

Investigating Aflatoxin M1 Contamination in Buffalos Milk Using Immunoassay

Huria Ghariby¹,
Afshin Takdastan²,
Abdol Kazem Neisi³,
Hamideh Rezazadeh¹,
Hasan Kuhpae⁴

¹ MSc Student in Environmental Health, School of Public Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Environmental Technologies Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Assistant Professor, Department of Environmental Health, School of Public Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ MSc Student in Industrial Safety Engineering, Faculty of Health, Safety and Environment, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 18, 2016 ; Accepted December 19, 2016)

Abstract

Background and purpose: Mycotoxins are a group of toxic compounds produced by several species of fungi and aflatoxins are the most important toxins. M1 and M2 which are derivatives of aflatoxin B1 and B2 are resistant against thermal changes, such as pasteurization, sterilization and autoclave and their concentration will not decrease. They are transmitted to humans by milk and milk products and threaten the health of human and society. The aim of this study was to determine aflatoxin M1 in buffaloes milk in Ahvaz and Karoon, Iran using ELIZA method.

Materials and methods: In a cross-sectional study, 60 milk samples were randomly collected from two farms with large number of buffalos, in autumn. ELISA method was used to evaluate of aflatoxins the samples.

Results: The average level of aflatoxin M1 in two selected locations was (155.91 ng/l) which was more than standard level in Iran and the Codex Alimentarius.

Conclusion: According to this research, there was a strong relationship between presence of toxin in milk with the animals' diet and method of storing their foods.

Keywords: aflatoxin M1, milk, food safety, ELISA

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 248-256 (Persian).

بررسی سم آفلاتوکسین M1 در شیر گاو میش با استفاده از روش ایمنواسی

حوریا غریبی^۱
افشین تکدستان^۲
عبدالکاسم نیسی^۳
حمیده رضازاده^۴
حسن کوهپایی^۵

چکیده

سابقه و هدف: مایکوتوکسین ها گروهی از ترکیبات سمی طبیعی بوده که توسط گونه های متعددی از قارچ ها تولید می شوند که آفلاتوکسین ها مهم ترین آن ها است. آفلاتوکسین های M₁ و M₂ مشتقاتی از آفلاتوکسین های B₁ و B₂ هستند که در مقابل تغییرات حرارتی از قبیل پاستوریزه کردن، استریلیزاسیون و اتوکلاو کردن مقاومت نشان داده در نتیجه غلظت آن ها کاهش پیدا نمی کند لذا توسط شیر و محصولات لبنی به انسان منتقل شده و سلامت انسان و جامعه را به خطر می اندازد. هدف از انجام این مطالعه بررسی آفلاتوکسین M₁ در شیر گاو میش های دو شهرستان اهواز و کارون با استفاده از روش الیزا بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی ۶۰ نمونه شیر به طور اتفاقی از ۲ دامداری که بیش ترین راس را در دو منطقه داشتند و در ۳ ماه از فصل پاییز (مهر، آبان، آذر) جمع آوری شد و روش الیزا برای تعیین آفلاتوکسین موجود در نمونه های شیر گاو میش استفاده شد.

یافته ها: میانگین غلظت سم آفلاتوکسین M₁ در کل نمونه های دو منطقه نامبرده طی سه ماه متوالی از حد مجاز استاندارد ایران، اتحادیه اروپا (کدکس) و سازمان غذا بیش تر (۱۵۵/۹۱ ng/l) بود.

استنتاج: طبق بررسی های انجام شده در مطالعه حاضر رابطه تنگاتنگی بین نوع جیره غذایی و روش نگهداری خوراک دام با میزان سم در شیر وجود داشت.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین M₁، شیر، ایمنی غذا، الیزا

مقدمه

فرآیندهای تولید، انتقال و ذخیره سازی مواد غذایی شوند (۱). از مهم ترین مایکوتوکسین ها می توان آفلاتوکسین، پاتولین، اکراتوکسین A و زیرالنون را نام برد که آفلاتوکسین ها مهم ترین آن ها بوده اند (۲). این سم ها

مایکوتوکسین ها گروهی از ترکیبات سمی طبیعی بوده که توسط گونه های متعددی از قارچ ها تولید می شوند. این ترکیبات متابولیت های ثانویه نسبتاً مقاومی هستند که می توانند سبب آلوده شدن غذای انسان و حیوانات در

E-mail: afshin_ir@yahoo.com

مؤلف مسئول: افشین تکدستان - اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، مرکز تحقیقات فناوری های زیست محیطی

۱. دانشجوی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات فناوری های زیست محیطی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴. دانشجوی ارشد ایمنی و محیط زیست، دانشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۱/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۹

