

تعیین میزان آفلاتوکسین B1 در مواردی از خوراک دام گاوداری های شیری شهرستان تربت حیدریه

هادی حسن نیا و محسن وظیفه دوست ۲

۱ دانشجوی دکتری رشته زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور،

دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران (نویسنده مسوول)

hadi.hasannia2020@gmail.com

۲ گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir

چکیده

آفلاتوکسین ها سموم طبیعی هستند که انواع گوناگونی از غذای انسان و خوراک دام را آلوده می کنند و منجر به تهدید سلامت انسان و دام می شوند. این مواد به عنوان یکی از بارزترین آلوده کننده های مواد غذایی که بهداشت عمومی، امنیت غذایی و اقتصاد ملی بسیاری از کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می دهند مورد بررسی قرار می گیرند. بنابراین هدف این تحقیق، تعیین میزان آفلاتوکسین B1 در مواردی از خوراک دام گاوداری های شیری شهرستان تربت حیدریه می باشد. برای این منظور، خوراک دام ۵ گاوداری شیری اطراف شهر تربت حیدریه از آبان ماه ۱۳۹۷ تا مرداد ماه ۱۳۹۸ انتخاب و بررسی گردید. آفلاتوکسین موجود در خوراکی های (سیلو ذرت، کنسانتره، خوراک آماده و کاه) گاوهای شیری به روش الیزا اندازه گیری شد. یافته ها نشان داد میانگین آلودگی اقلام خوراکی در فصل پاییز ۲۴/۵۹ میکروگرم در کیلوگرم، در فصل زمستان ۴۸/۴۲ میکروگرم در کیلوگرم، در فصل بهار ۲۸/۶۷ میکروگرم در کیلوگرم و در فصل تابستان ۲۱/۷۱ میکروگرم در کیلوگرم به دست آمد. بیشترین میزان آلودگی آفلاتوکسین B1 بین سه جز خوراک بررسی شده، مربوط به نمونه های خوراک آماده با میانگین ۴۳/۱ میکروگرم در کیلوگرم و کمترین میزان آلودگی آن مربوط به کاه نمونه های با میانگین ۶/۳۸ میکروگرم در کیلوگرم بود. نتایج مشخص کرد که در فصل بهار و تابستان مقدار آفلاتوکسین B1 پایین می آید. میزان آلودگی خوراکی های دام در فصول پاییز و زمستان بیشتر از سایر فصول می باشد که این خود می تواند به علت عدم دسترسی به علوفه تازه و هم چنین استفاده از علوفه انبار شده و عدم رعایت شرایط نگهداری مناسب در انبارها باشد و متأسفانه به دلیل انبارداری نامناسب، عدم دسترسی به علوفه تازه به اندازه کافی، شرایط بد باز یافت و عدم نگهداری صحیح نان های خشک در هر زمانی ایجاد آلودگی می کند.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B1، خوراک دام، گاوداری شیری، شهرستان تربت حیدریه.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها، متابولیت‌های سمی تولید شده توسط برخی از گونه‌های قارچ می‌باشند (پورچیس، ۲۰۰۷: ۱۹۷). از مهمترین فاکتورهای مؤثر در هجوم قارچ و تولید توکسین استرس حرارتی بالا، استرس رطوبتی و آسیب وارد شده به محصولات توسط حشرات می‌باشد (جاکوبسون و همکاران، ۱۹۹۳). از جمله مهمترین مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها می‌باشند که دارای سمیت متنوع و اثرات نامطلوبی همچون سرطان‌زایی، ناقص الخلقه‌زایی و موتاژنی در مصرف کننده می‌باشند. آفلاتوکسین‌ها در اثر رشد قارچ‌های مختلفی از جمله گونه‌هایی از جنس اسپرژیلوس^۱ بر روی مواد غذایی مصرفی تولید شده و قادرند در بدن متابولیزه گشته و به شیر راه یابند. غلظت‌های پایین آفلاتوکسین‌ها در حیوانات سبب آسیب