



"مقاله پژوهشی"

سنجهش آفلاتوکسین M1 در شیر گاوداری‌های سنتی منطقه زنجان در طول یک سال

حمیدرضا میرزاپی الموتی^۱, بهنام رستمی^۲, بهمن فرجمند^۳, مینا وزیری گهر^۴, عباس بهاری^۵ و کامیلا ولی‌بور^۶

^۱- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان، (نویسنده مسؤول): alamoutih@znu.ac.ir

^۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

^۳- دانشیار شیمی تجزیه، گروه شیمی دانشگاه زنجان

^۴- محقق ارشد شرکت آئی زیست دام، مرکز رشد دانشگاه زنجان

^۵- استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان

^۶- دامپزشک، اداره کل دامپزشکی استان زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۰

صفحه: ۱۳۴ تا ۱۴۰

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: نگرانی‌ها در ارتباط با سموم قارچی در شیر و فرآورده‌های آن جهانی است و مراکز کنترل کیفی محصولات دامی به طور مداوم آن‌ها را کنترل و پایش می‌کنند و در صورت وجود مقادیر بیش از حد مجاز، عرضه کنندگان اختار دریافت می‌کنند. آفلاتوکسین‌ها مواد سمی تولید شده روی فرآورده‌های کشاورزی هستند که برخی از آنها اثرات جهش‌زاپی و سلطان‌زاپی دارند. این مواد ترکیبات ثانویه قارچ‌ها هستند که از نظر ساختمان شیمیایی و منشاء تولید و اثرات بیولوژیکی متفاوت هستند. بازده انتقال آفلاتوکسین B1 از خوراک به M1 در شیر در گاوهای کم تولید ۱ تا ۲ درصد و در گاوهای پرتوولید، تا ۶ درصد گزارش شده است که با توجه به افزایش تولید شیر گاوهای امروزی اهمیت آن بیشتر نیز خواهد شد. لزوم توجه به این سوموم و پایش مداوم آنها بایستی از برنامه‌های اصلی بخش نظارت و کنترل کیفی فرآورده‌های کشاورزی و دامی باشد. پژوهش حاضر به منظور ارزیابی و پایش سم آفلاتوکسین M1 در شیر ارسالی به سکوهای جمع‌آوری شیر در شهرستان زنجان طی چهار فصل سال انجام شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری شیر از سکوهای جمع‌آوری به طور تصادفی در یکی از روزهای هر فصل انجام شد. نمونه‌ها سانتریفیوژ شدن و لایه چربی رویی برداشته شد و شیر باقیمانده در فریزر نگهداری شد. پس از بین گشایی غلظت آفلاتوکسین M1 در شیر باقی مانده با روش الیزای رقابتی تعیین شد. داده‌های به دست آمده در فصول مختلف در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز امارات شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که همه نمونه‌ها به سم آلوهه بودند، اول میزان آلوهه (۵۰ ng/L) کمتر بود. ۱۸/۵ درصد از نمونه‌ها، غلظتی بیشتر از حد مجاز اروپا (۵۰ ng/L) داشتند که کمترین میزان آلوهگی در فصل بهار (صغر درصد) و بیشترین میزان در فصل زمستان (۳۵/۲ درصد) ثبت شد. هیچ یک از نمونه‌ها غلظتی بالاتر از حد مجاز جهانی و ایران را نداشتند. میانگین غلظت سم در کل نمونه‌ها (۱۶ تا ۱۲۹) و در بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۳۴، ۵۲ و ۶۴ نانوگرم در لیتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که میانگین غلظت سم آفلاتوکسین M1 در شیر نمونه‌های ارزیابی شده کمتر از حد مجاز جهانی بود ولی به دلیل آلوهگی تعدادی از نمونه‌ها به ویژه در فصل زمستان توجه به کنترل و پایش مداوم شیر و توصیه‌های ویژه به عرضه کنندگان ضرورت دارد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین شیر، گاوداری سنتی، پایش شیر، کنترل کیفی شیر

دی-فورانوکومارین‌ها به طور معمول ۴ تا از آنها (B1, B2, G1, G2) خوراک دام را آلوهه می‌کنند (۴). بخشی از آفلاتوکسین B1 (AFB1) خورده شده توسط حیوان نشخوارکننده در شکمبه تجزیه می‌شود و بخشی از آن نیز جذب شده و وارد کبد شده و به آفلاتوکسین M1 تبدیل می‌شود که بسیار سمی بوده و از طریق شیر و ادرار دفع می‌شود (۲۲). آفلاتوکسین M1 در مقابل حرارت مقاوم است و با فرآیندهای حرارتی از بین نمی‌رود. این ماده خطرناک وارد زنگیره غذایی انسان به ویژه اطفال می‌شود که از حساسیت بالاتری برخوردارند. بازده انتقال آفلاتوکسین B1 از خوراک به M1 در شیر در گاوهای کم تولید ۱ - ۲ درصد و در گاوهای پرتوولید، تا ۶ درصد گزارش شده است (۲) که با توجه به افزایش تولید شیر گاوهای امروزی اهمیت آن بیشتر نیز خواهد شد. میزان این آلوهگی از حیوانی به حیوان دیگر فرق کرده و همچنین در روزهای مختلف شیردهی نیز متفاوت است. حدود ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از مصرف AFB1 مقدار AFM1 در شیر افزایش می‌یابد و ۷۲ ساعت پس از قطع مصرف آن غلظت AFM1 به سطح غیرقابل تشخیص می‌رسد. رابطه‌ای خطی بین غلظت آفلاتوکسین شیر و خوراک وجود دارد (۲). آفلاتوکسین B1 و M1 به ترتیب در کلاس یک و دو سلطان‌زاپی برای انسان قرار دارند. حیوانات