با توجه به نقش شیر و فرآورده های آن در تغذیه و سلامت جامعه، ایمنی و بهداشت در این خصوص بسیار حایز اهمیت است. هم چنین سم آفلاتوکسین M₁ یکی از معضلات بهداشتی کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما می باشد. شایان ذکر است که استان خوزستان در رتبه اول پرورش گاو میش قرار دارد (۲۷) و میزان مصرف عمده شیر و محصولات لبنی این استان توسط گاو میش داری ها تامین می شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی آفلاتوکسین M₁ در شیر گاو میش های دو منطقه مشعلی و گاو میش آباد در ماه پاییز که حساس ترین ماه از نظر رشد قارچ های مولد می باشد بوده است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع توصیفی - تحلیلی و از جنس پایه ای - مقطعی می باشد. در مهرماه سال ۱۳۹۳ تا آذرماه همان سال دامداری های سنتی جهت جمع آوری نمونه به ترتیب در ۲ منطقه گاو میش آباد و مشعلی که بر طبق آخرین آمار سازمان جهاد کشاورزی استان خوزستان (سال ۱۳۸۷) بیش ترین تعداد راس گاو میش های اهواز را دارا بودند (۲۷)، انتخاب شدند. هر ماه از دو دامداری انتخابی (دارای بیش ترین راس گاو میش در دو منطقه مذکور) ۱۰ بطری ml ۱۲۰ شیر جمع آوری شد. بطری ها در شرایط سرد و دور از نور آفتاب نگهداری (۴°C) شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل و تحت دمای ۲۰°C - در فریزر نگهداری گردیدند. به این ترتیب ۶۰ نمونه شیر در ۳ ماهه فصل پاییز (مهر، آبان، آذر) جمع آوری شد. همه نمونه ها با شرایط یکسان از فریزر خارج شدند و سپس مورد آنالیز قرار گرفتند.

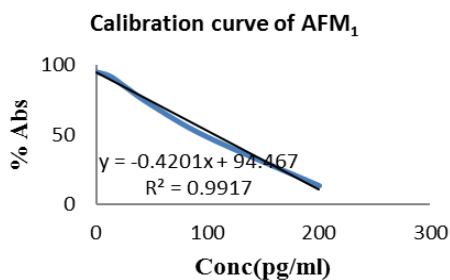
جهت آماده سازی نمونه های شیر سرد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 2000 × g در ۴°C سانتریفیوژ شدند و سپس توسط یک کاردک، چربی روی سطح شیر را حذف شد. در انتها ۱۰۰ μl از شیر بدون چربی جهت آنالیز الیزا جداسازی شد. بعد از آماده سازی معرف ها بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (EuroProxima B.V. -

انواع مختلفی دارند که عبارتند از آفلاتوکسین های B₁، B₂، G₁، G₂، M₁ و M₂ که توسط قارچ های رشته ای جنس اسپرژیلوس تولید می شوند (۴،۳). آفلاتوکسین های M₁ و M₂ مشتقاتی از آفلاتوکسین های B₁ و B₂ هستند که توسط آنزیم P4501A2 در بدن انسان شکل می گیرند (۵). هنگام تولید قارچ های رشته ای مولد آفلاتوکسین B₁ در خوراک دام مشتق 4-Hydroxy آن یعنی آفلاتوکسین M₁ در شیر تولید شد که همانند آفلاتوکسین B₁ اثرات هپاتوتوکسینی و سرطان زایی دارد (۶-۹). آفلاتوکسین M₁ در مقابل تغییرات حرارتی از قبیل پاستوریزه کردن، استریلیزاسیون، اتوکلاو کردن و دیگر روش های فرآوری مقاومت نشان داده و غلظت آن کاهشی پیدا نمی کند (۱۰-۱۳). از مهم ترین اثرات زیستی آفلاتوکسین ها می توان به جلوگیری از سنتز RNA و پروتئین، اختلال در اعمال کبدی، ایجاد سرطان کبد، کاهش ضریب تبدیل مواد غذایی، تقلیل در میزان افزایش وزن روزانه، کاهش تولید شیر در گاوهای شیری، تضعیف سیستم ایمنی گونه های حیوانی و افزایش حساسیت نسبت به بیماری های عفونی اشاره نمود (۱۴-۱۷). مجامع بین المللی و سازمان جهانی بهداشت حداکثر مجاز آفلاتوکسین M₁ در شیر و محصولات لبنی را ۵۰ تا ۵۰۰ ng/l تعیین نموده اند (۱۸، ۱۹). کمیته اروپایی و غذایی کدکس، ماکزیمم میزان آفلاتوکسین M₁ در شیر خام، مایع و سایر محصولات شیری را ۵۰ ng/kg (۱/۰۵ μg/l) تعیین نموده است (۲۰). در حالی که موسسه استاندارد ایران نیز طبق توصیه سازمان غذا و دارو، حد مجاز آفلاتوکسین M₁ را در شیر خام ۰/۱ μg/l اعلام کرده است (۲۱). روش های اندازه گیری آفلاتوکسین M₁ در جیره های غذایی عبارت از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، گاز کروماتوگرافی (GC)، کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) و روش های ایمونواسی مانند ELISA می باشد (۲۴-۲۲) که روش الیزا به دلیل دقت بالا و صرفه جویی در این مطالعه انتخاب شد.

