

Study of milk aflatoxin M₁ and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province

Ranjbar S¹, Noori M, Ph.D^{2*}, Nazari R, Ph.D³

1- MSc. student in Microbiology Department, Qum Islamic Azad University, Iran

2- Biology Department, Faculty of Science, Arak University 38156-8-8349, Iran

3- Microbiology Department, Qum Islamic Azad University, Iran

* Email corresponding author: m-noori@araku.ac.ir

Received: 31 Jan. 2011

Accepted: 5 Apr. 2011

Abstract

Aim: Utilizing *Aspergillus* polluted feed causes aflatoxin production, disturbing disordered domestic health, milk and consumers cycle. In this research the relationship of milk aflatoxin M₁ and feed fungi flora was studied in Markazi Province.

Materials and methods: In this study the feed composition used in ten grazieries in Markazi Province in years 2009 and 2010 were examined. Isolation, cultivation and identification of feed fungi were done. Also the resulting produced milk aflatoxin M₁ was measured using ELISA method. Then the relationship between feed composition, molds and milk aflatoxin were calculated.

Results: Results showed that the most feed composition were zea, cotton and kolza cakes, feed complementary, barley, wheat bran, dried bread, fat powder and alfalfa. The most common feed pollutants were *Aspergillus flavus*, *A. clavatus* and *Rhizopus stolonifera*. Annual studies on collected milk from grazieries showed existing aflatoxin M₁ in all of them. Statistical analysis of data confirmed a strong correlation between soya and kolza cakes with *Aspergillus* molds in feed and milk pollution to aflatoxin.

Conclusion: Control of feed mold pollution is the best method for the prevention of milk and its products being polluted to aflatoxins that helps to improve community health.

Keywords: Aflatoxin M₁, *Aspergillus*, Feed, Milk.

بررسی آفلاتوکسین M₁ شیر و ارتباط آن با فلور قارچی خوراک دام مصرفی در استان مرکزیسمیرا رنجبر^۱، میترا نوری Ph.D.^{۲*}، راضیه نظری Ph.D.^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-noori@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۱

چکیده

هدف: مصرف خوراک دام آلوده به *Aspergillus* سبب تولید آفلاتوکسین و ایجاد اختلال در چرخه سلامت دام، شیر و افراد مصرف کننده می گردد. در این پژوهش بررسی آفلاتوکسین M₁ شیر و ارتباط آن با فلور قارچی خوراک دام مصرفی در استان مرکزی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: خوراک دام سالانه مصرفی ده دامداری استان مرکزی در ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ بررسی گردید. جداسازی، کشت و تشخیص قارچ های موجود در آنها انجام و آفلاتوکسین موجود در شیر تولیدی به روش الایزا اندازه گیری شد و ارتباط بین ترکیب خوراک دام، کپک و آفلاتوکسین M₁ در شیر دام سنجش گردید.

نتایج: نتایج نشان داد بیشترین مواد تشکیل دهنده خوراک دام شامل ذرت، کنجاله پنبه دانه و کلزا، مکمل های غذایی، جو، سبوس گندم، نان خشک، پودر چربی و یونجه می باشند. بیشترین عامل آلودگی وجود کپک های *A. flavus* *Aspergillus clavatus* و *Rhizopus stolonifer* بودند. نتایج مطالعه سالانه آفلاتوکسین در شیر دامداری ها وجود آفلاتوکسین M₁ را در همه آنها نشان داد. آنالیز آماری داده های سالیانه خوراک دام و آفلاتوکسین وجود ضریب همبستگی قوی بین کنجاله کلزا و سویا با کپک های آسپرژیلوس در خوراک دام و آلودگی شیر به آفلاتوکسین را تأیید نمود.

نتیجه گیری: پس کنترل آلودگی خوراک دام به کفک ها، بهترین روش برای جلوگیری از آلودگی شیر و فرآورده های آن به آفلاتوکسین هاست که به بهبود سلامت جامعه کمک می کند.

واژگان کلیدی: آسپرژیلوس، آفلاتوکسین M₁، خوراک دام، شیر.