مقدمه حدود ۵ میلیارد نفر در کشورهای در حال توسعه در خطر آلوهگی به سموم قارچی هستند که حدود ۳۰ درصد از کل موارد سرطان کبد ناشی از این آلوهگی می‌باشد و هر ساله حدود ۶ هزار نفر به این سموم آلوهه می‌شوند. طبق گزارش سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (۸) از کل شیر تولیدی در دنیا، سهم شیر گاو ۸۳ درصد، گاویمیش ۱۳ درصد، بز ۲ درصد، گوسفند ۱ درصد، شتر ۰/۳ درصد بوده و بقیه متعلق به دامهای دیگر است. مروری بر غلظت مایکوتوكسین‌ها در شیر و فرآورده‌های آن نشان می‌دهد که غلظت آنها بر حسب شرایط مختلف و تعیین حد مجازها و قوانین در کشورهای مختلف به شدت متفاوت است (۳). عده کشورها، حد مجاز تعیین شده در آمریکا ($0.5 \mu\text{g/kg}$) را برای شیر و فرآورده‌های آن پذیرفته‌اند (۳). کمیسیون اروپا مقادیر حداقلی سخت‌گیرانه‌تری ($0.05 \mu\text{g/kg}$) را اعلام نموده است (۲۷).

آفلاتوکسین‌ها مواد سمی تولید شده روی فرآورده‌های کشاورزی هستند که برخی از آنها اثرات جهش‌زاپی و سلطان‌زاپی دارند. این مواد ترکیبات ثانویه قارچ‌ها هستند که از نظر ساختمان شیمیایی و منشاء تولید و اثرات بیولوژیکی متفاوت هستند. از ۲۰ نوع آفلاتوکسین متعلق به گروه بزرگ

سانتی‌گراد برسد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور پاستریفیوژ شدند و لایه رویی حاوی چربی با استفاده از پیست پاسترور حذف شد. مایع زیرین باقیمانده برای انجام آزمون الایزا مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری آفلاتوكسین M1 موجود در نمونه‌ها از روش الایزا رقابتی استفاده شد. برای این کار از RIDASCREEN® Aflatoxin M1 Biopharm آلمان که يك ايميونوحايس آنزييم رقابتی برای تعیین آفلاتوكسین M1 در شیر و شیر خشک می‌باشد استفاده شد. مراحل طبق دستورالعمل کیت تجاری انجام شد. به طور خلاصه: یکصد میکرولیتر از نمونه‌های شیر چربی‌زدایی شده در چاهک‌های جداگانه قرار گرفت. از استانداردهای شماره یک تا شش به مقدار ۱۰۰ µL داخل چاهک‌ها ریخته شد. پلیت به آرامی با چرخاندن، مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در تاریکی قرار گرفت. مایع موجود در حفرات، تخلیه و داخل آنها سه بار با بافر شستشوی تعییه شده در کیت، شسته شد. ۱۰۰ µL کوتزوگه آنژیمی که به نسبت ۱ به ۱۱ در بافر شماره دو رقیق شده بود، به هر حفره اضافه و بعد از مخلوط شدن به آرامی، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس مایع موجود در حفرات، تخلیه شده و داخل آنها سه بار با بافر شستشوی، شسته شد. ۱۰۰ µL از سوبستای کروموزن، اضافه شده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای محیط انکوبه شد. برای ختم واکنش، ۱۰۰ µL محلول متوقف کننده افزوده شد و حداقل تا ۱۵ دقیقه بعد، جذب حفرات در طول موج ۴۵۰ nm در مقابل بلانک هوا قرائت شد. برای محاسبه غلظت توکسین در نمونه‌ها از منحنی استاندارد لگاریتمی استفاده شد. حد پایین تشخیص آفلاتوكسین M1 از کیت ۵ نانوگرم در کیلوگرم بود و ضریب تغییرات اینتراسی و اینترالاسی به ترتیب ۴/۸ و ۵/۳ درصد بود. پس از قرائت نتیجه الایزا، با تقسیم جذب استاندارد شماره یک (کنترل منفی، فاقد آفلاتوكسین M1) و ضرب آن در عدد ۱۰۰، درصد جذب استانداردها مشخص شد. سپس با قراردادن لگاریتم غلظت استانداردها روی محور افقی و درصد جذب آنها در طول موج ۴۵۰ نانومتر روی محور عمودی، منحنی استاندارد در نرم افزار اکسل رسم و غلظت سم در نمونه‌های مجھول با اعمال ضرایب رقت محاسبه شد.

