



## بررسی میزان افلاتوکسین M1 در نمونه های شیر کارخانه های لبنیاتی گیلان به روش الیزا

محمود نجفیان<sup>۱\*</sup>، بهاره نجفیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، <sup>۲</sup>کارشناس، آموزش و پرورش ناحیه ۴ شیراز، گروه زیست شناسی، شیراز

### چکیده

آفلاتوکسین M1 از متابولیت های آفلاتوکسین B1 است و در شیر حیواناتی که با غذای آلوده تغذیه شده باشند یافت می گردد. وجود آفلاتوکسین M1 در شیر باعث ایجاد مشکلاتی در انسان مانند سرکوب سیستم ایمنی، ایجاد جهش، ناقص الخلقه زایی و سرطان می شود. این مطالعه با هدف ارزیابی میزان افلاتوکسین M1 در نمونه های شیر کارخانه های لبنیاتی گیلان به روش الیزا انجام شد. در این مطالعه مقطعی، در مجموع ۱۰۰ نمونه شیر به طور تصادفی در فصل های مختلف (هر فصل ۵ نوبت) از ۵ کارخانه شیر در استان گیلان در سال ۱۳۹۱ جمع آوری گردید. میزان غلظت آفلاتوکسین M1 در نمونه های مورد نظر با روش الیزا مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع نمونه ها، ۱۱ نمونه (۱۱ درصد) دارای آلودگی کمتر از حد مجاز کدکس (۵۰ ng/l) بودند. نمونه های فصل تابستان با میانگین آلودگی ۷۰/۹۲ نانوگرم بر لیتر کمترین و فصل زمستان با میانگین آلودگی ۱۳۷ نانوگرم بر لیتر بیشترین میزان آلودگی را داشتند. کارخانه (ب) با میانگین سالانه ۱۳۵/۱۵ ng/l و کارخانه (د) با میانگین سالانه ۶۰/۹۰ ng/l به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی را دارا بودند. با توجه به اینکه ۸۹ درصد نمونه های شیر آلودگی بیش از حد مجاز داشتند و آلودگی شیر می تواند مشکلات فراوانی برای سلامت جامعه ایجاد نماید، بنابراین لازم به نظر می رسد که شیر و فرآورده های آن به صورت دوره ای برای میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1 تحت کنترل قرار گیرند. همچنین غذای دام ها باید به گونه ای نگهداری شود که به قارچ های مولد آفلاتوکسین آلوده نگردد.

واژگان کلیدی: گیلان، شیر، آفلاتوکسین M1، الیزا.

پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۳

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۳

### مقدمه

آلودگی خوراک دام به کپک ها و به ویژه گونه های آسپرژیلوس سبب تولید آفلاتوکسین و انتقال آن به شیر و فرآورده های آن می شود (۱ و ۲). وجود رطوبت در مواد غذایی باعث افزایش درصد تجزیه و از بین رفتن آفلاتوکسین ها در برابر حرارت می شود. این کار تحت تأثیر هیدرولیز حلقه لکتونی در غلظت های مؤثر رطوبت و درجه حرارت انجام می گیرد. حضور رطوبت در محیط سبب تحریک واکنش های شیمیایی در موقعیت های مختلف برخی میکوتوکسین ها شده و در نتیجه سمیت آن ها را تغییر می دهد (۳). تاکنون ۱۷ نوع آفلاتوکسین در طبیعت شناسایی شده است

شیر و فرآورده های لبنی بخشی از غذای اصلی انسان به شمار می روند. تحقیقات نشان می دهد که بین مصرف فرآورده های لبنی و سطح سلامت افراد جامعه به لحاظ کارایی، ضریب هوشی و تنظیم فعالیت های متابولیکی بدن، ارتباط نزدیکی وجود دارد (۱). از این رو بهداشت و سلامت شیر و فرآورده های آن از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. از طرفی سلامت شیر، به سلامت دام ها و خوراک آنها بستگی دارد (۲). پژوهش های مختلف بر روی خوراک دام نشان داده است که

(\* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۹۱۷۱۹۰۱۷۴۲ پست الکترونیک: mn.najafian@yahoo.com

برای تشخیص و اندازه گیری آفلاتوکسین موجود در مواد غذایی، روش های متعددی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، کروماتوگرافی مایع باکالرایی بالا (HPLC) و ELISA وجود دارد (۱۷). امروزه روش الایزا به دلیل سرعت، دقت و حساسیت بالا بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از این مطالعه ارزیابی میزان آفلاتوکسین M1 در نمونه های شیر کارخانه های لبنیاتی گیلان به روش الایزا بود.