برابر نبودند از آزمون Welch به منظور مقایسه ماه‌های مهر، آبان و آذر استفاده شد و هم‌چنین برای مقایسه دو به دو بین ماه‌ها از تست Tamhanes استفاده شد. P به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر طبق منحنی استاندارد به دست آمده برای اندازه‌گیری غلظت آفلاتوکسین M_1 از غلظت‌های تلفیقی (pg/ml) به عنوان سطر افقی و درصد جذب (در طول موج ۴۵۰ ng) به عنوان ستون عمودی، منحنی با ضریب همبستگی بالای ۹۹ درصد به دست آمد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: منحنی استاندارد به دست آمده برای اندازه‌گیری غلظت آفلاتوکسین M_1

جهت بررسی صحت روش الیزا در تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 ، ۶ نمونه آلوده به‌طور تصادفی انتخاب شد. نتایج درصد بازیافت نمونه‌های انتخابی بیش از ۶۰ درصد و کم‌تر از ۱۲۰ درصد بود که این نتایج در غلظت‌های کم‌تر از $1 \mu\text{g/ml}$ نشانه صحت روش آزمون بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج بررسی صحت روش الیزا در تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر

نمونه	بازیافت	
	مشغلی	نمونه
۵	۱۱۴/۱۲	۲
۱۱	۸۶/۶۵	۱۷
۲۲	۹۲/۱۱	۲۵

ساخت کشور هلند) محتویات هر یک از چاهک‌ها با برگرداندن پلیت‌های میکروتیتر با یک حرکت کوتاه عمودی خالی و چاهک‌ها با $300 \mu\text{l}$ از محلول شستشو پر شد. این چرخه شستشو ۳ بار تکرار گردید. پلیت‌ها و چاهک‌ها توسط حرکت عمودی سریع خالی شدند. پلیت روی دستمال گذاشته شد و با حرکتی محکم تکانده شد. سپس باقی مانده محلول شستشو از پلیت خارج شد. جهت سنجش میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیر از دستگاه الیزا (رقابتی) استفاده گردید به این ترتیب که $100 \mu\text{l}$ استاندارد بافر رقیق‌کننده در چاهک A_1 (بلانک) و $100 \mu\text{l}$ استاندارد صفر در چاهک B_1 ریخته شد. سپس $100 \mu\text{l}$ محلول استاندارد آفلاتوکسین M_1 در چاهک C_1 تا H_1 به میزان ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و 200 pg/ml ریخته شد و $100 \mu\text{l}$ از هر نمونه محلول در مابقی چاهک‌های میکروتیتر پلیت تزریق گردید و پلیت میکروتیتر برای چند ثانیه کوتاه تکان داده شد و به مدت ۱ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه گردید. سپس محلول از میکروتیتر پلیت تخلیه شد و ۳ بار توسط بافر شستشو، شستشو داده شد. در ادامه کار $100 \mu\text{l}$ از کتزوگه (Aflatoxin M₁-HRP) به همه چاهک‌ها جز چاهک A_1 تزریق گردید و پلیت میکروتیتر برای چند ثانیه کوتاه تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه گردید و دوباره محلول از میکروتیتر پلیت تخلیه شد و ۳ بار توسط بافر شستشو، شستشو داده شد. سپس $100 \mu\text{l}$ از محلول سوپسترا نیز در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه گردید. در انتها نیز $100 \mu\text{l}$ از محلول متوقف‌کننده واکنش به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب بلافاصله در طول موج ۴۵۰ nm خوانده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار spss16 و آزمون آماری ANOVA انجام شد. به دلیل این که در داده‌های مربوط به گروه‌ها طبق تست همسان‌سازی، واریانس‌ها