کبدی، کاهش تولید شیر، کاهش فعالیت‌های تولید مثلی و تضعیف ایمنی می‌گردد و در مسمومیت حاد اختلال در عملکرد دستگاه گوارش، کاهش دریافت غذا و بازده، کاهش وزن، زردی، کاهش تولید شیر، علائم عصبی، خونریزی و مرگ دیده می‌شود (علامه و رزاقی ابیانه، ۱۳۸۰). آفلاتوکسین‌ها سموم طبیعی هستند که انواع گوناگونی از غذای انسان و خوراک دام را آلوده می‌کنند و منجر به تهدید سلامت انسان و دام می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها به عنوان یکی از بارزترین آلودکننده‌های مواد غذایی که بهداشت عمومی، امنیت غذایی و اقتصاد ملی بسیاری از کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می‌دهند مورد بررسی قرار می‌گیرند. از میان مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها به واسطه گستردگی فراوان در طیف وسیعی از غذاها و خاصیت بالقوه سرطان‌زایی در انسان، بیشترین توجه را به سوی خود جلب نموده‌اند. آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه شدیداً سمی، سرطان‌زا، تراژون، جهش‌زا، تضعیف‌کننده سیستم ایمنی و هیپاتوتوکسیک در انسان و حیوانات بوده که عمدتاً^۲ توسط قارچ‌های اسپرژیلوس فلاووس، اسپرژیلوس پارازیتیکوس و اسپرژیلوس نومیوس به دنبال رشد روی اقلام غذایی تولید می‌شوند. این سموم در مواد خوراکی قبل از برداشت، در انبار و یا بعد از فرایند در کارخانجات در شرایط مطلوب درجه حرارت و رطوبت تولید می‌شوند. آفلاتوکسین‌های B_1 , B_2 , G_1 , G_2 توسط آژانس بین‌المللی تحقیق روی سرطان (IARC)^۳ در گروه 1 عوامل سرطان‌زا طبقه بندی شده‌اند که در این میان آفلاتوکسین B_1 بیشترین سمیت و سرطان‌زایی را داراست. دام‌هایی که از خوراک آلوده به آفلاتوکسین B_1 تغذیه می‌کنند مشتق هیدروکسی آن یعنی آفلاتوکسین M_1 را در شیر دفع می‌کنند. آفلاتوکسین B_1 می‌تواند به پروتئین‌ها مثل کازئین متصل شود، بنابراین می‌تواند در محصولات لبنی وجود داشته باشد. در مورد حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین B_1 و M_1 در کشورهای مختلف قوانین متنوعی وجود دارد، اما به طور معمول حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین B_1 را در خوراک دام ۲۰-۱۰ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 را در شیر ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم، در نظر می‌گیرند. روش‌های مختلفی جهت اندازه‌گیری مقدار آفلاتوکسین‌ها در خوراک دام و مواد غذایی وجود دارد، از جمله HPLC^۴، TLC^۵ و ELISA^۶. در این میان الایزا با توجه به امکانات موجود، دقیق، سریع و حساس بودن آن جهت اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در خوراک دام کاربرد بیشتری می‌یابد. کنترل و ارزیابی آفلاتوکسین‌ها در خوراک دام و مواد غذایی و مقایسه آن‌ها با حدود مجاز و استانداردها به منظور ارائه راه کارها و اقدامات جهت حذف یا کاهش این سموم در خوراک و مواد غذایی و تأمین امنیت غذایی، بهداشت و سلامت عمومی و اقتصاد ملی امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین این تحقیق با هدف، تعیین میزان آفلاتوکسین B_1 در مواردی از خوراک دام (ذرت سیلو شده، کنسانتره، خوراک ماده و گاو‌داری‌های شیری شهرستان تربت حیدریه با روش الایزا انجام گرفت.