مقدمه

شیر مهمترین منبع تأمین کلسیم و فسفر به شمار می رود و به علت داشتن اسیدهای آمینه ضروری، جایگاه ویژه و مهمی در تأمین پروتئین مورد نیاز بدن دارد. تحقیقات مستمر انجام گرفته در مورد مصرف فرآورده های لبنی نشان داده است که ارتباط نزدیک و مستمری بین مصرف این فرآورده ها و سطح سلامت افراد جامعه به لحاظ کارآیی، ضریب هوشی، میزان ابتلا به بیماری های عفونی و تنظیم فعالیت های متابولیکی بدن وجود دارد. پژوهش های اخیر نشان می دهد مصرف شیر و فرآورده های شیری در کاهش فشار خون، افزایش چربی های مفید خون، جلوگیری از ابتلا به سرطان کولون و پیشگیری از پوکی استخوان مفید و مؤثر است. از این رو بهداشت و سلامت شیر و فرآورده های آن اهمیت داشته و این به سلامت دام ها و تأمین شیر سالم و عاری از آلودگی از آنها بستگی دارد. استفاده از خوراک دام ناسالم و آلوده سبب ایجاد اختلال در چرخه سلامت دام، شیر و افراد مصرف کننده شیر و فرآورده های لبنی می گردد. پژوهش های مختلف بر روی خوراک دام نشان داده است که آلودگی خوراک دام به کپک ها و خصوصاً گونه های آسپرژیلوس سبب تولید آفاتوکسین و انتقال آن به شیر و فرآورده های آن می شود. بسیاری از محصولات کشاورزی که در تهیه خوراک دام استفاده می شوند، مستعد آسیب پذیری توسط گروهی از قارچ ها می باشند که قادرند متابولیت های سمی تولید کنند (۱). آفاتوکسین ها گروهی از سموم قارچی و از متابولیت های ثانویه گونه هایی از کپک ها مانند آسپرژیلوس هستند که به آسانی در طی رشد و انبارداری مواد غذایی ایجاد می شوند (۲). در علوفه، غلاتی مانند ذرت، جو، گندم و برنج، دانه های روغنی مانند سویا، بادام زمینی، پنبه و آفتابگردان کپک ها به آسانی در حین داشت، برداشت، فرآوری، حمل و انبارداری رشد نموده و در آنها آفاتوکسین تولید می کنند. تا کنون گزارش های بسیاری در خصوص آلودگی کپکی خوراک حیوانات، وجود آفاتوکسین در آنها و تلفات دام و طیور در اثر مصرف این خوراک ها گزارش شده است. Goldbatt (۳) مرگ بیش از صد هزار بوقلمون را در انگلستان بر اثر آلودگی خوراک طیور کنجاله بادام زمینی برزیلی به کپک آسپرژیلوس و تولید آفاتوکسین در آنها گزارش نمود. سم قارچی از خوراک بادام زمینی آلوده به *Aspergillus flavus* جداسازی و آفاتوکسین نام گرفت. این سم در ۱۹۶۱ موجب شد که زبان های حاصل از سموم قارچی به عنوان آلوده کننده مواد غذایی و ایجاد بیماری و حتی مرگ در انسان و حیوانات

مورد توجه بیشتری قرار گیرد (۴). تا کنون ۱۷ نوع آفاتوکسین در طبیعت تشخیص داده شده است که آفاتوکسین های G₁، B₁، G₂ و B₂ مهمترین آن ها می باشند (۵) که به طور طبیعی تولید می شوند. اما مصرف خوراک دام آلوده به آفاتوکسین های B₁ و B₂ توسط گاوهای شیری سبب هیدروکسیله شدن این سموم و تبدیل به آفاتوکسین های M₁ و M₂ می شود که در شیر قابل ردیابی می باشند (۶ و ۷). گزارش های زیادی در مورد مسمومیت، بیماری و مرگ در حیوانات و انسان در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به آفاتوکسین وجود دارد. ابتلا ۱۹۷۴ نفر به آفاتوکسیکوز و مرگ ۱۰۸ نفر از آنها در کشور هند بر اثر دریافت روزانه ۲-۶ میلی گرم آفاتوکسین در چند هفته (۸ و ۹) و همچنین بیماری ۴۰ نفر و مرگ ۱۳ کودک در کشور مالزی با مصرف ماکارونی آلوده به آفاتوکسین از آن جمله اند (۱۰). تحقیقات انجام شده نشان می دهد که علاوه بر گونه *Aspergillus flavus* گونه ها و واریته های دیگری نیز مانند *Aspergillus ochraceus*، *Aspergillus steranus*، *Aspergillus glaucus* و *Aspergillus chlomenariss* از تولید کنندگان عمده آفاتوکسین می باشند (۱۱). عوارض ناشی از آفاتوکسین ها سبب گردید تا برخی از کشورها برای این سم حدود قانونی و مجاز تعیین کنند که این در کشورهای مختلف بسیار متغیر است و به میزان توسعه و مشکلات اقتصادی کشورها بستگی داشته و حتی سطوح تعیین شده نمی تواند از اثرات مزمن آفاتوکسین ها جلوگیری کند (۱۲). در ایالات متحده آمریکا انجمن غذا و دارو یک حد کلی ۲۰ نانوگرم در گرم را برای آلودگی های آفاتوکسینی در غذاهای مورد مصرف دامی و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم یا ۵۰ نانوگرم در لیتر آفاتوکسین در شیر را به عنوان حد مجاز مصرف بیان کرده است (۱۳). کشورهای اروپایی سطح مجاز آفاتوکسین M₁ در شیر، فرآورده های شیری و غذای کودکان را ۰/۰۰۵ میلی گرم در کیلوگرم مشخص کرده اند (۱۴). تا سال ۱۹۸۷ در ۳۴ کشور قوانین مربوط به حدود مجاز آفاتوکسین در جیره غذایی حیوانات وجود داشت که در این بین اتحادیه مشترک اروپا برای خود قوانین ویژه ای داشت. تا این زمان فقط ۱۴ کشور قوانین مربوط به آفاتوکسین M₁ شیر را داشتند و مقادیر قابل قبول بین ۰/۵-۰/۰۵ میکروگرم بر کیلوگرم بوده است (۱۵). البته شرایط آب و هوایی نیز در تعیین حد مجاز آفاتوکسین مؤثر است، به طوری که در کشورهای گرمسیری این مقدار بالاتر و در کشورهای با آب و هوای معتدل و سرد کمتر است.

گذاری گردید تا در ثبت داده ها و انجام آنالیز آماری استفاده شوند.