داده‌های به دست آمده در فصل‌های مختلف با نرم افزار SAS و با دستورات Means و Univariate، GLM آنالیز شدند. فصل سال به عنوان اثر ثابت در قالب طرح کاملاً تصادفی لحاظ شد. آمار توصیفی از داده‌ها به دست آمد. فراوانی‌ها گزارش شد و مقایسه میانگین فصل‌ها با آزمون توکی انجام شد. سطح احتمال معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

آمار توصیفی از سکوهای جمع‌آوری شیر نشان داد (جدول ۱) که از ۵۰ متفاضی سکوداری ۲۵ سکو فعال بود که برخی

مختلف پاسخ‌های متفاوتی به غلظت سم در بدن نشان می‌دهند. علاوه بر تفاوت‌های بین گونه‌ای، تفاوت‌های داخل گونه‌ای و حتی بین جنس نر و ماده نیز وجود دارد (۲). گزارش‌ها از ایران نشان می‌دهد که بیش از ۷۰ درصد نمونه‌های شیر آلدود به آفلاتوكسین M1 است (۶). آلدودگی به آفلاتوكسین در شیر خام ۰/۰۱۵ تا ۰/۰۲۸ (۶) و در شیر پاستوریزه شده با دمای بالا ۰/۰۰۶ µg/kg تا ۰/۰۱۶ (۶) بوده است. رحیمی (۲۴) با جمع ۲۰۱۱ آوری ۲۰۰ نمونه شیر از سوپرمارکت‌های ایران از سال ۲۰۱۲ نشان داد که ۷۵ درصد نمونه‌ها به سم آفلاتوكسین آلدود بودند و میزان آلدودگی در دامنه ۰/۳ ng/L تا ۱۴/۳ ng/L میزان ۵۷۲/۲ قرار داشت. تاج کریمی و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲۶) میزان آلدودگی در شیر را در ۰/۰۳۹ و ۰/۰۷۷ درصد از نمونه‌ها کمتر از حد مجاز ۰/۰۵ µg/kg تا ۰/۰۱ (۰) و نعمتی و همکاران (۲۰) به طور متوسط ۰/۰۳۹ µg/kg گزارش کردند. محققین دیگر (۲۵، ۲۶) ۱۰۰ درصد نمونه‌ها را آلدود و بیش از حد مجاز اروپا گزارش کردند. این در حالیست که آلدودگی‌های کمتری از حد مجاز اروپا (کمتر از ۱۵ درصد) نیز گزارش شده است (۱۵). برخی از گزارش‌ها نیز تغییرات غلظتی را در فضول مختلف سال گزارش کرده‌اند (۱۰). با توجه به مطالب ذکر شده، لزوم توجه به این سموم و پایش مداوم آنها بایستی از برنامه‌های اصلی بخش نظارت و کنترل کیفی فرآوردهای کشاورزی و دامی باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گروه علوم دامی دانشگاه زنجان با همکاری اداره کل دامپژوهی استان زنجان از اول بهار ۱۳۹۷ تا پایان زمستان ۱۳۹۷ انجام شده است.

جمع‌آوری نمونه‌های شیر

اطلاعات مربوط به تعداد و پراکنش مراکز جمع‌آوری شیر در شهرستان زنجان از اداره کل دامپژوهی استان تهیه شد. از تعداد ۵۲ سکو، تعداد ۲۷ مورد به عنوان سکوی فعل شناخته شدند که در فصل‌های بهار و زمستان ۱۷ سکو و در تابستان و پاییز ۱۸ سکو فعل بودند. نمونه‌های حاصل از سکوهایی که فقط در یک فصل فعل بودند حذف شد. نمونه‌گیری در چهار مرحله در تاریخ‌های ۹۷/۲/۱۵، ۹۷/۵/۱، ۹۷/۸/۱ و ۹۷/۱۰/۱۵ در محل سکوها انجام شد. برای نمونه‌گیری از ظروف مخصوص استریل شده ۲۰ میلی‌لیتری استفاده شد. نمونه‌های شیر از مخزن اصلی هر مرکز جمع‌آوری شیر برداشته شد و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. در ادامه و پس از سانتریفیوژ نمونه‌های شیر (۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) لایه چربی روی شیر برداشته شد و شیر باقیمانده در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد، نگهداری شد. در ادامه، نمونه‌های فریز شده در کنار یخ خشک و در محفظه‌های یونولیتی به آزمایشگاه مرجع و مورد تایید منتقل شدند تا غلظت آفلاتوكسین M1 آنها تعیین شود.