¹ Purchase

² Jacobsen et al

³ International Agency for Research on Cancer

⁴ High Performance Liquid Chromatography

⁵ Thin Layer Chromatography

⁶ Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

مبانی نظری

از آنجا که هدف این مطالعه، بررسی آفاتوکسین ها به عنوان سموم طبیعی است که انواع گوناگونی از غذای انسان و خوراک دام را آلوده می کنند و منجر به تهدید سلامت انسان و دام می شوند. آفاتوکسین ها متابولیت های ثانویه ی قارچی می باشند که به وفور در مواد خوراکی و غذای دام یافت می شوند (ویلده، ۲۰۰۲). لغت آفاتوکسین از سه بخش تشکیل شده است: A مربوط به جنس اسپرژیلوس و Fla مربوط به سویه فلاووس و Toxin به معنی سم (بکردری، ۲۰۱۲). این سموم در دهه ی ۱۹۶۰ و بعد از طغیان بیماری Turkey X در انگلستان کشف شدند. این واقعه منجر به مرگ بیش از ۱۰۰ هزار بوقلمون جوان، ۲۰ هزار جوجه اردک، قرقاول و کبک شد. علت این واقعه مصرف بادام زمینی های برزیلی آلوده به مقدار زیادی اسپرژیلوس فلاووس بوده است. بعد از آنالیز این مواد غذایی مشخص شد که یک سری ترکیبات فلورسنت مسئول این واقعه بوده اند. در سال ۱۹۶۲ نام آفاتوکسین بر این مواد سمی مشتق شده از قارچ اسپرژیلوس فلاووس گذاشته شد (اگاک، ۲۰۰۴). در ابتدا ۲ نوع ترکیب سمی به وسیله ی کروماتوگرافی لایه نازک شناسایی شد که آفاتوکسین B₁ و آفاتوکسین G₁ نامیده شدند (بر اساس رنگ آبی و سبز فلورسنسی که هنگام تابیدن اشعه فرابنفش بر آن ها از خود ساطع می کنند (اگاک، ۲۰۰۴). در سال ۱۹۶۳ به وسیله ی برخی از محققان طبیعت فیزیکی و شیمیایی آفاتوکسین، B₁، B₂ و G₁، G₂ مشخص شدند. به طور شیمیایی آفاتوکسین ها دی فورانو دی فورو کومارولاکتون (مشتق های دی فورو کومارین) هستند. ساختار آن ها شامل یک حلقه ی بی فوران ترکیب شده با یک هسته ی کومارین و یک حلقه ی پنتئون (در نوع B و M) یا ۶ حلقه ی لاکتونی (در نوع G) است. بر اساس تفکیک رنگ های ساطع شده تحت تاثیر تابانیدن اشعه ماورابنفش (UV) ۴ نوع ترکیب از یکدیگر افتراق داده شدند (اگاک، ۲۰۰۴). نوع B برگرفته از رنگ آبی (Blue) و نوع G برگرفته از رنگ سبز (Green). ۲ آفاتوکسین M₁ و M₂ متابولیت های آفاتوکسین های B₁ و B₂ هستند که از ادار و شیر پستانداران جدا شده اند (پاترسون، ۱۹۷۸). ۱۸ نوع آفاتوکسین تاکنون شناسایی شده اند که G₁-G₂، B₁-B₂، M₁ عمده ترین آن ها هستند (درس، ۲۰۱۱). امروزه مشخص شده است که این سموم به وسیله ی ۳ نوع کپک اسپرژیلوس فلاووس، اسپرژیلوس پارازیتیکو و اسپرژیلوس نومیوس^۲ و سویه های متفاوت پنی سیلیوم^۳، ریزوپوس^۴، موکور^۵ و استرپتومایسس^۶ گه گیاهان و محصولات گیاهی را آلوده می نمایند تولید می گردد. اسپرژیلوس پارازیتیکوس و اسپرژیلوس فلاووس در اکثر خاک ها یافت می شوند و معمولاً در پوسیدگی گیاه دخیل هستند. آن ها معمولاً عامل فساد غلات انبار شده و تحت شرایط معینی باعث فساد غلات در مزرعه می شود (اگاک، ۲۰۰۴). عفونت معمولاً بعد از صدمه دیدن دانه یا هسته ی محصولات به وسیله ی حشرات، پرندگان، موش ها، سرمای زودرس، تگرگ، استرس های حرارتی، خشکی، گردباد و دیگر شرایط نامساعد هوایی رخ می دهد (اگاک، ۲۰۰۴). در میان انواع سموم آفاتوکسین شناسایی شده نوع B₁ سمی ترین نوع آفاتوکسین شناخته شده است. میزان سمیت در میان ۴ نوع عمده ی آفاتوکسین به این صورت می باشد: B₁ > G₁ > B₂ > G₂ ۵۷ آلودگی آفاتوکسین می تواند در طیف وسیعی از غذای دام شامل ذرت، سورگوم، جو، گندم چاودار، گندم، انواع بادام، سویا، برنج، تخم کتان انجیر، ادویه جات، انواع آجیل و مواد مختلف غذایی که برگرفته از این مواد اولیه هستند را آلوده می نماید شیر تخم مرغ و محصولات گوشتی نیز به علت آلودگی خوراک دام و طیور می توانند آلوده باشند

7. Wild

8. Bakirdere

9. Agag

1 Thin layer Chromatography 0

1 Aspergillus parasiticus 1

1 Aspergillus nomius 2

1 Penicillium 3

1 Risopus 4

1 Mucor 5

1 Streptomyces 6

(دیشپاند، ۲۰۰۳). ایزوله های سمی اسپرژیلوس فلاووس به طور کلی تنها آفلاتوکسین B₁ و B₂ را تولید می کنند، در حالی که ایزوله های اسپرژیلوس پارازیتیکوس کلا انواع G₁ G₂ B₁ B₂ را تولید می نمایند (اگاک، ۲۰۰۴؛ دیشپاند، ۲۰۰۲) برخی دیگر از متابولیت های شناسایی شده شامل B_{2a}، آفلاتوکسیکول^۱، آفلاتوکسین H₁، آفلاتوکسین P₁ و آفلاتوکسین Q نیز شناسایی شدند. از میان آفلاتوکسین های موجود در غذا نوع B₁، M₁ و G₁ پرایمرهای مهم می باشند. که همراه با توکسیکول از نگرانی های مربوط به سلامت هستند و در این میان نوع B₁ غالب بوده و ۶۰ تا ۸۰٪ کل آفلاتوکسین ها را تشکیل داده و در غیاب آن نوع G₂ G₁₂ B₁₂ بروز پیدا نمی کنند (اگاک، ۲۰۰۴). در ادامه به بررسی انواع قارچ ها می پردازیم.