### مواد و روش ها

**الف) نمونه گیری:** در این مطالعه مقطعی، در مجموع ۱۰۰ نمونه شیر به طور تصادفی در فصل های مختلف (هر فصل ۵ نوبت) از ۵ کارخانه شیر در استان گیلان در سال ۱۳۹۱ جمع آوری گردید. حجم شیر نمونه برداری شده در هر نوبت ۲۵۰ میلی لیتر بود. به منظور آماده سازی نمونه ها مقدار ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه در دمای ۱۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعتی معادل ۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. سپس چربی به وسیله پیست پاستور کاملاً حذف و مایع زیرین برای آزمایش AFM1 مورد استفاده قرار گرفت.

**ب) روش الایزا:** میزان AFM1 موجود در نمونه ها با روش الایزا و با استفاده از کیت آفلاتوکسین AFM1 (Aflatoxin M1-R-Biopharm, Germany-kit) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده اندازه گیری شد.

**ج) تجزیه و تحلیل داده ها:** به منظور مقایسه میزان آفلاتوکسین نمونه ها، از نسخه بیست و دوم نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه چند گانه بین گروه های مختلف (مقایسه میزان آلودگی بین فصل های مختلف و همچنین میزان آلودگی بین کارخانه های مختلف) از آزمون Turkey's post hoc استفاده گردید. مرز معنی داری بر روی  $p < 0/05$  قرار داده شد.

### یافته ها

نتایج آزمایشات نشان داد که تمام نمونه ها در بردارنده مقادیر قابل سنجش آفلاتوکسین M1 می باشند. جدول ۱ میانگین

که آفلاتوکسین های G1، G2، B1 و B2 مهمترین آنها به شمار می روند (۴). مصرف خوراک دام آلوده به آفلاتوکسین های B1 و B2 توسط گاوهای شیری، سبب هیدروکسیله شدن این سموم و تبدیل به آفلاتوکسین های M1 و M2 می شوند که در شیر قابل ردیابی هستند (۵ و ۶). اگرچه سمیت آفلاتوکسین M1 (AFM1) از پیش ساز آن کمتر است. اما هر دو سرطان زا هستند و توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان، آفلاتوکسین B1 در گروه ۱ و آفلاتوکسین M1 در گروه ۲ مواد سرطان زا طبقه بندی شده اند (۷).

آفلاتوکسین M1 به حرارت پاستوریزاسیون، اتوکلاو و دیگر روش های سالم سازی مواد غذایی مقاومت نشان می دهد (۸). در حیوانات آفلاتوکسین می تواند سبب آسیب کبدی، کاهش باروری، جهش زایی، ناقص الخلقه زایی، مرگ جنینی، تومور و سرکوب سیستم ایمنی شود. در پرندگان موجب کاهش تخم و در دام ها موجب کاهش شیر می گردد (۹).

آلودگی مواد غذایی به سم آفلاتوکسین امروزه از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و سازمان های جهانی مانند سازمان بهداشت جهانی (WHO)، سازمان غذا و دارو (FAO) و کمیته تغذیه کدکس (Codex Alimentarius Commission=CAC) حداکثر میزان آلودگی مجاز مواد غذایی مختلف را به سم آفلاتوکسین تعیین کرده اند (۱۰ و ۱۱). شورای هماهنگی کدکس غذایی ایران حد مجاز میزان AFM1 را در شیر ۵۰ نانوگرم بر لیتر تعیین نموده است. در بسیاری از ۱۶۵ کشور عضو کمیته تغذیه ای کدکس، مانند استرالیا، آلمان، آمریکا، ترکیه و فرانسه حد مجاز میزان AFM1 در شیر ۵۰ نانوگرم بر لیتر است (۱۰-۱۲).

نتایج برخی تحقیقات، حاکی از آلودگی نسبی شیرهای مصرفی دارد. به عنوان مثال در مطالعات انجام شده در ژاپن (۱۳) و آلبانی (۱۴) مشخص گردید که بخش زیادی از نمونه ها به AFM1 آلودگی داشته اند.