اندازه‌گیری آفلاتوكسین M1

برای آماده‌سازی نمونه‌ها، نمونه‌های شیر در یخچال معمولی قرار گرفت تا دمای آن به کمتر از ۱۰ درجه

(جدول ۳). این میانگین‌ها در فصول مختلف تفاوت معنی‌داری داشتند ($p < 0.01$)^۴. مایکوتوكسین‌ها مواد بیولوژیکی هستند که به دنبال رشد قارچ‌های توکسین‌زا در مواد غذایی تولید شده و کیفیت بهداشتی آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهند^۴. بنابراین برای تامین سلامت مصرف‌کنندگان لازم است وجود و مقدار مایکوتوكسین‌های مختلف در مواد غذایی به طور مداوم اندازه‌گیری شده و برای به حداقل رساندن آنها در زنجیره غذایی برنامه‌ریزی شود. نتایج ما نشان داد که ۱۰۰ درصد از نمونه‌های شیر مورد بررسی در این مطالعه به آفلاتوکسین M1 آلوده بودند. گزارشات مختلفی در مورد شیوع آلودگی نمونه‌های شیر به آفلاتوکسین M1 وجود دارد و مطالعات قبلی در ایران نیز در بیشتر موارد، درصد بالایی از آلودگی را نشان داده‌اند. به طوری که کریم و کامکار در مطالعه‌ای^{۱۷} ۸۲/۲ درصد و در مطالعه‌ای دیگر^{۱۶} ۹۲/۳ درصد نمونه‌های شیر تهران را آلوده به آفلاتوکسین M1 گزارش کردند و مطالعه کامکار^{۱۴} نشان داد که ۷۶ درصد از نمونه‌های شیر آزمایش شده به این آفلاتوکسین آلوده بودند. در مطالعه غیاثیان^{۱۰}، شیوع آلودگی ۶۴ درصد گزارش شد و تاج کریمی و همکاران^{۱۶} نشان دادند که همه نمونه‌های شیر که از پنج ناحیه جغرافیایی مختلف تهیه شده بودند به این مایکوتوكسین آلوده بودند. همچنین البرزی و همکاران در سال ۲۰۰۶، با مطالعه ۶۲۴ نمونه شیر پاستوریزه در شیراز^{۱۱}، اویسی و همکاران با مطالعه ۱۲۸ نمونه شیر پاستوریزه در تهران^{۲۱}، موثق غازانی^۹ (۹) با مطالعه ۵۰ نمونه شیر پاستوریزه در تبریز و نعمتی و همکاران^{۲۰} با بررسی ۹۰ نمونه شیر پاستوریزه در اردبیل نشان دادند که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها به آفلاتوکسین M1 آلوده بودند. شیر کاملاً عاری از آفلاتوکسین مطلوب است اما رسیدن به این شخص مطلوب به آسانی امکان‌پذیر نیست. بنابراین تمام کشورها (بستگی به شرایط خاص خود)، آلودگی شیر با مقادیری از این سم را می‌پذیرند^{۲۰}. در برخی از مطالعات انجام شده در ایران، استاندارد ایران را 500 ng/L و در برخی نیز 50 ng/L و یا فاقد استاندارد ملی معرفی نموده‌اند^{۱۰}. در بسیاری از مطالعات نیز استاندارد اروپا (۱۰، ۱۱، ۱۰، ۱۶، ۲۱، ۲۶)، یا استاندارد آمریکا^{۲۳} به عنوان ملاک عمل ارزیابی در نظر گرفته شده است. بر اساس حد مجاز 500 ng/L ، هیچ یک از نمونه‌های مورد ارزیابی در این پژوهش به مایکوتوكسین در مقادیر بیشتر از حد مجاز آلوده نبودند.