کمترین مقدار میانگین آفلاتوکسین M₁ (۱۲۱/۳۹ ng/l) مربوط به ماه مهر بود. نتایج آزمون آماری نشان داد اختلاف میانگین آفلاتوکسین M₁ موجود در خوراک دام نمونه‌های مربوط به ماه‌های مهر و آبان و مهر و آذر معنی‌دار بوده است (p < ۰/۰۵). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین میانگین آفلاتوکسین M₁ در نمونه‌های دو منطقه مشعلی و گاومیش آباد وجود داشت (p < ۰/۰۵). میانگین آفلاتوکسین M₁ در نمونه‌های دو منطقه مشعلی و گاومیش آباد در ماه مهر، آبان و آذر به ترتیب ۱۹۰/۶۹ ± ۶۰/۳۴، ۱۵۵/۶۵ ± ۴۷/۰۶، ۱۲۱/۳۹ ± ۳۱/۶۹ بود. هم‌چنین میانگین سم در نمونه‌های هر دو منطقه در سه ماهه فصل پاییز ۵۴/۹۸ ± ۱۵۵/۹۱ به دست آمد.

بحث

منشا تمامی آفلاتوکسین‌ها در فرآورده‌های حیوانی غذایی آلوده به سم بوده و حیوانات شیرده آفلاتوکسین‌های B₁ و B₂ را از طریق غذای آلوده به صورت آفلاتوکسین M₁ و M₂ به شیر منتقل می‌کنند و سلامت انسان را به خطر می‌اندازند. بنابراین پایش و پیشگیری در این زمینه حایز اهمیت است. گاومیش‌داری‌های سنتی نقش مهمی در تامین محصولات لبنی استان خوزستان دارند و شرایط آب و هوایی این استان جهت رشد انواع قارچ‌ها مناسب می‌باشد. در این مطالعه دو منطقه گاومیش آباد و مشعلی که بر طبق آمار سال ۱۳۸۷ سازمان جهاد کشاورزی خوزستان در رتبه اول و دوم از نظر تعداد رؤس گاومیش و تولید شیر گاومیش قرار گرفته‌اند، مورد بررسی قرار گرفت. از این نظر که فصل پاییز به دلیل فاصله زمانی طولانی تا زمان برداشت محصولات کشاورزی و شرایط رطوبت و دمای مناسب جهت رشد قارچ‌های مولد حساس‌ترین فصل می‌باشد، ماه‌های این فصل مورد بررسی قرار گرفت (۳۲). در این مطالعه کمترین میانگین غلظت آفلاتوکسین M₁ (۱۰۴/۸۳ ng/l) مربوط به منطقه گاومیش آباد در ماه مهر و بیشترین میانگین غلظت آلودگی (۲۰۹/۴۷ ng/l) مربوط به منطقه مشعلی در ماه آذر بود که علت اصلی

بررسی حساسیت روش الیزا در تعیین مقدار آفلاتوکسین M₁ در شیر دام توسط دو فاکتور حد پایینی تشخیص نمونه‌ها (LOD) و حد تعیین مقدار کمی نمونه‌ها (LOQ) توسط شرکت سازنده کیت تعیین شد (۳۱-۲۸). حد پایینی تشخیص نمونه‌ها (LOD) و حد تعیین مقدار کمی نمونه‌ها (LOQ) به ترتیب ۶۰ ppt و ۲۰ ppt بود. میانگین غلظت سم آفلاتوکسین M₁ نمونه‌های منطقه گاومیش آباد و مشعلی نیز بررسی شد (جدول شماره ۲ و ۳). از ۶۰ نمونه ۵۴ نمونه (۹۰ درصد) با محدوده غلظتی بالای حد استاندارد ایران (۱۰۰ ng/l) بوده و محدوده غلظتی در ۶۰ نمونه از ۵۵/۲۶-۳۱۲/۲۵۶ ng/l بود. بیشترین مقدار میانگین آفلاتوکسین M₁ (۲۰۹/۴۷ ng/l) در شیر دام منطقه مشعلی مربوط به ماه آذر و کمترین مقدار میانگین آفلاتوکسین M₁ (۱۳۷/۹۴ ng/l) در این منطقه مربوط به ماه مهر بود. هم‌چنین بیشترین مقدار میانگین آفلاتوکسین M₁ (۱۷۱/۹۱ ng/l) در شیر دام منطقه گاومیش آباد مربوط به ماه آذر و کمترین مقدار میانگین آفلاتوکسین M₁ (۱۰۴/۸۳ ng/l) در این منطقه نیز مربوط به ماه مهر بود.