مطالعات مشابه انجام شده در شهرهای مختلف ایران نیز یافته مشابهی داشتند. به طوری که بیشتر نمونه های شیر آلودگی بیش از حد مجاز استاندارد داشتند (۱۵ و ۱۶).

گرفت. گزارش های متعددی از آلودگی شیر به سم AFMI وجود دارد (۱، ۲، ۱۵ و ۱۶).

در پژوهش حاضر تمامی نمونه های جمع آوری شده آلوده به AFMI بودند. از این تعداد ۱۱ درصد آلودگی زیر حد مجاز استاندارد کدکس (۵۰ نانوگرم برلیتر)، ۳۸ درصد نمونه ها حدود دو برابر حد مجاز، ۴۰ درصد نمونه ها تا حدود سه برابر و ۱۱ درصد نمونه ها بیش از سه برابر حد مجاز آلودگی داشتند. در مجموع ۸۹ درصد نمونه ها دارای آلودگی بیش از حد مجاز کدکس بودند. در مطالعات انجام شده در ایران و جهان نیز میزان آلودگی شیر به AFMI بالا گزارش شده است.

برای مثال در بابل تمامی نمونه های مورد آزمایش (۱۵)، در اهواز بیش از نیمی از نمونه های مورد بررسی (۱۶) و در ترکیه ۶۴ درصد نمونه های مورد آزمایش (۱۰) آلودگی بیش از حد مجاز کدکس داشتند. نتایج مطالعه حاضر با یافته های این تحقیقات هم خوانی دارد.

در این مطالعه نمونه های جمع آوری شده در فصل های مختلف سال میزان آلودگی متفاوتی داشتند. به طوری که به ترتیب فصل های زمستان، بهار، پاییز و تابستان رتبه های ۱ تا ۴ را از نظر آلودگی دارا بودند. از آنجایی که یکی از عوامل موثر بر رشد قارچ و تولید افلاتوکسین وجود رطوبت می باشد (۱۴). بنابراین شیوع بالای افلاتوکسین در فصل زمستان را

میزان آلودگی شیرکارخانه ها را در فصل های مختلف سال نشان می دهد. نمونه های فصل تابستان با میانگین آلودگی ۷۰/۹۲ نانوگرم بر لیتر کمترین و فصل زمستان با میانگین آلودگی ۱۳۷ نانوگرم بر لیتر بیشترین میزان آلودگی را داشتند. کاهش میزان آلودگی در فصل تابستان نسبت به بهار و پاییز معنی دار بود. همچنین افزایش میزان آلودگی در زمستان نسبت به بقیه فصل های سال نیز معنی دار بود ( $P < 0/05$ ).

کارخانه (ب) با میانگین آلودگی سالانه ۱۳۵/۱۵ نانوگرم بر لیتر بیشترین و کارخانه (د) با میانگین آلودگی سالانه ۶۰/۹۰ نانوگرم بر لیتر کمترین میزان آلودگی را دارا می باشند. کارخانه (الف) و کارخانه (د) با یکدیگر تفاوت معنادار نداشتند. کارخانه (ب) نسبت به کارخانه (ج) تفاوت معنادار اما نسبت به کارخانه (ه) تفاوت معنادار نداشت ( $P < 0/05$ ). از نظر توزیع میزان آلودگی نمونه ها، مشخص گردید که تعداد ۱۱ نمونه آلودگی کمتر از ۵۰ نانوگرم بر لیتر و ۱۱ نمونه آلودگی بیش از ۱۵۰ نانوگرم بر لیتر را داشتند. بقیه نمونه ها نیز دارای آلودگی بین ۵۱ تا ۱۵۰ نانوگرم بر لیتر بودند.

## بحث

در مطالعه حاضر میزان افلاتوکسین MI در نمونه های شیر کارخانه های لبنیاتی گیلان با روش الایزا مورد ارزیابی قرار

جدول ۱: میانگین میزان AFMI (برحسب ng/l) در نمونه های شیر کارخانه ها در فصل های مختلف سال (میانگین ها به همراه انحراف استاندارد آورده شده اند).