مطالعه و تشخیص اولیه و ثانویه قارچ‌ها در خوراک‌های دام:

جهت بررسی اولیه وجود یا عدم وجود کپک در خوراک دام، از هر یک از خوراک‌های دام اسلاید‌های میکروسکوپی نیمه‌دایمی به کمک بلولاکتوفنل تهیه و مورد مطالعه قرار گرفتند. در صورت وجود کپک در هر اسلاید برچسب دار، کپک‌ها با استفاده از منابع قابل دسترس و کلید‌های شناسایی (۱۸ و ۱۹)، شناسایی و از آنها عکس تهیه شد. سپس خوراک‌های دام کشت شدند بدین ترتیب که با ریختن مقدار معینی از هر یک از مواد در پلیت‌های استریل برچسب دار و افزودن مقدار معینی آب مقطر به هر یک از پلیت‌ها درب آنها را بسته و در انکوباتور ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته قرار داده شدند. پس از آن محتویات هر پلیت بررسی و از هر کدام اسلایدهای میکروسکوپی در محلول بلولاکتوفنل تهیه و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند (۲۰). از پلیت‌ها و اسلایدهای دارای قارچ مناسب به وسیله استریو میکروسکوپ و میکروسکوپ عکسبردار عکس تهیه شد.

جداسازی و کشت اختصاصی کپک‌ها: هر یک از کپک‌های شناسایی شده درون پلیت‌ها جداسازی و در پلیت‌های استریل حاوی محیط سابورو دکستروآگار (دکسترین-آگار-پپتون) کشت 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 (۲۰ و ۲۱) (جدول ۱).

کمیسیون اروپا ۲ میکروگرم بر کیلوگرم را برای آفلاتوکسین B₁ و ۰/۰۵ میکروگرم بر کیلوگرم را برای شیر در نظر گرفته است (۶ و ۱۵). برای تشخیص و اندازه‌گیری آفلاتوکسین موجود در مواد خوراکی مختلف روش‌های متفاوتی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC)، کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرم و الیزا وجود دارد که امروزه روش الیزا به علت سرعت بالا بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶). هدف از این پژوهش بررسی ترکیبات خوراک مورد استفاده در ده دامداری سنتی و صنعتی در استان مرکزی در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ در فصول مختلف می‌باشد. همچنین جداسازی، کشت و تشخیص قارچ‌های موجود در خوراک دام انجام و آفلاتوکسین موجود در شیر به روش الیزا نیز اندازه‌گیری شد. علاوه بر آن، ارتباط بین ترکیب خوراک دام و وجود آفلاتوکسین در شیر دام نیز مطالعه گردید (۱۷).

مواد و روش‌ها

تعیین دامداری‌ها و نمونه‌برداری از خوراک‌های دام: ده دامداری سنتی و صنعتی به طور تصادفی از بین دامداری‌های اطراف شهر اراک انتخاب و نمونه‌برداری از ترکیبات خوراک دام‌های مورد استفاده در آنها از تابستان ۱۳۸۸ تا تابستان ۱۳۸۹ در همه فصول و در هر فصل چهار بار انجام گردید. مقدار ۲۰۰ گرم از هر یک از ترکیبات مورد استفاده در خوراک دام‌ها از مکان‌های مختلف انبار برداشت و در کیسه‌های برچسب دار کاغذی استریل و به آزمایشگاه منتقل شدند. علایم اختصاری برای هر نمونه تعیین و وجود یا عدم وجود هر یک برای هر دامداری ارزش

جدول ۱: داده‌های حاصل از مطالعات خوراک دام و آفلاتوکسین شیر سالانه در دامداری‌های مورد مطالعه استان مرکزی.

No	تعداد ترکیبات خوراک دام	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Saccharomyces servisea</i>	Aflatoxin M ₁ ± SE Ngr/L
S ₁	۲۱	+	+	+	-	-	۵/۸۰ ± ۰/۸۶
S ₂	۱۷	+	+	+	-	-	۶/۱۱ ± ۱/۱۳
S ₃	۱۳	+	+	+	-	+	۳۲/۵۰ ± ۱/۶۲
S ₄	۲۰	+	+	+	-	-	۵/۵۶ ± ۰/۷۴
S ₅	۷	+	+	+	+	-	۷/۷۸ ± ۱/۶۲
S ₆	۱۸	+	+	+	-	-	۲/۹۷ ± ۰/۱۷
S ₇	۱۳	+	+	+	-	-	۲/۵۱ ± ۰/۱۳
S ₈	۶	+	+	+	-	+	۴۴/۴۷ ± ۹/۳۷
S ₉	۷	+	+	+	+	-	۱۰/۳۲ ± ۳/۵۴
S ₁₀	۱۱	+	+	+	+	-	۹/۷۶ ± ۱/۶۵

علایم اختصاری: S=sample, اعداد کنار آن شماره دامداری است، + (وجود)، - (عدم وجود)، SE=Standard Error, Ngr/L (نانو گرم بر لیتر).