قارچ ها

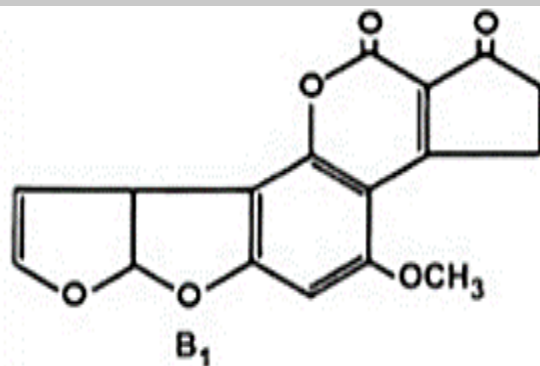
قارچ ها ارگانسیم های یوکاریوت (هسته دار) هستند. اختلاف اساسی قارچ ها با گیاهان سبز در این است که قارچ ها فاقد کلروفیل بوده، بنابراین نمی توانند بوسیله عمل فتوسنتز مواد آلی مورد نیاز خود را از دی اکسید کربن و آب بسازند و هتروتروف بوده و باید تمام مواد مورد نیاز را از محیط اطراف بدست آورند و مواد مورد نیاز خود را عمدتاً از طریق جذب بدست می آورند. ساختار رویشی قارچ های کپکی معمولاً رشته ای منشعب، به نام ریشه است که با دیواره های سلولی احاطه می شود. دیواره سلولی قارچ ها واجد پلی ساکارید است که از میان آن ها انواعی مثل گلیکان - کیتین است که کیتین به میزان فراوان در دیواره سلولی آن ها به کار رفته است. علاوه بر آن میزان فراوانی گلیکوپروتئین هم ممکن است مشاهده شود. انواع پلی ساکاریدها در دیواره قارچ وجود دارد و مقادیر آن ها در گونه های قارچی یکسان شبیه هم هستند و به همین خاطر از ساختار پلی ساکاریدی در طبقه بندی استفاده می شود. در زیر غشای سلولی، پروتوپلاسم است که همانند سایر یوکاریوت هاست و داخل آن اندامک های مختلف سلولی مثل میتوکندری مشاهده می شود. دستگاه گلژی در اکثر قارچ های حقیقی از نظر ساختارشناسی بسیار ساده است. هسته های بیش تر قارچ ها کاملاً کوچکند و ساختارهای فوق العاده، انعطاف پذیرند. هسته قارچ ها معمولاً حاوی یک هستک بزرگ است که اغلب در مرکز جای می گیرد. غشاء هسته معمولاً دو لایه است و منافذ مشخصی دارد. سیتوپلاسم در قارچ ها همانند سایر یوکاریوت هاست و در اطراف آن یک غشاء پلاسمایی قرار دارد. در این غشاء ماده ای وجود دارد که نسبت به سایر سلول ها در قارچ ها فراوان تر است و به آن ارگوسترول می گویند. بعضی از داروهای ضدقارچی از طریق مهار در سنتز این ماده از رشد قارچ ها جلوگیری می کنند. گلیکوژن و چربی از ماده ذخیره ای قارچ ها به حساب می آیند، اما نشاسته در سلول های قارچی یافت نمی شود. قارچ های رشته ای (کپکی) از رشته های میسلیوم تشکیل شده اند که سرانجام روی ساختمان های خاص به نام اسپوروفور تولید اسپور می نمایند. یک شاخه یا انشعاب میسلیوم را هیف یا ریشه می گویند که با دیواره سختی محدود می باشد. هیف بسته به نوع قارچ رشته ای ممکن است دیواره عرضی داشته یا نداشته باشد. به دیواره عرضی سپتا گویند که اگر باشد به راحتی دیده می شود و هیفا را به سلول های مجزا و مشخص تبدیل می کند. بعد از دوره رویشی، قارچ های رشته ای روی انشعابات خاصی از رشته های میسلیوم، هاگ تولید می کنند. تولید مثل قارچ ها بوسیله اسپورها انجام می شود و معمولاً زمانی که شرایط محیطی رشد قارچ ها مناسب باشد از طریق غیرجنسی و اگر شرایط نامناسب باشد از طریق تولیدمثل جنسی زیاد می شوند (ارسالی، ۲۰۰۹).

مشخصات و فرمول شیمیایی آفلاتوکسین های مهم در مواد غذایی

آفلاتوکسین B₁

آفلاتوکسین B₁ با وزن مولکولی ۳۱۲ دالتون در مقابل نور ماورابنفش رنگ آبی فلورسانس نسبتاً پرنرنگی از خود نشان می دهد. این آفلاتوکسین از نظر ظاهری به شکل بلورهای کریستالی بی رنگ است و در حرارت ۲۶۷ درجه سانتی گراد که نقطه ذوب آن است تجزیه می شود (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶، سلاخ، ۱۹۸۷).

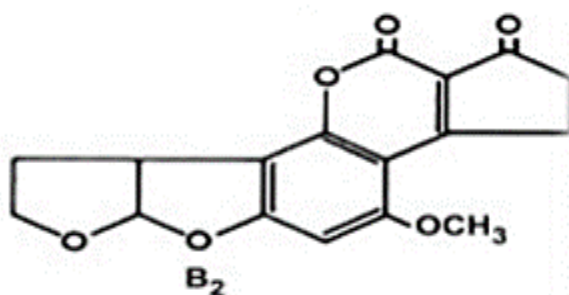
1	Deshpande	7
1	Aflatoxicol	8
1	Ersali	9
2	Salunkhe	0



شکل ۲-۱- ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین: B₁ (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶)