سال	زمستان	پاییز	تابستان	بهار	فصل ← کارخانه
میانگین (تعداد)	میانگین (تعداد)	میانگین (تعداد)	میانگین (تعداد)	Mean±SD (تعداد)	لبنیاتی ↓
۸۱/۹۵±۲۱/۳۸ (۲۰)	۱۱۱/۰۰±۵/۸۵ (۵)	۷۹/۰۰±۵/۶۱ (۵)	۵۴/۰۰±۷/۳۴ (۵)	۸۳/۸۰±۲/۱۷ (۵)	کارخانه (الف)
۱۳۵/۱۵±۲۹/۱۲ (۲۰)	۱۷۶/۰۰±۶/۴۰ (۵)	۱۳۰/۰۰±۳/۰۸ (۵)	۹۷/۰۰±۳/۰۸ (۵)	۱۳۷/۶±۴/۸۲ (۵)	کارخانه (ب)
۱۰۸/۸۵±۲۶/۲۲ (۲۰)	۱۴۵/۰۰±۷/۴۵ (۵)	۱۰۵/۰۰±۲/۵۵ (۵)	۷۴/۰۰±۳/۶۷ (۵)	۱۱۱/۴۰±۳/۴۳ (۵)	کارخانه (ج)
۶۰/۹۰±۱۸/۷۲ (۲۰)	۸۶/۰۰±۶/۴۰ (۵)	۵۸/۰۰±۸/۹۷ (۵)	۳۸/۰۰±۴/۶۴ (۵)	۶۱/۶۰±۸/۲۹ (۵)	کارخانه (د)
۱۲۸/۰۵±۲۷/۷۱ (۲۰)	۱۶۷/۰۰±۶/۵۹ (۵)	۱۲۳/۶۰±۲/۳۰ (۵)	۹۱/۶۰±۳/۳۶ (۵)	۱۳۰/۰۰±۱/۵۸ (۵)	کارخانه (ه)
۱۰۲/۹۸±۲۷/۲۴ (۱۰۰)	۱۳۷/۰۰±۳۵/۱۶ (۲۵)	۹۹/۱۲±۲۸/۰۹ (۲۵)	۷۰/۹۲±۲۳/۱۶ (۲۵)	۱۰۴/۸۸±۲۹/۴ (۲۵)	میانگین (تعداد)

سنتی است (۱). شاید بتوان یکی از دلایل متفاوت بودن میزان آلودگی شیر کارخانه ها در پژوهش حاضر را به نوع تغذیه و نوع نگهداری دام ها (سنتی یا صنعتی) نسبت داد.

### نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان می دهد که تمامی نمونه شیرهای جمع آوری شده در تمامی فصل های سال به AFM1 آلوده بودند. از این میان تنها ۱۱ درصد نمونه ها میزان آلودگی زیر حد مجاز کدکس داشتند. پیشنهاد می گردد که سازمان های مربوطه مانند وزارت جهاد کشاورزی به منظور کاهش میزان آلودگی به آفلاتوکسین در مراکز جمع آوری شیر از راهکارهای مناسبی مانند کنترل خوراک دام و علوفه، وضعیت انبارداری و نگهداری علوفه و غذای دام ارایه نمایند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت محترم غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی گیلان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

می توان به بارندگی زیاد و رطوبت بالا نسبت داد. در بررسی مشابهی در آلبانی تعداد نمونه شیرهایی که آلودگی بیش از حد مجاز داشتند در فصل زمستان دو برابر فصل تابستان گزارش شده است (۱۴). دلیل اصلی این اختلاف، رطوبت بیشتر در فصل زمستان ذکر شده است. همچنین دلیل دیگری که برای آلودگی بیشتر در فصل زمستان ذکر شده، عدم دسترسی به علوفه تازه و استفاده از خوراک های انباری برای دام ها می باشد (۱).

نتایج تحقیق حاضر با یافته مطالعات یاد شده هم خوانی دارد. در این پژوهش نمونه های جمع آوری شده سالانه در کارخانه های مختلف، میزان آلودگی متفاوتی داشتند. به طوری که شیر کارخانه های ب، ه، ج، الف و د به ترتیب رتبه های ۱ تا ۵ آلودگی را به خود اختصاص دادند.