مقدار آفلاتوکسین موجود در نمونه ها رابطه غیرمستقیم داشت. بدین معنی که با افزایش مقدار سم در حفره‌ها از شدت رنگ کاسته می‌شد و حفره های 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. نمونه ها 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 استاندارد ها (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ قسمت در تریلیون) بر میزان جذب استاندارد صفر، ضرب در ۱۰۰، درصد جذب طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \text{جذب استاندارد صفر} / \text{جذب استاندارد (یا نمونه)} = \text{درصد جذب}$$

بر اساس درصد جذب نمونه های استاندارد و میزان آفلاتوکسین M₁ موجود در نمونه های استاندارد، منحنی کالیبراسیون رسم شد. به دنبال آن بر اساس درصد جذب هر نمونه شیر و انطباق با منحنی کالیبراسیون میزان آفلاتوکسین M₁ (ppt) هر نمونه به دست آمد (۲۲). لازم به ذکر است نمونه های شیر که غلظت آفلاتوکسین M₁ آنها به حدی نبود که روش الیزا قادر به شناسایی میزان آن باشد، شاخص آلودگی ۲/۵ نانوگرم در لیتر (۱/۲ حداقل غلظت قابل شناسایی) در نظر گرفته شد (جدول ۱).

آنالیز آماری: کلیه داده های آماری حاصل از مطالعات خوراک دام و آفلاتوکسین پس از ثبت، مرتب سازی و کد گذاری با استفاده از نرم افزارهای EXCEL و SPSS آنالیز شدند. برای یافتن ضریب همبستگی بین خوراک های دام و داده های حاصل از آزمایش آفلاتوکسین در فصول مختلف داده ها پس از ثبت و مرتب سازی به روش های اسپیرمن، کندال و پیرسون آنالیز گردیدند، که بهترین نتایج را روش پیرسون به دست داد. خلاصه این نتایج برای چهار فصل در جدول های ۲ تا ۵ آمده است.

جدول ۲: ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسین در فصل بهار در دامداری های مورد مطالعه به روش پیرسون با استفاده از نرم افزار SPSS

		Correlation (Spring)		
		Aflatoxin	Colza cake	Urea
Aflatoxin	Pearson correlation sig (2-tailed)		0.875**	0.875**
			0.00	0.00
Colza cake	Pearson correlation sig (2-tailed)	0.875**		1.000**
		0.00		0.00
urea	Pearson correlation sig (2-tailed)	0.875**	1.000**	
		0.00	0.00	

** P < 0.01 (به روش 2-tailed)

تعیین آفلاتوکسین شیر به روش ELISA: نمونه برداری از شیر دامداری‌ها بر اساس روش استاندارد ملی انجام شد. چربی شیر پس از سانتریفوژ کردن جدا و از شیر بدون چربی برای آزمایش استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد (۰/۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ قسمت در تریلیون) و نمونه های شیر آماده سازی شده را به کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتری به حفره های میکروپلیت اضافه و سپس به مدت یک ساعت به دور از نور و در درجه حرارت ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس مایع موجود در میکروپلیت خارج و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن به صورت وارونه بر روی کاغذهای جاذب رطوبت، مایع موجود در حفره ها به طور کامل تخلیه شد. سپس همه حفره ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شدند. هر بار بعد از تخلیه 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 اند، خارج شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول آفلاتوکسین کونژوگه شده با آنزیم (کیت Aflatoxin M₁-R-Biopharm, Germany) به حفره ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در انکوباتور ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از این زمان مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه و سپس همه حفره ها 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 می‌گرفت تا باقیمانده آب شستشو کاملاً خارج شود. سپس ۵۰ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر کروموزن به هر حفره اضافه شد. بعد از مخلوط کردن به آرامی، میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۰-۲۵ 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

جدول ۳: ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسین در فصل تابستان در دامداری های مورد مطالعه به روش پیرسون با استفاده از نرم افزار SPSS

		Correlation (Summer)		
		Aflatoxin	Tepax	Baking soda
Aflatoxin	Pearson correlation sig (2-tiled)		0.819**	0.819**
			0.004	0.004
Tepax	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.819**		1.000**
		0.004		0.00
Baking soda	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.819**	1.000**	
		0.004	0.00	

** P < 0.01 (به روش 2-tailed)

جدول ۴: ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسین در فصل پاییز در دامداری های مورد مطالعه به روش پیرسون با استفاده از نرم افزار SPSS

		Correlation (Autumn)			
		Aflatoxin	Ca ₂ PO ₄	Soya	S. serviseae
Aflatoxin	Pearson correlation sig (2-tiled)		0.903**	0.903**	0.916**
			0.00	0.00	0.00
Colza cake	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.903**		1.000**	
		0.00		0.00	
urea	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.819**	1.000**		
		0.004	0.00		
S. serviseae	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.916**			
		0.00			

** P < 0.01 (به روش 2-tailed)

جدول ۵: ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسین در فصل زمستان در دامداری های مورد مطالعه به روش پیرسون با استفاده از نرم افزار SPSS

		Correlation (Winter)			
		Aflatoxin	S. serviseae	Soya	Food complement
Aflatoxin	Pearson correlation sig (2-tiled)		0.914**	0.905**	0.905**
			0.00	0.00	0.00
S. serviseae	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.914**			
		0.00			
soya	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.805**	1.000**		
		0.004	0.00		
Food complement	Pearson correlation sig (2-tiled)	0.905**			
		0.00			