آفلاتوکسین B₂

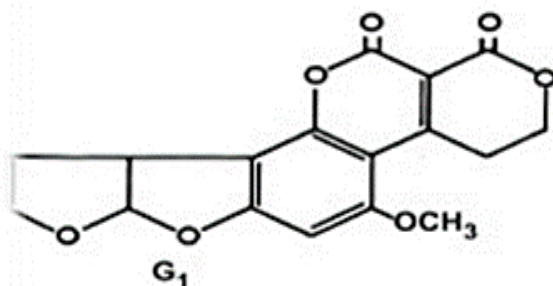
آفلاتوکسین B₂ دارای وزن ۳۱۴ دالتون می‌باشد، در حقیقت با هیدروژناسیون آفلاتوکسین B₁ و اضافه شدن ۲ مولکول هیدروژن به آن، این توکسین سنتز می‌شود. آفلاتوکسین B₂ در دمای ۳۰۶-۳۰۳ درجه سانتی‌گراد ذوب می‌شود (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۹، سلاخ، ۱۹۸۷).



شکل ۲-۲- ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B₂ (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶)

آفلاتوکسین G₁

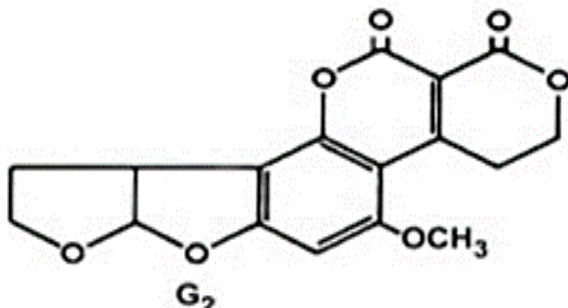
وزن مولکولی این آفلاتوکسین ۳۲۸ دالتون می‌باشد. این توکسین نسبت به آفلاتوکسین B₁ یک مولکول اکسیژن اضافه در فرمولش دارد. این ماده در برابر اشعه ماوراءبنفش نور سبز فلورسانس منتشر می‌کنند و نقطه ذوب آن در محدوده ۲۵۹-۲۵۷ سانتی‌گراد است (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶، سلاخ، ۱۹۸۷).



شکل ۲-۳- ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین G₁ (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶)

آفلاتوکسین G₂

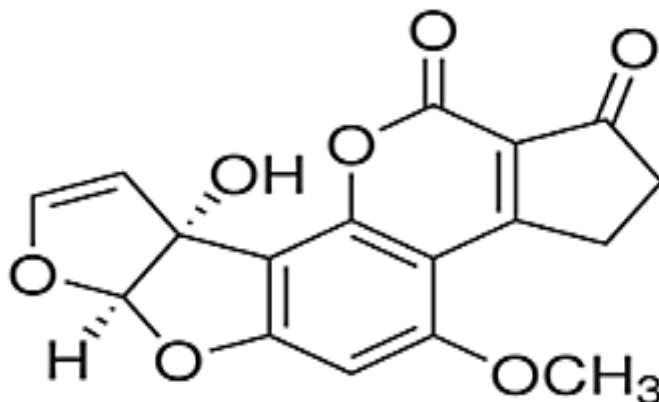
وزن مولکولی این ماده در حدود ۳۳۰ دالتون می باشد و نمونه هیدروژنه شده آفلاتوکسین G₁ می باشد، این ماده در دمایی بین ۲۴۹-۲۳۷ درجه سانتی گراد ذوب می شود (ورنامخواستی، ۱۳۹۲)



شکل ۲-۴- ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین G₂ (ورنامخواستی، ۱۳۹۲)

آفلاتوکسین های M₁

آفلاتوکسین های M₁ از نظر ساختمانی مشق ۴- هیدروکسی آفلاتوکسین B₁ می باشد خاصیت فلورسانس آن ۳ مرتبه بیش تر از آفلاتوکسین B₁ است. نقطه ذوب آفلاتوکسین M₁ ۲۹۹ درجه سانتی گراد است. آفلاتوکسین M₁ حرارت پاستوریزاسیون را تحمل می کند، درجه حرارت ۶۴ درجه سانتی گراد را به مدت ۲ ساعت تحمل می کند ولی افزایش درجه حرارت ثبات ساختمانی آن را کاهش می دهد. این آفلاتوکسین فلورسانس آبی مایل به بنفش از خود نشان می دهد (باقری، ۱۳۹۳).



شکل ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین M₁ (باقری، ۱۳۹۳)

عوامل مؤثر در تولید آفلاتوکسین ها

(۱) رطوبت: بهترین عامل مؤثر در رشد قارچها رطوبت است. نقش رطوبت در رشد و تکثیر قارچها مخصوصاً زمانی مشهود است که مواد غذایی به خصوص غلات در انبار و در زمان نگهداری دچار صدمه می شوند. تولید آفلاتوکسین نیاز به ۳ تا ۸ درصد رطوبت دارد (افشاری و همکاران، ۱۳۹۲).