جدول شماره ۲: میانگین غلظت آفلاتوکسین M₁ در شیر دام در منطقه مشعلی در ماه‌های مهر، آبان و آذر سال ۱۳۹۳ (ng/l)

ماه	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت	تعداد بالاتر از حد مجاز مثبت	شهرستان اهواز (منطقه مشعلی)	
				تعداد نمونه‌های مثبت بالاتر از حد مجاز	انحراف معیار ± میانگین
مهر	۱۰	۱۰	۱۰	۱۳۷/۹۴ ± ۲۱/۰۳۸	محدوده آلودگی ۱۰۳/۸۹ - ۱۷۹/۱۵
آبان	۱۰	۱۰	۱۰	۱۶۳/۶۹ ± ۳۷/۴۰	محدوده آلودگی ۱۰۹/۶۵ - ۲۵۱/۲۱
آذر	۱۰	۱۰	۱۰	۲۰۹/۴۷ ± ۶۷/۱۳۳	محدوده آلودگی ۱۱۱/۶۸ - ۳۱۲/۲۵
کل	۳۰	۳۰	۳۰	۱۷۰/۳۷ ± ۵۶/۰۶	محدوده آلودگی ۱۰۳/۸۹ - ۳۱۲/۲۵

جدول شماره ۳: میانگین غلظت آفلاتوکسین M₁ در شیر دام منطقه گاومیش آباد در ماه‌های مهر، آبان و آذر سال ۱۳۹۳ (ng/l)

ماه	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت	تعداد بالاتر از حد مجاز مثبت	شهرستان کارون (منطقه گاومیش آباد)	
				تعداد نمونه‌های مثبت بالاتر از حد مجاز	انحراف معیار ± میانگین
مهر	۱۰	۱۰	۶	۱۰۴/۸۳ ± ۳۲/۶۹	محدوده آلودگی ۵۵/۲۶ - ۱۷۵/۲۳
آبان	۱۰	۱۰	۸	۱۴۷/۶۲ ± ۴۷/۸۰	محدوده آلودگی ۹۱/۸۶ - ۲۲۲/۹۵
آذر	۱۰	۱۰	۱۰	۱۷۱/۹۱ ± ۴۸/۸۳	محدوده آلودگی ۱۱۷/۱۲ - ۲۷۷/۲۴
کل	۳۰	۳۰	۲۴	۱۴۱/۴۵ ± ۵۰/۷۶	محدوده آلودگی ۵۵/۲۶ - ۲۷۷/۲۴

بیشترین مقدار میانگین آفلاتوکسین M₁ (۱۹۰/۶۹ ng/l) در شیر دام دو منطقه مربوط به ماه آذر و

مجاز کشور هند بود که این تفاوت سه دلیل عمده شامل شرایط آب و هوایی متفاوت هندوستان و اهواز، نوع خوراک دام مصرفی و شرایط برداشت و نگهداری خوراک دام داشت.

در مطالعه‌ای که در ترکیه توسط unusan و همکاران در سال ۲۰۰۶ روی ۱۲۹ نمونه شیر پاستوریزه انجام شد ۷۵ نمونه شیر آلوده به آفلاتوکسین M_1 بودند و میانگین آلودگی به آفلاتوکسین M_1 $108/17 \text{ ng/l}$ بود (۳۵). در حالی که در مطالعه حاضر میانگین آلودگی در شیر بالاتر بوده که این خود می‌تواند به دلیل شرایط آب و هوایی متفاوت (دما و رطوبت) در ترکیه و اهواز و تاثیر فاکتورهای محیطی به خصوص دما و رطوبت هوا بر رشد قارچ‌های مولد سم در جیره غذای دام باشد.

صادقی و همکاران در سال ۱۳۹۱ میزان آفلاتوکسین M_1 را در شیر خام، پاستوریزه و استریلیزه بررسی نمودند. نتایج مطالعات در رابطه با میزان آفلاتوکسین بیش از حد استاندارد در شیرهای مختلف متفاوت بود میزان آلودگی در بیش‌تر موارد در فصل سرد بیش از فصل گرم بود (۳۶) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. صادقی و همکاران در سال ۱۳۸۹ میزان آفلاتوکسین M_1 موجود در شیر خام جمع‌آوری شده برای تحویل به کارخانه شیر پاستوریزه کرمانشاه را ارزیابی نمودند. در ۲۹۵ نمونه میزان آفلاتوکسین از استاندارد کدکس (۰/۵ میکروگرم در لیتر) بالاتر بود. میانگین کل $1/21 \mu\text{g/L}$ بود که بیش از دو برابر استاندارد کدکس بود. بالاترین میزان آفلاتوکسین M_1 مربوط به فصل بهار و کم‌ترین میزان مربوط به فصل پاییز بود و بین میزان آلودگی به سم آفلاتوکسین M_1 و فصول تفاوت معنی‌داری وجود داشت (۰/۰۵) $(p < 0.05)$. در مطالعه حاضر نیز میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در ۶۰ نمونه آنالیز شده از استاندارد کدکس بالاتر بوده و میانگین آلودگی $1/59$ یعنی بیش از سه برابر استاندارد کدکس بود. هم‌چنین بالاترین میزان آلودگی مربوط به ماه سردتر (آذر ماه) و کم‌ترین میزان نیز مربوط به ماه گرم‌تر (مهرماه) بود و میانگین

آلودگی خوراک دام به آفلاتوکسین B_1 بود. هم‌چنین همان‌طور که در نتایج نشان داده شد میزان سم در نمونه‌های شیر دو منطقه با کاهش دما در فصل پاییز افزایش یافت که نشان‌دهنده تاثیر مثبت کاهش دما در رشد قارچ‌های مولد سم آفلاتوکسین B_1 موجود در خوراک دام بود. (۳۲،۳۰،۲۹).