** P < 0.01 (به روش 2-tailed)

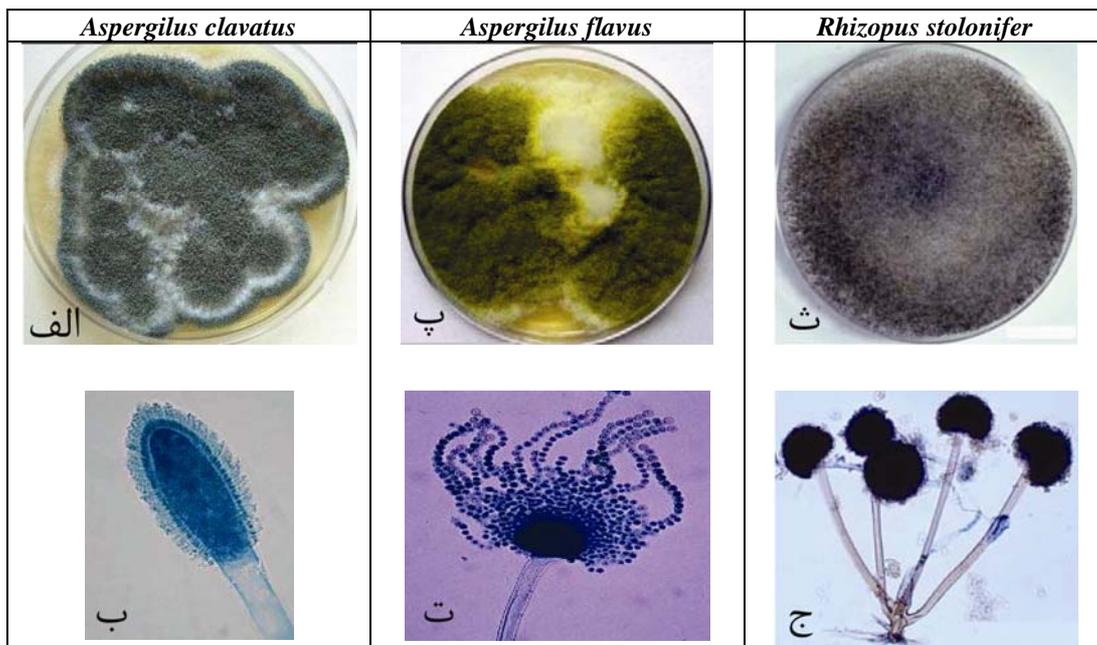
گونه‌های از کپک پنی سیلیوم و همچنان مخمر *Saccharomyces serviseae* نیز در خوراک های دام مورد بررسی، شناسایی و تشخیص داده شدند. نتایج مطالعه آفلاتوکسین سالانه در شیرهای غیر بسته بندی دامداری های مورد مطالعه نشان داد که آفلاتوکسین در همه آنها وجود دارد. جدول ۱ داده‌های حاصل از مطالعات خوراک دام و نانوگرم در لیتر آفلاتوکسین شیر را نشان می دهد. دامداری S₈ با دارا بودن ۴۴/۴۷ نانو گرم در لیتر بالاترین مقدار آفلاتوکسین و دامداری S₇ با ۲/۵۱ نانو گرم در لیتر کمترین مقدار آفلاتوکسین را دارا بودند. نمودار ۱ تراکم آفلاتوکسین فصلی را در نمونه شیر دامداری‌های مورد مطالعه نشان می دهد. دامداری های S₃ و S₈ به ترتیب بیشترین مقدار آفلاتوکسین را در فصول پاییز و

نتایج

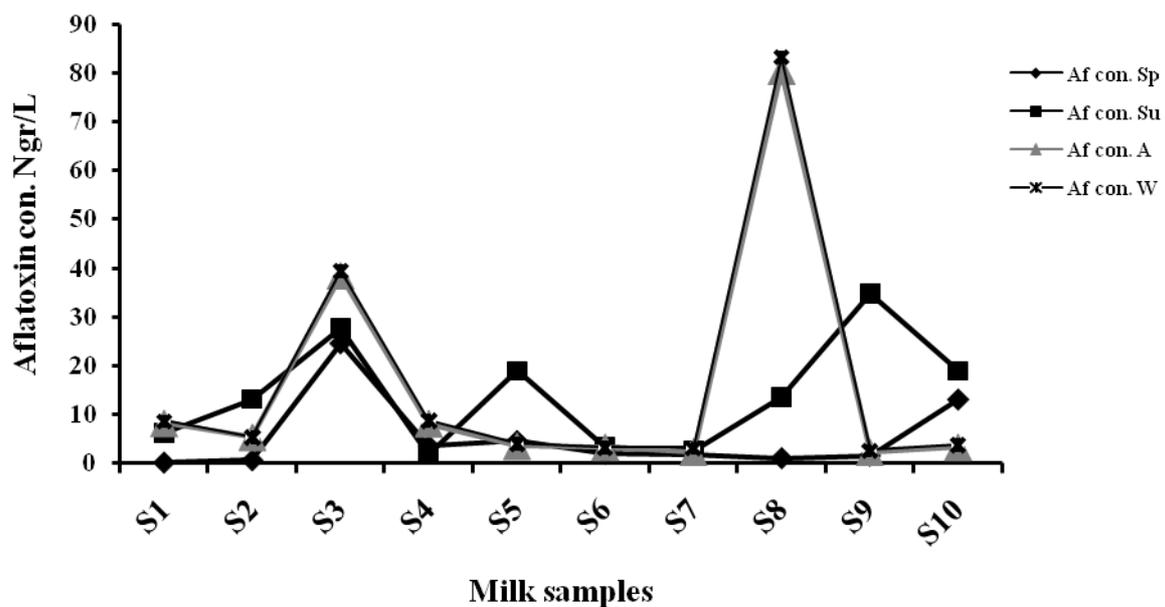
نتایج نشان داد بیشترین مواد تشکیل دهنده خوراک دام شامل ذرت، کنجاله پنبه دانه و کلزا، مکمل های غذایی، جو، سیوس گندم، نان خشک، پودر چربی و یونجه بوده و بیشترین آلودگی نیز مربوط به کپک های *A. flavus*، *Aspergillus clavatus* و *Rhizopus stolonifer* می باشد (شکل ۱). بررسی شکل و رنگ کلنی ها در پتری ها، ساختار میکروسکوپی تال، کنیدی بر، فیالیدها، شکل، اندازه، رنگ اسپورها و تجمع آنها و همچنین استفاده از کلیدهای قارچ شناسی و منابع معتبر تشخیص این گونه‌ها را امکان پذیر نمود. هر دو گونه اسپریلوس در تولید سم قارچی آفلاتوکسین نقش دارند اما گونه *A. flavus* بیشترین سهم را در تولید آفلاتوکسین دارا بود. علاوه بر گونه‌های نامبرده،