(۲) درجه حرارت: اکثر کپکها در درجه حرارت ۳۰-۱۵ درجه سانتی گراد رشد می کنند و اپتیمم درجه حرارت رشد آنها ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد است. بعضی قارچها قادرند در درجه حرارت های بسیار بالا رشد کنند مثلاً اسپرژیلوس فلاووس می تواند در درجه

حرارت ۳۵ درجه سانتیگراد باقی بماند. آفلاتوکسین از دمای ۱۲ تا ۴۰ درجه سانتیگراد می تواند تولید شود (صاحب قلم و همکاران، ۱۳۹۲).

۳) فشار اسمزی: فشار اسمزی قابل تحمل برای رشد و نمو قارچ های توکسین زا برابر با ۵۰ درصد غلظت سازگار همراه با فشار اسمزی مؤثر ترکیبات محیط کشت است. بنابراین مرباجات و ترکیبات غذایی که غلظت مواد قندی آنها حدود ۶۰ درصد به بالاست، از نظر توکسین زایی مواد غذایی مطمئن می باشند. نمک طعام در غلظت های کم (بین ۱/۵ تا درصد) روی رشد و نمو قارچ و تولید توکسین اثر تشدید کننده دارد. از طرفی دیگر اثر بازدارنده ای نمک در غلظت ۱۴ درصد است (صاحب قلم و همکاران، ۱۳۹۲).

۴) pH: اغلب قارچها در دامنه ی pH چهار تا هشت قادر به رشد هستند، اما بعضی از آنها روی محیط خیلی اسیدی و یا خیلی قلیایی نیز رشد می کنند. pH در تولید میکوتوکسین ها در انواع قارچها بستگی به شرایط محیط کشت، ترکیبات غذایی محیط کشت و گونه قارچ تولید کننده توکسین دارد. برای مثال قارچ اسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت هایی که pH اولیه آنها کمتر از ۴ است رشد نمی کند. بررسی رشد و توانایی تولید آفلاتوکسین طی فرآیند تخمیر در قارچ اسپرژیلوس فلاووس مشخص کرده که در ابتدای تخمیر که روند درجه pH رو به کاهش است، آفلاتوکسین تولید نمی شود ولی بعد از اینکه pH محیط افزایش یافت تولید آفلاتوکسین نیز شروع می شود. شرایط تنفس (هوازی یا بی هوازی) و درجه اسیدیته محیط نیز روی رشد و تولید انواع میکوتوکسین ها در قارچها مؤثر هستند (عظیمی و همکاران، ۱۳۹۴).

۵) اکسیژن: از آنجایی که اکثر کپکها هوازی هستند، مهمترین فاکتور رشد محسوب می شود. رشد و اسپورزایی با توجه به ترکیبات هوا در جنسهای اسپرژیلوس و پنیسیلیوم متفاوت است. بعضی از آنها در شرایط اتمسفری رشد می کنند که حاوی نیتروژن باشد (محیط فاقد اکسیژن) (عظیمی و همکاران، ۱۳۹۴)

۶) دی اکسید کربن: روی رشد و شکل ظاهری قارچ تأثیر ویژه ای دارد. اسپرژیلوس نایجر در غلظت پایین دی اکسید کربن اسپورهایش جوانه می زنند و اسپرژیلوس فلاووس در غلظت های بالای دی اکسید کربن رشدش متوقف می شود. دی اکسید کربن از تولید توکسین جلوگیری می کند. قارچها می توانند مقادیر زیاد دی اکسید کربن را تحمل نمایند، طوری که اگر غلظت دی اکسید کربن از ۳ درصد به ۲۰ درصد افزایش یابد، کاهش قابل ملاحظه ای در رشد قارچ و تولید اسپور ایجاد نمی شود ولی در غلظت ۷۵ درصد دی اکسید کربن، از تولید میکوتوکسین کاسته می شود. در تراکم ۱۰۰ درصد دی اکسید کربن هم رشد قارچ و هم تولید توکسین متوقف می شود (مکتبی و همکاران، ۱۳۹۳).

۷) ترکیبات مواد غذایی: نیترات اثر بازدارندگی در تولید توکسین دارد. روی، آهن و منیزیم سبب تسریع و تشدید تولید آفلاتوکسین می شوند در حالی که مس، بور و مولیبدن اثر بازدارندگی روی تولید توکسین دارند.

آفلاتوکسیکوزیس در انسان

شرایط در معرض برخورد قرار گرفتن انسان

راه اصلی که انسان در معرض برخورد با آفلاتوکسینها قرار می گیرد، غذای آلوده است. دو مسیر که از طریق رژیم غذایی باعث در معرض برخورد قرار گرفتن می شود مشخص شده است:

الف) بلع مستقیم آفلاتوکسینهای (عمدتاً آفلاتوکسین B1) (در غذاهای آلوده با منشأ گیاهی همچون ذرت و دانهها و محصولات آنها).