در مطالعه ای که بر روی میزان آفلاتوکسین M1 شیر و خوراک دام مصرفی در استان مرکزی انجام گرفت، مشاهده گردید که بین میزان بهداشت تغذیه دام و میزان آلودگی شیر دام ها ارتباط معناداری وجود دارد. به طوری که در دامداری های صنعتی میزان آلودگی کمتر از دامداری های

## References

1. Ranjbar S, Noori M, Nazari R. Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province. J Cell Tissue. 2010; 1(1): 9-18.
2. Han RW, Zheng N, Wang JQ, Zneh YO, Xu XM, Li SL. Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. Food Control. 2013; 34(1): 35-39.
3. Cheraghali A, Yazdanpanah H, Doraki N, Aboulhossain G, Hassibi M, Aliabadi S. Incidence of aflatoxin in Iran pistachio nuts. Food Chem Toxicol. 2007; 45(5): 812-816.
4. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol Lett. 2002; 127(1): 19-28.
5. 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(1): 31-40.
6. Sumantri I, Murti TW, Poel AFB, Boehm J, Agus A. Carry-over of aflatoxin B1-feed in to aflatoxin M1-milk in dairy cow treated with natural sources of aflatoxin and bettonit. J

- Indonesian Trop Anim Agr. 2012; 37(4): 271-277.
7. Nemati M, Mesgari Abbasi M, Parsa Khankandi H, Ansarin M. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. Food Control. 2010; 21(7):1022-1024.
  8. Choudhary PL, Sharma RS, Borkhartria VN. Effect of chilling and heating on aflatoxin M1 content of contaminated Indian cow's milk. Egypt J Dairy Sci. 1998; 26(1): 223-229.
  9. Messripour M, Gheisari MM. Occurrence of aflatoxin B in some feedstuffs in Isfahan. J Res Agr Sci. 2010; 6(1): 47-53.
  10. Celik TH, Belgin Sarımehtoglu B, Kuplulu O. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. Vet Arhiv. 2005; 75(1): 57-65.
  11. Hassan HF, Kassaify Z. The risks associated with aflatoxins M1 occurrence in Lebanese dairy products. Food Control. 2014; 37(1): 68-72.
  12. Khoshpey B, Farhud DD, Zaini F. Aflatoxins in Iran: Nature, hazards and carcinogenicity. Iranian J Publ Health. 2011; 40(4): 1-30.
  13. Nakajima M, Tabatas AH. Occurrence of aflatoxinM1 in domestic milk in Japan during the winter season. Food Addit Contam. 2004; 21 (5): 472-481.
  14. Panariti E. Seasonal variations of aflatoxin M1 in the farm milk in Albania. Arh Hig Rada Toksikol. 2001; 52(1): 37-41.
  15. Sefidgar SAA, Mirzae M, Assmar M, Naddaf SR. Aflatoxin M1 in pasteurized milk in Babol city, Mazandaran province, Iran. Iran J Public Health. 2011; 40(1): 115-118.
  16. Rahimi E, Hosseini M, Moradi M, Rezaei P, Arab M, Goudarzi MA, Esfahani M, Torki Z. Aflatoxin M1 in pasteurized milk and white cheese in Ahvaz, Iran. Global Vet. 2012; 9(4): 384-387.
  17. 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.



## Investigation of the level of aflatoxin M1 in milk samples of Gilan dairy factories using ELISA

**Mahmood Najafian<sup>1</sup>, Bahareh Najafian<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Biology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

<sup>2</sup>B.Sc., Department of Biology, Shiraz Education District 4, Shiraz, Iran.

### **Abstract**

Aflatoxin M1 is a metabolite of aflatoxin B1 that is found in milk when lacteal animals are fed with contaminated feedstuff. The presence of aflatoxin M1 causes major disorders in humans, including immunosuppressive, mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects. The aim of this study was to investigate the occurrence of aflatoxin M1 in milk of dairy factories of Gilan using ELISA. In this study, totally 100 sample milk were collected in different seasons (5 times in each season) from five dairy factories in Gilan province, randomly. Then samples were examined for the presence of aflatoxin M1 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Totally 11 samples (11%) showed contamination less than the limit level of codex (50 ng/l). Winter samples with an average of 138 ng/l and summer samples with an average 70.92 ng/l had the most and the least amount of contamination, respectively. Factories B and D with yearly average of 135.15 and 60.90 ng/l had the most and the least amount of contamination, respectively. Due to contamination of 89 % of milk samples with high levels of this toxin, and since this contamination can lead to public health problems, it looks necessary a routine serial control of milk and its products. Furthermore, control of foods from mold pollution is the best protection method for prevention of milk from pollution with aflatoxins.

**Keywords:** Gilan, Milk, Aflatoxin M1, ELISA.

---

**Correspondence to:** Mahmood Najafian

Tel: +989171901742

E-mail: [mn.najafian@yahoo.com](mailto:mn.najafian@yahoo.com)

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 248-253.