در خوراک دام و آلودگی شیر به آفلاتوکسین را تأیید نمود (جدول های ۲ تا ۵). در این جداول اعداد بالا ضریب همبستگی و اعداد پایین، معنی دار بودن این ضرایب را نشان می دهند.

زمستان نشان می دهند، در حالی که دامداری S₉ بیشترین مقدار آفلاتوکسین را در فصل تابستان دارا بود. همچنین نتایج آنالیز آماری داده های سالیانه خوراک دام و آفلاتوکسین به روش پیرسون وجود ضریب همبستگی قوی ($P < 0.01$) به روش 2-tailed بین کنجاله کلزا و سویا با کپک های جنس آسپرژیلوس



شکل ۱: گونه های کپک های جدا شده از خوراک دامها، تصاویر الف، پ و ث کلنی ها و تصاویر ب، ت و ج شکل میکروسکوپی هر یک از گونه ها را نشان می دهند



نمودار ۱: مقایسه تراکم آفلاتوکسین فصلی در نمونه شیر دامداری های مورد مطالعه در استان مرکزی.

علائم اختصاری: S=sample و شماره آن بیانگر شماره دامداری است. Ngr/L (نانو گرم بر لیتر)، Af con. Sp (تراکم آفلاتوکسین در فصل بهار)، Af con. Su (تراکم آفلاتوکسین در فصل تابستان)، Af con. A (تراکم آفلاتوکسین در فصل پاییز)، Af con. W (تراکم آفلاتوکسین در فصل زمستان).

بحث

بررسی بر روی خوراک دام های نمونه برداری شده از نقاط مختلف انبار خوراک دام ده دامداری سنتی و صنعتی در استان مرکزی نشان داد که ترکیب خوراک دام مورد استفاده در دامداری های مورد مطالعه متشکل از یونجه، ذرت، جو، کنجاله (کلزا، پنبه دانه)، سیوس گندم، نان خشک، پودر ماهی و چربی، مکمل های غذایی خوراک دام، مخلوط آنتی بیوتیک، چغندر خشک، گاه و آرد (جو، گندم) بودند. مطالعات میکروسکوپی ترکیبات خوراک دام نشان داد که گونه های *A. flavus*, *A. clavatus*, *P. notatum*, *R. stolonifer*, *S. cerevisiae* بر روی این مواد رشد نموده و آن ها را آلوده می سازند (جدول ۱). این مواد از نظر دارا بودن فاکتورهای لازم جهت رشد قارچ ها مانند pH، کربوهیدرات ها، چربی، املاح، نمک و فشار اسمزی برای رشد این کپک ها مناسب هستند (۲۳). آب و هوای گرم و مرطوب، انبارداری نامناسب و عدم اطلاع کافی دامداران در نگهداری صحیح خوراک دام شرایط مناسبی را برای رشد کپک ها فراهم می کند (۲۴ و ۲۵). گونه های *A. flavus*, *A. clavatus*, *R. stolonifer* به طور مشترک در همه دامداری های مورد مطالعه بر روی خوراک های دام یافت شده و سایر گونه های قارچ فقط در برخی از دامداری ها و در بعضی از فصول مشاهده گردیدند (جدول ۱). Sales و همکاران (۲۶) با مطالعه بر روی ۷۸ نمونه خوراک دام از کشورهای تایلند و ویتنام آلودگی ۹۴ درصد از نمونه ها را به گونه های *A. parasiticus* و *A. flavus* و سم آفاتوکسین گزارش نمودند. همچنین مطالعه بر روی نمونه های مختلف گندم، آلودگی به قارچ *A. flavus* را نشان داد (۲۷). نتایج با مطالعات Bergofer و همکاران در استرالیا مطابقت دارد (۲۸). آن ها در مطالعه بر روی گندم و آرد گندم مورد استفاده در خوراک دام دامداری های مورد مطالعه، کپک های *Aspergillus*، *Penicillium* و *Cladosporium* را جداسازی و شناسایی نمودند. مطالعه بر روی دانه های گندم، جو و ذرت مورد استفاده در دامداری های کشور کرواسی گونه *A. flavus* را به عنوان عامل اصلی آلوده کننده گزارش نمود (۲۹).