از این تعداد فاقد پروانه تاسیس یا بهره برداری بودند. از ظرفیت اسمی 40100 لیتر شیر در روز به طور متوسط روزانه 18175 لیتر به سکوها عرضه شده و به مقاصد نهایی عرضه می‌شد. به طور کلی 12 سکو، شیر را به مغازه‌های لبنياتی سنتی در شهر عرضه می‌کردند، دو سکو به اتحادیه‌ها تحويل می‌دادند و سه سکو به صنایع پنیر سازی و یک سکو نیز به کارخانه پگاه زنجان تحويل می‌دادند. کل اعضای هر سکو در طول سال متغیر بود ولی در فصل تابستان تعداد عرضه کنندگان شیر به سکوها کمتر بودند. در فصل تابستان حدود 150 نفر کمتر از فصل بهار بودند که احتمالاً به دلیل افزایش مصرف و تبدیل خانگی توسط تولیدکنندگان کوچک و یا اهتمام به فعالیت‌های دیگر کشاورزی و نداشتن وقت و نیروی انسانی کافی برای ارسال به سکوها باشد. علی‌رغم تعداد عرضه کنندگان مشابه در فصول بهار و پاییز و زمستان، مقدار شیر عرضه شده به سکوها در پاییز، 9 تن کمتر از بهار می‌باشد که به نظر می‌رسد با توجه به روش پرورش سنتی، زایش‌ها عمده‌تا در فصل زمستان اتفاق افتاده و اوج تولید شیر در فصل بهار است. این نحوه پرورش در سیستم‌های مزرعه‌ای به زنده‌مانی گوساله و افزایش تولید و کاهش هزینه کمک می‌کند. به علاوه این که ابستنی مجدد را تسهیل می‌کند و تعداد گاوها بیشتری در بهار در اوج تولید شیر هستند و تعداد گاوها بیشتری در پاییز در اوخر دوره شیردهی هستند و میانگین تولید عرضه کنندگان در این فصل پایین است. آمار توصیفی از غلظت آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر جمع آوری شده از سکوها شهرستان زنجان نشان داد (جدول ۲) که میانگین غلظت این سم در کل نمونه‌ها $44/12 \text{ ng/L}$ بود که حداقل آن 16 ng/L و حداکثر آن 129 ng/L و میانه 44 ng/L بود. تمام نمونه‌های مورد ارزیابی به آفلاتوکسین آلوده بودند ولی فقط $18/5$ درصد از نمونه‌ها غلظتی بیشتر از حد مجاز اروپا (50 ng/L) داشتند و هیچ یک از نمونه‌ها غلظتی بیشتر از حد مجاز، 3 ng/L نمونه (500 ng/L) نداشتند. از 13 نمونه بیشتر از حد مجاز، 3 نمونه غلظتی برابر با 52 ng/L و 10 نمونه غلظتی بین 100 ng/L تا 129 ng/L داشتند. غلظت سم در هیچ یک از نمونه‌های فصل بهار بیشتر از حد مجاز نبود. $5/5$ درصد از نمونه‌های فصل پاییز و $27/7$ درصد از نمونه‌های فصل تابستان و $35/3$ درصد از نمونه‌های فصل زمستان از حد مجاز اروپا بیشتر بودند. متوسط غلظت آفلاتوکسین در فصل‌های بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب $25/11 \text{ ng/L}$ ، $52/61$ و $25/22 \text{ ng/L}$ بود که کمترین در فصل بهار و بیشترین در فصل زمستان بود

جدول ۱- آمار توصیفی از سکوها جمع آوری شیر شهرستان زنجان

Table 1. Descriptive statistics of the milk collection stations in Zanjan's areas

کارخانه	پنیرسازی	اتحادیه	لبنياتی	دامنه	میانگین (انحراف میار)	ظرفیت فعلی (لیتر)	ظرفیت اسمی (لیتر)	تعداد اعضا (نفر)	کل میانگین (انحراف میار)	کل	کل دامنه	کل دامنه	کل سال
۱	۳	۲	۱۲	-۲۰۰	100.9 ± 99.3	۱۸۱۷	۵	۴۰۱۰۰	-۵	45 ± 62	۳۰۰	-۵	بهار
				۵۰۰					۳۰۰				
۱	۳	۲	۱۱	-۵۰۰	1311 ± 1216	۲۳۶۰	.		-۱۳	47 ± 66	۷۱	-۱۳	تابستان
				۵۰۰					۳۰۰				
۱	۳	۲	۱۲	-۳۰۰	100.5 ± 10.31	۱۸۱۰	.		-۱۳	39 ± 46	.	-۱۳	
				۴۰۰					۳۰۰				
۱	۳	۲	۱۲	-۲۰۰	80.5 ± 78.6	۱۴۵۰	.		-۵	46 ± 66	۸۳	-۵	پاییز
				۳۵۰					۳۰۰				
۱	۳	۲	۱۱	-۲۰۰	91.6 ± 8.01	۱۶۵۰	.		-۵	46 ± 67	۸۳	-۵	زمستان
				۳۰۰					۳۰۰				

جدول ۲- آمار توصیفی از بررسی غلظت آفلاتوکسین M1 (نانوگرم در لیتر) در شیر جمع‌آوری شده از سکوهای شهرستان زنجان

فصل سکوی شیر)	تعداد نمونه میانگین معیار	انحراف میانگین	ضریب تغییرات	میانه	کمبینه بیشینه (درصد)	استاندارد اروپایی	فراآنی بالاتر از جهانی و ایران (درصد)	تعداد نمونه
کل	۴۴/۱۲	۳۰/۲۳	۳/۰	۱۶	۳۴	۱۲۹	۱۰۰	۱۸/۵
بهار	۲۵/۱۱	۲۲/۰	۳/۳	۴۹	۱۶	۱۰۰	.	.
تابستان	۵۲/۶۱	۴۰/۰	۶۲/۴	۱۳۹	۲۴	۱۰۰	۲۷/۷	.
پاییز	۳۴/۲۲	۲۵/۴	۸/۶۷	۵۲	۱۸	۱۰۰	۵/۵	.
زمستان	۶۴/۶۴	۳۷/۰	۶۳/۹۷	۱۲۱	۲۲	۱۰۰	۳۵/۳	.