Zheng و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور چین وجود آفلاتوکسین M_1 در ۱۵۳ نمونه شیر استریلیزه را ارزیابی نمودند. در ۵۴/۹۷ درصد از نمونه‌های شیر استریلیزه، میزان AFM_1 با غلظت $0/16 - 0/006 \mu\text{g/L}$ تشخیص داده شد. علاوه بر این ۹۶/۲ درصد نمونه‌های شیر پاستوریزه از نظر تست AFM_1 مثبت بودند. سطح غلظت نیز $0/23 \mu\text{g/L}$ تا $0/154$ بود (۳۳). در حالی که در مطالعه حاضر همه نمونه‌ها از نظر تست مثبت بوده و سطح آفلاتوکسین M_1 در محدوده پایین‌تری بود که این تفاوت به دلیل شرایط نگهداری بسیار نامناسب خوراک دام در مطالعه Zheng و همکاران (۳۳) بود.

Siddappa و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور هند وجود آفلاتوکسین M_1 را در بعضی از نمونه‌های شیر استریلیزه، خام و پاستوریزه در ایالت‌های کارناتا‌کا و تامیل‌نادو بررسی نمودند. میزان سم در ۳۸ درصد آن‌ها بیش‌تر از حد مجاز تعیین شده توسط کدکس و قوانین الزامی کشور هند، (مقررات FSSAI (۲۰۱۱) بود (سطح $0/5$ میکروگرم در لیتر) و در ۶۲/۵ درصد از شیرهای استریلیزه، میزان AFM_1 تشخیصی پایین‌تر از حد مجاز بود ($0/02$ میکروگرم در لیتر) (۳۴). آفلاتوکسین M_1 در ۶۱/۶ درصد از ۵۲ نمونه شیر خام آنالیز شده دو ایالت کارناتا‌کا و تامیل‌نادو با محدوده غلظتی $0/1$ تا $3/8$ میکروگرم در لیتر بود و در $17/3$ درصد از این نمونه‌ها میزان AFM_1 بالاتر از حد مجاز کشور هند (۵۰۰ میکروگرم در لیتر) بود. در حالی که در مطالعه حاضر محدوده غلظتی در شیر خام گاو‌میش‌ها پایین‌تر بود ($0/1 - 0/2$ میکروگرم در کیلوگرم) و در مقایسه با استاندارد کشور هند در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها سطح آلودگی پایین‌تر از حد

آلودگی فقط بین ماه‌های مهر و آذر معنی‌دار بود ($p < 0/05$). در مطالعه‌ای که توسط عزیززی و همکاران در سال ۸۷ در بابل صورت گرفت میزان آلودگی شیر به آفلاتوکسین M1 شیر پاستوریزه در ماه‌های دی، بهمن و اسفند همگی صد درصد بود و میانگین آن به ترتیب ۲۲۲/۲۳۴، ۷۱/۱۲ و ۲۳۴/۶۷ ng/l (متوسط ۲۳۰/۵) مشخص گردید و میانگین آن برای شیر استریلیزه ۲۲۱/۶۶ ng/l مشخص شد (۳۸). در مطالعه حاضر صد درصد نمونه‌های شیر گاو میش نیز آلوده به آفلاتوکسین M1 بوده و میانگین آلودگی در منطقه گاو میش آباد در سه ماهه متوالی ۱۴۹/۳۳ ng/l و در منطقه مشعلی ۱۶۸/۸۱ ng/l بود. هم‌چنین میانگین دو منطقه در سه ماهه متوالی ۱۵۹/۰۷ ng/l بود که از میانگین آلودگی در بررسی عزیززی و همکاران (۳۸) کم‌تر بود. زیرا مطالعه عزیززی و همکاران (۳۸) در فصل زمستان صورت گرفته و فاصله نگهداشت خوراک دام از زمان برداشت بیش‌تر بود و قارچ‌ها زمان بیش‌تری جهت رشد در غذای دام پیدا نموده و به تناسب رشد بیش‌تر قارچ‌ها سم بیش‌تری در جیره تولید و به شیر دام منتقل یافته است. هم‌چنین شرایط نگهداری و نوع غذای مصرفی نیز در میزان این اختلاف حایز اهمیت بوده است. بین دو منطقه مشعلی و گاو میش آباد واقع در دو شهرستان اهواز و کارون میزان رشد میانگین غلظت آفلاتوکسین M1 در منطقه مشعلی به نسبت گاو میش آباد بیش‌تر بود که این خود دو علت عمده داشت. دلیل نخست نوع ماده غذایی مصرفی در دو منطقه بود که به صورت مخلوط استفاده می‌شد. در مشعلی از مخلوط تفال نیشکر، کاه و سبوس برنج استفاده می‌شد در حالی که در گاو میش آباد این مخلوط حاوی تفال نیشکر، سبوس گندم بود. جیره غذایی منطقه مشعلی حاوی سبوس برنج بود و جیره غذایی منطقه مشعلی حاوی سبوس برنج بود و نتایج نشان داد که این محصول نیز جزء آلوده‌ترین منبع غذایی دام‌ها در منطقه اهواز بوده است که البته