همانطور که مقایسه آفاتوکسین شیر سالانه در دامداری های مورد مطالعه استان مرکزی در (جدول ۱) نشان می دهد شیر دامداری S₈ با $9/37 \pm 44/47$ نانوگرم در لیتر بیشترین مقدار و شیر دامداری S₇ با $0/13 \pm 2/51$ نانوگرم در لیتر کمترین مقدار آفاتوکسین را نشان می دادند. همچنین مقایسه تراکم

آفاتوکسین فصلی در نمونه شیر دامداری های مورد مطالعه در استان مرکزی در نمودار ۱ نشان می دهد که شیر دامداری S₈ در فصول پاییز و زمستان دارای بیشترین مقدار آفاتوکسین است. بررسی محتویات خوراک دام، نسبت آنها و مطالعات قارچ شناسی در این فصول نشان داد که این دامداری از نان خشک آلوده به کپک های آسپرژیلوس استفاده می کند در حالی که دو دامداری S₆ و S₇ حداقل مقدار آفاتوکسین را در کلیه فصول نسبت به سایر دامداری ها نشان دادند. بررسی محتویات و نسبت خوراک دام در این دو دامداری در کلیه فصول نشان داد که آنها از یک روش تغذیه ای استاندارد در کلیه فصول سال پیروی می کنند و این سبب کاهش مقدار آفاتوکسین در شیر تولیدی آنهاست. این نتایج با مطالعه Panariti مطابقت دارد (۳۰). چنانکه او در مطالعات خود بر روی ۱۲۰ نمونه شیر بسته بندی نشان داد که ۳۰ درصد نمونه ها در فصل زمستان و ۳ درصد نمونه ها در تابستان دارای بیشتر از حد مجاز آلودگی آفاتوکسین هستند. در فصل پاییز و زمستان به دلیل عدم استفاده از علوفه تازه و همچنین استفاده از علوفه انباری در تغذیه دام ها و عدم رعایت شرایط نگهداری مناسب در انبارها میزان آلودگی بالاتر است (۳۱). تحقیقات بر روی شیرهای غیر بسته بندی در کشور آلبانی نشان داد که مقدار آفاتوکسین M₁ در شیر زمستان بیش از شیر تابستان است (۳۰). در مطالعه ای که با استفاده از روش TLC بر روی ۶۱ نمونه شیر (۵۲ نمونه شیر غیر بسته بندی و ۷ نمونه شیر بسته بندی) در ایران صورت گرفت، آلودگی شیرهای غیر بسته بندی به آفاتوکسین M₁ برابر ۹۲/۳ درصد گزارش گردید و در همه نمونه های شیر بسته بندی نیز آلودگی دیده شد. در این مطالعه گیتی و همکاران میزان آلودگی در شیرهای غیر بسته بندی را ۱۰-۶ میکروگرم در لیتر و در شیرهای بسته بندی را ۵-۱ میکروگرم در لیتر گزارش نمودند (۳۲). در مطالعه دیگری کامکار و همکاران (۳۳) با استفاده از روش الیاز، آلودگی ۷۳ نمونه از شیرهای تحویلی به کارخانجات شیر بسته بندی تهران به آفاتوکسین M₁ را ۸۲/۲ درصد با میانگین ۲۵۹/۵ نانوگرم در لیتر گزارش نمودند. تعداد ۶۰ نمونه شیر با (۸۲/۲ درصد) آلودگی و ۱۳ نمونه شیر (۱۷/۸ درصد) بدون آلودگی به آفاتوکسین نیز گزارش گردید.

جدول های ۲ تا ۵ نتایج حاصل از تحلیل ضریب همبستگی پیرسون را به وسیله نرم افزار SPSS بین ترکیبات خوراک دام مورد استفاده در دامداری های سنتی و صنعتی استان مرکزی و

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقایان دکتر دانشمند و دکتر رضایی در آزمایشگاه تشخیص طبی سینای اراک و همچنین خانم خدایی سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Alcroft R, Carnaghan RBA. Groundnut toxicity: *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary communication; Vet Rec. 1962; 74:863-864.
2. Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Fusconi G, Galvano M. Reduction of carry over of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbon. J of Food Protec. 1996; 59: 551-554.
3. Goldbatt, LA. Aflatoxin. New York: Academic Press. 1969; P: 1-40
4. Adams RS, Kenneth BK, Virginia AI, Lawrence JH, Gregory WR. Mold and mycotoxin problems in Livestock feeding. College of Agricultural Science, Penn State University Das. 1993; p: 125.
5. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett. 2002; 127: 19-28.
6. Chiavaro E, Asta CD, Galaverna G, biancardi A, Gambarelli E, Dossena A. New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxin in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancer added to the eluent. J Chromatogr A. 2001; 937: 31-40.
7. Salunkhe DK, Ad sole RN, Padule DN. Aflatoxins in foods and feeds. B.V.Gupta, managing. Director metropolitan. 1987.
8. Deshpande SS. Fungal Toxins. In S.S. Deshpande Handbook of food toxicology. 2002; P: 387-456.
9. Jay JM. Modern food microbiology. An Aspen publication. 2000; 595-600.
10. Watson DH. Natural Food Toxicants. England: Sheffield Academic Press. 1998; P.150-155.
11. Concon JM. Contaminates and additives' Food toxicology. Part B. New York: Marcel Dekker Inc.1988; p. 667-743.
12. Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Fusconi G, Galvano M. Reduction of carry over of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbon. J of Food Protec. 1996; 59:551-554.
13. Ellis JA, Harvey RB, Kubena LF. Reduction of aflataxin M₁ residues in milk utilizing hydrated sodiumcalcium alumino- silicate (abs). Toxicologist. 1995; 10: 163.