جدول ۳- میانگین غلظت آفلاتوکسین M1 شیر جمع‌آوری شده از سکوهای شهرستان زنجان در طول سال

حروف متفاوت در يك سطر بيانگر تفاوت معنی دار مي باشد.	افلام	باير	تابستان	پاييز	زمستان	باير	افتراض استاندارد ميانگين	احتمال معنی داري	فصل
ج	۲۵/۱۱	۵۲/۶۱	۳۷/۰	۶۳/۹۷	۶۴/۶۴	۶/۴۷	۰/۰۱	۰/۰۱	آفلاتوکسین M1 (ng/L)

بیش از دو برابر میزان استاندارد بود (۱۱). در اردبیل (۱۵)، سراب (۵) و گناباد (۱۴) و این مطالعه نیز بیشترین غلظت در فصل زمستان گزارش شده است. در حالی که در تهران (۲۶) بیشترین غلظت آلوودگی در تابستان بدست آمده است. در شهر سراب نیز مانند این مطالعه کمترین غلظت آفلاتوکسین (۵) در بهار مشاهده شده است. آلوودگی غذای دام به آفلاتوکسین B1 (پیش ساز M1) مهمترین عامل آلوودگی شیر به آفلاتوکسین M1 محسوب می‌شود و حضور آفلاتوکسین B1 در علوفه خود نشانگر فراهم بودن شرایط برای رشد قارچها و تولید این مایکوتوكسین است. در فصول سرد برای تنفسی دام‌های شیری به جای علوفه تازه علوفه خوارک و خوارک کنسانترهای ای انبارشده استفاده می‌شود که احتمال رشد قارچها و ایجاد آفلاتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین B1 در آنها بیشتر است و حضور آفلاتوکسین M1 در شیر را به دنبال دارد. هر چند به درستی اشاره شده است که به طور کلی خوارک‌های انباری باعث افزایش آلوودگی شیر به آفلاتوکسین می‌شوند و از آنجا که این خوارک‌های انباری بیشتر در فصل سرما مورد استفاده قرار می‌گیرند غلظت آفلاتوکسین در شیر بیشتر است اما در مطالعه حاضر غیر از فصل سرما، نمونه‌های شیر در تابستان نیز غلظتی بالاتر از بهار و پاییز دارند. به نظر می‌رسد زمان استفاده از خوارک‌های ذخیره شده در پیرامون شهر زنجان با قاعده کلی استفاده از این مواد کمی متفاوت است. در این منطقه گله‌داران کوچک در کنار مراحل کاشت و داشت و برداشت علوفه گاوها را به چرا می‌برند و در فصل گاو و اوایل اردیبهشت یونجه را برای کاهش آفتها توسط گاو و گوسفند می‌چرانند و همچنین در پاییز نیز برداشت‌های پایانی را انجام داده و گاوها از علوفه پس چر استفاده می‌کنند و از آنجا که در این زمان‌ها گاوها ممکن است این منابع علوفه‌ای تازه هستند لذا غلظت سم در بهار و پاییز کمتر است. اما در تابستان به دلیل اینکه چین‌های دوم و سوم یونجه را برداشت می‌کنند و کشاورزان نمی‌توانند گاوها را به زمین‌های یونجه برای چرا برند و از منابع ذخیره‌ای استفاده می‌کنند غلظت سم کمی افزایش داشته است هر چند به میزان غلظت آن در زمستان نیست. فلاخ و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۷) نشان دادند که غلظت آفلاتوکسین در دام‌های چراگر (بز و گوسفند)

در مطالعات مشابه انجام شده در ایران، نسبت نمونه‌های بیشتر از مقادیر غیرمجاز دامنه وسیعی را نشان می‌دهند. همه نمونه‌های آلوودگی به آفلاتوکسین M1 در مطالعه کریم و کامکار در سال ۲۰۰۰ (۱۷) به مقادیر بیشتر از حد مجاز ایران آلوودگی داشتند. در حالی که در مطالعه تاج کریمی و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲۶) مشابه پژوهش حاضر، علیرغم آلوودگی همه نمونه‌ها به این مایکوتوكسین، غلظت سم در هیچ یک از آنها فراتر از حد مجاز نبود. در سایر مطالعات تاییجی مایبن این دو مطالعه به دست آمده است، به طوری که نسبت نمونه‌های غیرمجاز در مطالعه کامکار در سال ۲۰۰۵ به میزان ۴۰ درصد (۱۲)، البرزی و همکاران ۱۷/۸ درصد (۱)، اویسی و همکاران ۷۸ درصد (۲۱)، غیاثیان و همکاران ۱۱/۸ درصد (۱۰)، موشق غازانی ۶۲ درصد (۹) و نعمتی و همکاران ۳۳/۳ درصد (۲۰) گزارش شده است. رحیمی و همکاران هیچ یک از نمونه‌های خود را با آلوودگی بیشتر از حد مجاز گزارش نکردند، اما ملاک ارزیابی در مطالعه آنها، استاندارد ایالات متحده (۵۰۰ ng/L) بوده است (۲۳) که اگر استاندارد ۵۰ را به عنوان ملاک در نظر بگیریم، ۲۹/۸ درصد از نمونه‌های مثبت آن مطالعه دارای آلوودگی بیشتر از حد مجاز بوده‌اند.