علت این امر را می‌توان در میزان بالای چربی سبوس برنج دانست. این محصول بر خلاف سبوس گندم که حدود ۴ تا ۵ درصد چربی دارد دارای ۱۱ تا ۱۸ درصد چربی است. این چربی نیز عمدتاً غیر اشباع بوده و به سرعت دچار فساد می‌گردد (۳۹). دلیل دوم تفاوت در روش نگهداری خوراک دام بود. در گاو میش آباد مواد غذایی در کیسه‌ها و روی پالت در انبار نگهداری می‌شد در حالی که در مشعلی نگهداری خوراک دام روی زمین و جای مرطوب انجام می‌گرفت و این خود به شرایط رشد قارچ‌های مولد سم کمک شایانی می‌نمود. بنابر نتایج به دست آمده حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات دیگر در این زمینه پایش و کنترل در کلیه فصول به خصوص پاییز و تابستان (به دلیل رطوبت بالا در پائیز و دمای بالا در تابستان) بسیار حایز اهمیت است (۴۰). با بررسی‌های انجام شده در دو منطقه نامبرده (مشعلی و گاو میش آباد خوزستان) بین نوع جیره غذایی با میزان سم آفلاتوکسین موجود در شیر رابطه تنگاتنگی وجود دارد. بنابراین باید جایگزینی برای خوراک دام پر خطر از جمله سبوس برنج با اغذیه کم‌خطر (آرد گندم، کنجاله آفتابگردان و غیره) در نظر گرفته و خوراک دام را در شرایط بهداشتی نگهداری نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد است که در چارچوب طرح تحقیقاتی به شماره ETRC9302 مصوب مرکز تحقیقات فناوری‌های زیست محیطی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور انجام شد. بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات و فناوری‌های زیست محیطی و معاونت توسعه پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که زمینه لازم را برای این تحقیق فراهم آوردند، اعلام می‌نمایند.

References

1. Ellen CH. Patulin: a mycotoxin in apples.

Perishables Handling Quarterly 1997; 91: 5-6.

2. Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. Food mycotoxins: an update. *J Food Sci* 2006; 71(5): R51-R65.
3. Elik TH, Sarimehmetoglu B, Kuplulu O. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. *Veterinarski Arhiv* 2005; 75(1): 57-65.
4. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127(1-3): 19-28.
5. Faletto M, Koser P, Battula N, Townsend G, Maccubbin A, Gelboin H, et al. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B1-4-hydroxylase. *J Biol Chem* 1988; 263(25): 12187-12189.
6. Pazoki M, Takdastan A, Jaafarzadeh A. Investigation of minimization of excess sludge production in sequencing batch reactor by heating some sludge. *Asian Journal of Chemistry* 2010; 22(3): 1751-1756.
7. Cullen JM, Ruebner BH, Hsieh LS, Hyde DM, Hsieh DP. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fischer rats compared to aflatoxin B1. *Cancer Res* 1987; 47(7): 1913-1917.
8. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1994; 34(1): 135-172.
9. Koser PL, Faletto M, Maccubbin A, Gurtoo H. The genetics of aflatoxin B1 metabolism. Association of the induction of aflatoxin B1-4-hydroxylase with the transcriptional activation of cytochrome P3-450 gene. *J Biol Chem* 1988; 263(25): 12584-12595.
10. Fazelpour M و Takdastan A, Sekhvatjo M. 2011, Survey on chlorine application in sequencing batch reactor waste sludge in order to sludge minimization. *Asian Journal of Chemistry* 2011; 23(6): 2994-2998.
11. Park DL. Effect of processing on aflatoxin. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504: 173-179.
12. Rustom IY. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem* 1997; 59(1): 57-67.
13. Tadi PP, Teel RW, Lau BH. Organosulfur compounds of garlic modulate mutagenesis, metabolism, and DNA binding of aflatoxin B1. *Nutr Cancer* . 1991; 15(2): 87-95.
14. Bommakanti AS, Waliyar F. Importance of Aflatoxins in human and livestock health. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: Telangana, India; 2000.
15. Cassel EK. Aflatoxins, Hazards in Grain: Aflatoxicosis and Livestock: South Dakota State University; 2001.
16. Allame AA, Razzaghi Abyane M. Mycotoxins: University Emam Hosiyi Spreading Abroad; 2000.
17. Hwang J, Chun H, Lee K. Aflatoxins in foods-analytical methods and reduction of toxicity by physicochemical processes. *Appl Biol Chem* 2004; 47(1): 1-16.
18. Commission CA. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex Committee on Food Additives and Contaminants 33rd Session, Hague, The Netherlands Commission Regulation (EC) No. 2001; 257.
19. Commission E. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001. setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels: European Commission; 2001.
20. Commissions CA. Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M1 in milk. Codex Committee on foog Addites and Contaminant 33rd sessions, Hauge, the Netherlands 2001.
21. Iran IoSaIRo. Maximum validity Maycotoxins in human food. Iran IoSaIRo: Karaj, 2001.
22. Aycicek H, Aksoy A, Saygi S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control* 2005; 16(3): 263-266.
23. Cole RJ. Modern methods in the analysis and

- structural elucidation of mycotoxins. Florida: Academic Press; 2012. p. 415-457.
24. Rastogi S, Dwivedi PD, Khanna SK, Das M. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004; 15(4): 287-290.
 25. Rodriguez Velasco M, Calonge Delso M, Ordonez Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M 1 in raw cow's milk. *Food Addit Contam* 2003; 20(3): 276-280.
 26. Yaroglu T, Oruc H, Tayar M. Aflatoxin M1 levels in cheese samples from some provinces of Turkey. *Food Control* 2005; 16(10): 883-885.
 27. Available from: <http://www.kaj.maj.ir/portal/home/default.aspx>. Accessed December 11, 2015.
 28. Khaksar R, Karim G, Kamkar A, Shojaee F, Ferdousi R, Bokaii S, et al. Validation method for measuring Of aflatoxin M1 in Iranian white cheese By using of high-performance liquid chromatography and purification with immunoaffinity columns. *Iran J Nutr Sci Food Technol* 2008;4(1): 73-78.
 29. ISIR Org. Milk and milk powder-Determination of aflatoxin M1 content -Clean up by immunoaffonity chromatography and determination by high performance liquid chromatography-test Method. 7133. ISIR Org, 1998.
 30. Long GL, Winefordner JD. Limit of detection A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 1983; 55(7): 712A-724A.
 31. Millar JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th ed. Hrlow: Prentice Hall; 2000.
 32. Ibrahim R, kargar AR, Zamani F. Assess the level of aflatoxin B1 in animal feed, dairy cattle farms in the province of Chahar Mahal and Bakhtiari. *Pajohesh and Sazandegi* 2008; 79: 66-71.
 33. Zheng N, Sun P, Wang J, Zhen Y, Han R, Xu X. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control* 2013; 29(1): 198-201.
 34. Siddappa V, Nanjegowda DK, Viswanath P. Occurrence of aflatoxin M 1 in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(11): 4158-4162.
 35. Unusan N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(11): 1897-1900.
 36. Takdastan A, Mehrdadi N, Torabian A, Azimi AA. Investigation of excess biological sludge reduction in sequencing Bach reactor *Journal Asian Journal of Chemistry* 2009; 21(3): 2419-2423.
 37. Sadeghi E, Almasi A, Bohlooli Oskoi, Mohammadi M. to assess the level of aflatoxin M1 in raw milk collected for the delivery of milk to the factory in Kermanshah in 2015. *Zahedan J Res Med Sci* 2010 (in Press).
 38. Azizi G, Khoushnevis SH, Hashemi SJ. Aflatoxin M1 level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2008; 65(13): 20-24.
 39. Takdastan A, Azimi A. Jaafarzadeh N. Biological excess sludge reduction in municipal wastewater treatment by chlorine. *Asian Journal of Chemistry* 2010; 22(3): 1665-1670.
 40. Ersali AA, Bahaodin Beigi F, Ghasemi R. Aflatoxin transfer from animal feed to milk and pasteurized milk in the city of Shiraz and around. *J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci* 2009; 17(3): 183-175.