آفلاتوکسین در فصول مختلف سال نشان می‌دهند. در این جدول‌ها رابطه قوی بین برخی از ترکیبات خوراک دام و آفلاتوکسین دیده می‌شود ($P < 0.01$). جدول ۲ همبستگی بین کنجاله کلزا و اوره را با آفلاتوکسین در فصل بهار و جدول ۳ ضریب همبستگی قوی بین تپاکس و جوش شیرین را با آفلاتوکسین در فصل تابستان نشان می‌دهد. چنانکه در جدول ۴ مشاهده می‌شود سویا، فسفات کلسیم و مخمر *Saccharomyces servisiae* با مقدار آفلاتوکسین در فصل پاییز ضریب همبستگی قوی دارند. در جدول ۵ نیز مکمل‌های غذایی، سویا و مخمر *S. servisiae* ضریب همبستگی قوی را با آفلاتوکسین در فصل زمستان نشان می‌دهند ($P < 0.01$). این نتایج نشان می‌دهد که وجود مخمر در ترکیب خوراک دام سبب افزایش اسیدیته و فراهم نمودن شرایط مساعد برای رشد بیشتر کپک‌ها و در نتیجه تولید آفلاتوکسین می‌گردد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که در فصل بهار و تابستان مقدار کپک‌های آسپرژیلوس محدود و مقدار آفلاتوکسین پایین می‌آید. میزان آلودگی شیر در فصول پاییز و 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 دامداری‌های سنتی از رژیم غذایی استاندارد استفاده نمی‌شود. احتمال وجود آفلاتوکسین در دامداری‌های 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 تأمین کننده شیر، دامداری‌های سنتی و صنعتی هستند، آلودگی خوراک دام به آسپرژیلوس سبب تولید آفلاتوکسین در شیرهای بسته بندی هم می‌شود. نهایتاً از آنجا که منبع اصلی تهیه شیرهای بسته بندی و غیر بسته بندی 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.

14. Egmond HP, van Paulsch WE, Veringa HA, Schuller PL. The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. Arch. Inst. Pasteur Tunis. 1983; 54: 381-90.
15. Van Egmond HP, Current situation on regulations for mycotoxins overview of tolerances and status of standard method of sampling and analysis. Food additives and contaminants. 1989; 6: 139-188.
16. Henry J, Whitaker H, Rabbani TI, Bowers J, Park D, Price W. Aflatoxin M₁ the codex committee. Food Additives and contaminants. 2000; 135.
17. John, R. Crowther, The Elisa Guidebook, New York: Humana Press. 2000; p.352.
18. Zeini F, Emami M. Medical mycology. Tehran University Publisher. 2009; 330-340 and 530-535 (in Persian).
19. Yazdanparast A. Medical mycology. Jihad-e-Daneshgahi Publisher. 2007; p: 76-159 (in Persian).
20. Kasra-Kermanshahi R, Tavakoli A. Pigments and their using in microbiology and laboratory sciences. Isfahan: Jihad-e-Daneshgahi Publisher. 2003; p: 122-127 (in Persian).
21. Esfandiari E. Medical mycology and clinical methods. Tehran: Jihad-e-Daneshgahi Publisher. 1990; p: 61-62 (in Persian).
22. Ersali E, Bahaedin Beigi F, Ghasemi R, Ersali M. Aflatoxin transition from feed to cow and pasteurized milk in Shiraz and its suburbs. 12th national congress of Iran environmental health. 2009 (in Persian).
23. Kaufman P. Mushroom poisoning: syndromic diagnosis and treatment. Food addit. Contam. 2007; 157 (19, 20): 493-502.
24. Lanyasunya TP, Wamae LW, Musa, HH. The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. Pakistan J of Nutrition. 2005; 4 (3): 162-169.
25. Thompson C, Henke SE. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production and its associated risk to wildlife species. J of Wild life Diseases. 2000; 36: 172-179.
26. Sales AC, Yoshizawa T. Updated profile of aflatoxin and aspergillus section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. J of Toxicol. 2005; 22: 429-439.
27. Stubblfield RD, Shotwell OL, Hesseltine CW. Production of aflatoxin on wheat and oats: measurement with a recording densitometer. Appl Microbiol. 1967; 15 (1): 186-190.
28. Berghofer LK, Hocking AD, Miskelly D. Microbiology of wheat and flourmilling in Australia. Int J Food Microbiol. 2003; 85 (1-2): 137-149.
29. Halt M. Aspergillus flavous and aflatoxin B₁ in flour production. Eur J Epidemiol. 1994; 10 (5): 555-558.
30. Panariti E. Seasonal variations of aflatoxin M₁ in the farm milk in Albaina. Arh Hig Rada Toksikol. 2001; 52 (1): 37-41.
31. Mokhtarian-Dalooi H, Mohsenzadeh M. Studies of pasteurized milk aflatoxin M₁ in Gonabad. Ofogh-e Danesh (Journal of Gonabad Medical Sciences and Health and Iatric Services). 2005; 11 (3).
32. Giti K, parvaneh V, Kordi H. Study of milk contamination to aflatoxin in Region Tehran. Iranian J of Hygiene. 1982; 1-3.
33. Kamkar A, Giti K. Effect of sodium bisulphate on M₁ aflatoxin of milk. J of Research and Constructiveness. 1999; 44: 112-116.