میانگین غلظت آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های زمستانی و تابستانی به طور معنی داری بیشتر از نمونه‌های شیر تهیه شده در بهار و پاییز بود. در برخی از مطالعات، تأثیر فصل بر آلوودگی شیر به آفلاتوکسین M1 مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای اختلاف آلوودگی نمونه‌های شیر در فصول مختلف معنی دار نبود (۲۶). اما در مطالعه کامکار در سال ۲۰۰۵، آلوودگی نمونه‌های شیر پاییز و زمستان بیشتر از نمونه‌های بهار و تابستان گزارش شد (۱۳). در مطالعه غیاثیان و همکاران در سال ۲۰۰۷ آلوودگی نمونه‌های زمستان بیشتر از تابستان بود (۱۰) و بررسی نعمتی و همکاران در سال ۲۰۱۰، آلوودگی بیشتر شیرهای زمستان و بهار نسبت به شیرهای تابستان و پاییز را نشان داد (۲۰). این اختلافات به تفاوت تقدیم دام‌های شیری در فصول سرد و گرم نسبت داده شده است (۲۰). در برخی موارد میزان آلوودگی در زمستان بیش از ماههای دیگر بود. بطور مثال در سال ۱۳۸۶ در بابل میزان آلوودگی در زمستان بیش از چهار برابر استاندارد (۱۷) و در زمستان ۱۳۸۷

سم 30 ± 30 و دامنه آن از 16 ng/L - 129 ng/L بود. ۱۳ نمونه از 70 نمونه اندازه گیری شده از حد مجاز اروپا (50 ng/L) بالاتر بودند که سه مورد آن نزدیک به حد مجاز (52 ng/L) بود و 10 مورد دیگر بین $100 - 129 \text{ ng/L}$ بود. بیشترین غلظت سم در فصل زمستان ($64 \pm 41 \text{ ng/L}$) و کمترین غلظت در فصل بهار ($25 \pm 8 \text{ ng/L}$) مشاهده شد. علی‌رغم اینکه مقادیر اندازه گیری شده در سطوح خطرناک نیست ولی با توجه به تغییرات بسیار زیاد این سم در طول سال و شرایط تعذیب دام و انتقال شیر به محل‌های عرضه سنتی، توجه و پایش مداوم این سم در شیر ضرورت دارد.

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان از معاونت پژوهشی و بخش ارتباط با صنعت دانشگاه زنجان و اداره کل دامپزشکی استان زنجان جهت حمایت مالی اجرای پژوهش تشکر می‌نمایند.

در استان یزد کمتر از حد مجاز و کمتر از شیر گاوها پرورش یافته در جایگاه‌های صنعتی است. نکته قابل ذکر اینکه نمونه‌های مورد ارزیابی در این مطالعه از گاوها کم تولید به دست آمده است و در گاوها کم تولید ۱ تا ۲ درصد از آفلاتوکسین خوارک در مقایسه با گاوها پرتوالید (۵ تا ۶ درصد) می‌تواند به شیر منتقل شود (۲)، لذا چراگر بودن گاوها در این فصول و میزان انتقال کم سم از خوارک به شیر می‌تواند از دلایل پایین بودن غلظت آفلاتوکسین در شیر ارسال شده به سکوهای جمع‌آوری در شهرستان زنجان باشد.

نتیجه گیری کلی

نتایج اندازه گیری‌های آفلاتوکسین M1 در شیر ارسال شده به سکوهای شیر شهرستان زنجان در کل سال ۱۳۹۷ نشان داد که کلیه نمونه‌های مورد ارزیابی به این سم آلوده بودند اما میزان آلودگی در تمام موارد از حد مجاز تعریف شده جهانی (500 ng/L) کمتر بود. میانگین و انحراف معیار میزان