ب) بلع مستقیم آفلاتوکسینهای منتقل شده از غذا به شیر و محصولات لبنی همچون پنیر و شیر خشک که عمدتاً آفلاتوکسین M1 می باشد (۲۸-۳۴)

علاوه بر انتقال به شیر، ممکن است بقایای آفلاتوکسینها در بافت های حیوانات پدیدار شوند و به عنوان غذای آلوده مورد مصرف قرار گیرند (۳۴). مقدار جذب آفلاتوکسینها در پروژه ای در اروپا توسط ۹ کشور انجام شده است. طبق این پروژه مقدار جذب روزانه

آفلاتوکسین B1 در محدوده ۲-۷۷ ng/person و مقدار جذب آفلاتوکسین M1 در محدوده ۶-۴ ng/person /4. مشخص شده است (۲۸-۳۴)

آفلاتوکسین M1 مرتبط با بخش کازئینی (پروتئینی) شیر است. خامه و کره حاوی مقادیر کمتر آفلاتوکسین M1، در حالی که پنیر حاوی مقادیر بیشتر آفلاتوکسین M1 (حدوداً ۵-۳ مرتبه بیشتر) نسبت به شیری است که از آن ساخته شده اند (۲۸-۳۵)

مسمومیت حاد

گزارشهایی از مسمومیت حاد در انسان از چندین قسمت جهان ثبت شده است. گروه هایی در تایلند، نیوزیلند و آمریکا وجود آفلاتوکسینها در کبد بیماران در حال مرگ از سندروم Reye را ثابت کردند. جراحات تقریباً مشابه جراحات کبد چرب حاد حاصل از آفلاتوکسینها در میمون و دیگر حیوانات بود. از لحاظ بالینی، علائم اصلی این سندروم شامل استفراغ، گیجی و کما می باشد (۲۸) در سال ۱۹۷۶ مسمومیت حاد در ۲۶ نفر در مناطق روستایی تایوان رخ داد. قربانیان بیش از ۳ هفته برنج آلوده به کپک مصرف کرده بودند و دارای علائم ادم پاها، درد شکم و استفراغ همراه با کبد قابل لمس اما بدون تب بودند (۳۶)

در سال ۱۹۷۴ آفلاتوکسیکوزیس در انسان و سگ که مرتبط با ذرت کپک زده حاوی آفلاتوکسین بود، در هند رخ داد. بیماری دارای علائم تب بالا، ادرار پررنگ، استفراغ، ادم پاها، زردی، آسیت و مرگ و میر بالا بود (۲۸) در استرالیا نیز انسفالوپتی و دژنره چربی احشاء در کودکان مرتبط با سندروم Reye بود. ویژگیهای بیماری شامل سرفه، خونریزی از بینی، زخم در گلو، تب، گیجی، استفراغ، ریتم تنفسی آشفته و تغییر تونیسیت عضلات بود (۲۸) در سال ۱۹۸۸ یک هیپاتیت حاد در کنیا گزارش شد. ۱۲ مورد از ۲۰ مورد فوت شده علائم بیقراری، درد شکمی، ادرار تیره و زردی داشتند. سگهای منطقه هم که از غذای آلوده مصرف کرده بودند مرگ و میر بالایی داشتند. دانههای انبار شده علت شیوع بیماری ذکر شد (۲۸)

در سال ۱۹۸۸، ۱۸ کودک چینی در اثر انسفالوپتی کبدی حاد فوت شدند. علائم بیماری شامل استفراغ، استفراغ خونی، تب، تشنج، اسهال، درد شکمی و نارسایی کبدی بود. علت مرگ این کودکان خوردن غذای آلوده بود (۳۷)

مسمومیت مزمن

آفلاتوکسینها به عنوان عوامل بالقوه در افزایش شیوع نئوپلاسمهای دستگاه گوارش و کبد انسان در آفریقا و فیلیپین و چین نقش دارند. آفلاتوکسین B1 بعنوان علت سرطان سلولهای کبدی انسان (HCC) نقش دارد. اطلاعات جمع آوری شده از کنیا، موزامبیک و تایلند یک همبستگی مثبت بین جذب آفلاتوکسین رژیم غذایی (در محدودهای از ۳/۵ تا ۲۲۲/۴ نانوگرم/کیلوگرم وزن بدن/روز) و میزان بروز خام سرطان اولیه کبد (محدوده-ای از ۱ تا ۱۳ تا ۱۳ نفره از ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال) را نشان می دهد.

آفلاتوکسین B1 همچنین بطور شیمیایی به DNA متصل شده و باعث تغییرات ساختاری DNA همراه با جهش ژنومی می شود.

آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات

سمیت آفلاتوکسینها و حساسیت حیوانات

آفلاتوکسین B1 می تواند به عنوان ترکیبی با سمیت بالا ($LD_{50} = 1-50 \text{ mg/kg}$) برای اغلب گونههای حیوانی باشد. برای برخی گونههای حساس همچون قزل آلائی رنگین کمان، گربه و اردک بسیار سمی است. ($LD_{50} < 1 \text{ mg/kg}$) گونههای مختلف حیوانات، حساسیت متفاوتی به مسمومیت حاد آفلاتوکسین دارند. فاکتورهایی که سمیت آفلاتوکسین را در گونههای حیوانی تحت تأثیر قرار می دهند عبارتند از: گونه و نژاد حیوان، مدت زمان در معرض برخورد قرار گرفتن، وضعیت تغذیه و سلامتی حیوان، سن، جنس، بیماریهای همزمان، داروها و دیگر مایکوتوکسینها (۲۸)

آفلاتوکسین می تواند باعث ایجاد سرطان، مسمومیت مزمن یا علائم فوق حاد بسته به گونه و سن حیوان ودوز و مدت زمان در معرض قرار گرفتن با آفلاتوکسین شود. همه گونه های جانوری به آفلاتوکسیکوزیس حساس هستند، اما شیوع این بیماری عمدتاً در خوک، گوسفند و گاو رخ می دهد.

