و میزان آلودگی به قارچ و آفلاتوکسین M1 در دو فصل مورد بررسی قرار گرفته و متناسب با آن اقدامات لازم به منظور بهبود کیفیت خوراک دام و نیز پیشگیری از افزایش شدت آلودگی شیر، شناسایی و اجرایی گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۲۵۴ میباشد که با حمایت مالی معاونت محترم دارو و غذای دانشگاه علوم پزشکی سمنان و وزارت متبوع و همچنین معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را اعلام می نمایند.

References

1. Elkak A, Abbas M, Oula EA. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. *Food Control* 2011; 22(12): 1856-1858.
2. Zheng N, Sun P, Wang JQ, Zhen YP, Han RW, Xu XM. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control* 2013; 29(1): 198-201.
3. Wang Y, Liu X, Xiao C, Wang Z, Wang J, Xiao H, et al. HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control* 2012; 28(1): 131-134.
4. El Khoury A, Atoui A, Yaghi J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control* 2011; 22(10): 1695-1699.
5. Ortiz-Martinez R, Valdivia-Flores A, DeLuna-Lopez MC, Quezada-Tristan T, Martinez-DeAnda A. Aflatoxin M1 contamination in raw milk: An early exposure to a carcinogenic compound. *Toxicology Letters* 2011; 205(Suppl): S266.
6. Asi MR, Iqbal SZ, Ariño A, Hussain A. Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control* 2012; 25(1): 34-38.
7. Bilandžić N, Varenina I, Solomun B. Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control* 2010; 21(9): 1279-1281.
8. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127(1-3): 19-28.
9. Decastelli L, Lai J, Gramaglia M, Monaco A, Nachtmann C, Oldano F, et al. Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control* 2007; 18(10): 1263-1266.
10. Moeenian K, Yaghmaeian K, Ghorbani R. Aflatoxin M1 concentration in raw milk produced in the cities of Semnan province-Iran. *Koomesh* 2014; 15(2): 176-181.
11. Heshmati A, Milani JM. Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. *Food Control* 2010; 21(1): 19-22.
12. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 2005; 16(7): 593-599.
13. Fallah AA. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 988-991.
14. Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 2009; 20(7): 655-657.
15. Kabak B, Ozbey F. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model *Food Control* 2012; 28(2): 338-344.
16. Nuryono N, Agus A, Wedhastri S, Maryudani YB, Sigit.Setyabudi FMC, Böhm J, et al. A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control* 2009; 20(8): 721-724.
17. Marnissi BE, Belkhou R, Morgavi DP, Bennani L, Boudra H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(8): 2819-2821.
18. ISIRI. Mycotoxins maximum permissible

-
- level in food and feed. Standard number 5925. Tehran- Iran: Institute of Standard and Industrial Research of Iran 2001.
19. ISIRI. Mycotoxins maximum permissible level in food and feed. First revised of standard number 5925. Tehran-Iran: Institute of Standard and Industrial Research of Iran 2009.
 20. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F. A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control* 2011; 22(12): 1956-1959.
 21. Ghanem I, Orfi M. Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control* 2009; 20(6): 603-605.
 22. Guana D, Li P, Cui Y, Zhanga Qi, Zhang W. A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M1 in milk. *Anal Chim Acta* 2011; 703(1): 64-69.
 23. Hussain I, Anwar J. A study on contamination of aflatoxin M1 in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control* 2008; 19(4): 393-395.
 24. Hussain I, Anwar J, Asi MR, Munawar MA, Kashif M. Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control* 2010; 21(2): 122-124.
 25. Iha MH, Barbosa CB, Okada IA, Trucksess MW. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control* 2013; 29(1): 1-6.
 26. Lee JE, Kwak B-M, Ahn J-H, Jeon T-H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control* 2009; 20(2): 136-138.
 27. Manetta AC, Giammarco M, Giuseppe LD, Fusaro I, Gramenzi A, Formigoni A, et al. Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry* 2009; 113(2): 595-599.
 28. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(5): 984-991.
 29. Torkar KG, Vengušt A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 2008; 19(6): 570-577.
 30. Mohamadi Sani A, Nikpooyan H, Moshiri R. Aflatoxin M1 contamination and antibiotic residue in milk in Khorasan province, Iran. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(8-9): 2130-2132.
 31. Movassagh Ghazani MH. Aflatoxin M1 contamination in UHT milk in Tabriz (northwest of Iran). *Toxicology Letters* 2009; 189(Suppl): 228.
 32. Movassagh Ghazani MH. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). *Food Chem Toxicol* 2009; 47(7): 1624-1625.
 33. Nemati M, Mehran MA, Hamed PK, Masoud A. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control* 2010; 21(7): 1022-1024.
 34. Sadia A, Makhdoom AJ, Deng Y, Hussain EA, Riffat S, Naveed S, et al. A survey of aflatoxin M1 in milk and sweets of Punjab, Pakistan. *Food Control* 2012; 26(2): 235-240.
 35. Tajkarimi M, Shojaee Aliabadi F, Salah Nejad M, Pursoltani H, Motallebi AA, Mahdavi H. Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. *Int J Food Microbiol* 2007; 116(3): 346-349.