منابع

1. Alborzi, S., B. Pourabbas, M. Rashidi and B. Astaneh. 2006. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz. *Food Control*, 17: 582-4.
2. Applebaum, R.S., R.E. Brackett, D.W. Wiseman and E.H. Marth. 1982. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *Journal Dairy Science*, 65: 1503-1508.
3. Becker-Algeri, T.A., D. Castagnaro, K. de Bortoli, C. de Souza, D.A. Drunkler and E. Badiale-Furlong. 2016. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. *Journal of Food Science* 81: 544-552.
4. Bezerra da Rocha, M.E., F. da Chagas Oliveira Freire, F. Erlan Feitosa Maia, F. Florindo Guedes and M.I. Rondina. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36: 159-165.
5. Davoudi, Y. and Y. Garedaghi. 2011. Survey on contamination raw milks with Aflatoxin M1 in the Sarab region, Iran. *Research Journal Biology Science*, 6: 89-91.
6. Fallah, A.A. 2010. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 988-991.
7. Fallah, A.A., R. Fazlollahi and A. Emami. 2016. Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk of four dairy species in Yazd, Iran. *Food Control*, 68: 77-82.
8. FAO. Dairy Animals. 2015. Available from: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milkproduction/dairy-animals/en/#.VS6myfB5JOY>.
9. Ghazani, M.H. 2009. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz. *Food Chemical Toxicology*, 47: 1624-5.
10. Ghiasian, S.A., A.H. Maghsood, T. Neyestani and S.H. Mirhendi. 2007. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk during the summer and winter seasons in Hamedan, Iran. *Journal Food Safety*, 27: 188-98.
11. Habibipour, R., A.R. Khosravi, A. Amirkhani and S. Bayat. 2010. A study on contamination of raw milk with Aflatoxin M1 at the Hamedan province, Iran. *Global Veterinaria*, 4: 789-94.
12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2001. Maximum validity Maycotoxins in human food. Tehran: Iran National Standard (In Persian).
13. Kamkar, A. 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, 16: 593-9.
14. Kamkar, A. 2008. Detection of aflatoxin M1 in powdered milk samples by ELISA. *Pajouhesh-v-Sazandegi*, 79: 174-80 (In Persian).
15. Kamkar, G.H., R. Jahed Khaniki and A. Alavi. 2011. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produce in Ardebil of Iran. *Iran. Journal Environment Health Science Engineering*, 2: 123-8.
16. Karim, G., S. Bokaei and A. Khorasani. 1982. Study on the contamination of milk with aflatoxin in Tehran. *Journal of Iran Public Health*, 11: 19-23 (In Persian).
17. Karim, G. and A. Kamkar. 2000. A study on the effect of lactoperoxidase system (LPS) and LPS plus riboflavin on the aflatoxin M1 in milk. *Veterinary Journal of Tehran University*, 55: 5-7 (In Persian).
18. Liu, Y., and F. Wu. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environment Health Perspective*, 118: 818-824.
19. Martins, M.L. and H.M. Martins. 2000. Aflatoxin M1 in raw and ultra-high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Additive Contamination*, 17: 871-4.

20. Nemati, M., M. Mesgari Abbasi, H. Parsa Khankandi and M. Ansarin. 2010. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control*, 21: 1022-4.
21. Oveisi, M.R., B. Jannat and N. Sadeghi. 2007. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control*, 18: 1216-8.
22. Panahi, P., S. Kasaee and A. Mokhtari. 2011. Assessment of aflatoxin M1 contamination in raw milk by ELISA in Urmia, Iran. *American Eurasian Journal Toxicology Science*, 3: 231-3.
23. Rahimi, E., M. Bonyadian, M. Rafei and H.R. Kazemeini. 2010. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chemical Toxicology* 48: 129-31.
24. Rahimi, E. 2014. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Iran. *Toxicology and Industrial Health*, 30: 750-754.
25. Sefidgar, S.A.A., M. Mirzae, M. Assmar and S.R. Naddaf. 2011. Aflatoxin M1in pasteurized milk in Babol city, Mazandaran Province, Iran. *Iranian Journal Public Health*, 40: 115-18.
26. Tajkarimi, M., S.S. Ghaemmaghami, A. Motalebi, H. Pouroltani, A. Salahnejad and F. Shojaee. 2007. Seasonal survey in content M1 aflatoxin in raw milk taken from 15 dairy factories. *Pajouhesh & Sazandegi*, 75: 2-9 (In Persian).
27. The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364: 1-24.

Aflatoxin M1 Assay in Milk Samples Collected from Zanjan Area's Conventional Dairy Farms throughout the Year

**Hamidreza Mirzaei-Alamouti¹, Behnam Rostami², Bahman Farajmand³,
Mina Vazirigohar⁴, Abbas Bahar⁵ and Camila Valipour⁶**

1- Associate Professor, Department of Animal Sciences, University of Zanjan, Iran,
(Corresponding Author: alamouthi@znu.ac.ir)

2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, University of Zanjan, Iran

3- Associate Professor of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Zanjan, Iran

4- Senior Researcher at Ati Zist Dam Company, University Incubator Center, University of Zanjan, Iran

5- Assistant Professor, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Iran

6- Veterinarian, Veterinary Administration Office of Zanjan, Iran

Received: 3 November, 2020 Accepted: 11 September, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: There is a global concern about presence of mycotoxins in milk and dairy products and governmental quality control centers continuously qualify and monitor these products, and milk producers might charge bill if their products are contaminated with aflatoxins. The current project was conducted to qualify and monitor aflatoxin M1 in milk supplied to milk-collecting- stations in Zanjan's area during all seasons of the year.

Material and Methods: Milk samples were randomly collected a day in each season. Milk sample tubes were centrifuged, and top layer of fat was harvested, and aflatoxin M1 of milk was determined by ELISA method.

Results: All samples had contamination with aflatoxin M1; however, contamination was lower than that of global standard (500 ng/L). 18.5 percent of the samples had contamination with aflatoxin M1 based on European limits (50 ng/L), with 0 percent in spring and 35.3 percent in winter. The mean concentration of aflatoxin M1 in samples was 44ng/L (16 to 129) and its content was 25, 52, 34, and 64 ng/L in spring, summer, fall, and winter respectively.

Conclusions: Although aflatoxin M1 concentration of collected milk samples was lower than the limit, but continuous qualifying and monitoring of milk supplied to dairy factories or traditional market must be done and producers should try to keep a low level of toxins in their products.

Keywords: Aflatoxin M1, Milk monitoring, Milk quality control, Traditional dairy farming