گاوهای شیری و گوشتی حساس تر از گوسفند و اسب به آفلاتوکسیکوزیس هستند. حیوانات جوان همه گونه ها حساس تر از حیوانات بالغ به اثرات ناشی از آفلاتوکسین هستند. حیوانات آبستن و در حال رشد حساسیت کمتری نسبت به حیوانات جوان دارند اما نسبت به حیوانات بالغ حساس تر هستند. حیوانات در حال مراقبت ممکن است با قرار گرفتن در معرض متابولیت های آفلاتوکسین ترشح شده در شیر تحت تأثیر قرار بگیرند. سطوح بیش از 1 ppm ممکن است باعث آسیب عضو شدید و مرگ و میر حاد در دام شود (۲۸)

نشخوارکنندگان

آفلاتوکسین موجود در خوراک بلع شده توسط گاو، بطور فیزیکی به محتویات شکمبه متصل شده و چیزی حدود ۵-۲ درصد آن به روده می رسد. سطوح بیش از 100 mg/kg آفلاتوکسین در غذا برای گاو سمی در نظر گرفته می شود. اثرات آفلاتوکسین موجود در غذای گاو بستگی به سطح آفلاتوکسین جیره، طول دوره تغذیه و سن حیوان دارد (۲۸)

گوساله

مکنزی و همکاران وقوع طبیعی آفلاتوکسیکوزیس حاد را میان گوساله های 9 تا 3 ماهه در کوئینزلند طی ژوئن ۱۹۸۰ گزارش کردند. گوساله ها مبتلا به بی اشتها، افسردگی، زردی، ازدیاد حساسیت به نور، ادم تحت فکی، کراتوکونژکتیویت شدید و اسهال همراه با اسهال خونی در بعضی موارد بودند. کلاپس و مرگ به سرعت به دنبال این موارد رخ می داد. در یافته های پس از مرگ خونریزی در بافت های زیر جلد، عضلات اسکلتی، غدد لنفاوی، پریکارد و سطوح سروری سیستم گوارشی وجود داشت و کبد کم رنگ و لاشه زرد رنگ بود (۳۸)

در گوساله هایی که جیره های آلوده را برای چندین هفته مصرف می کنند، شروع علائم بالینی سریع است. عمده ترین علائم کوری، چرخش و افتادن است. تنموس شدید در بیشتر موارد و مرگ در برخی موارد دیده می شود. تحقیقات نشان داده است که گوساله ها و گاوهای شیری جوان مستعد آلودگی با آفلاتوکسین B₁ هستند. 50LD مربوط به آفلاتوکسین B₁ برای گوساله 1 mg/kg - 0/5 است. کیل و همکاران گزارش کردند که 50LD برای گاوهای شیری جوان 1/8 mg/kg است (۲۸)

گاو شیری و گوشتی

عمده ترین علائمی که در اثر مسمومیت حاد در گاو گزارش شده اند شامل بی اشتها، افسردگی، کاهش تولید شیر، کاهش وزن، بی حالی، آسیت، زردی، تنموس و درد شکم، اسهال خونی، سقط جنین، هپاتونفسالوپتی، حساسیت به نور و خونریزی می باشد (۳۹)

دیگر علائم مرتبط با آفلاتوکسیکوزیس حاد عبارتند از: کوری، حرکات دایره وار، کشیدگی گوش ها، وجود کف در دهان، کراتوکونژکتیویت و پرولاپس رکتوم. آسیب کبدی یافته ثابت آفلاتوکسیکوزیس حاد است. جراحات شامل دژنرسیون چربی، مگالوسیتوزیس و نکروز همراه با فیبروزیس سلول ها و ازدیاد مجاری صفراوی در مراحل پیشرفته بیماری است (کالوین^۱ و همکاران، ۱۹۸۴). آفلاتوکسیکوزیس مزمن باعث آسیب کارایی تولید مثلی شامل سیکل استروس غیر طبیعی (خیلی کوتاه، یا خیلی طولانی) و سقط، سرکوب ایمنی و افزایش حساسیت به بیماری ها می شود (باشتی^۲ و همکاران، ۲۰۰۹). سایر علائم شامل کاهش تولید شیر، تولد گوساله های سالم اما کوچک تر از حد طبیعی، اسهال، ورم پستانخاد، اختلالات تنفسی، پرولاپس رکتوم و ریزش مو می باشد

¹ Colvin
² Dashti

ری و همکاران، ۱۹۸۶). سطح بالای آفلاتوکسین (۴ ppm) باعث افت تولید شیر طی یک هفته و سطوح پایین تر (۰/۴ ppm) باعث افت تولید شیر طی ۳-۴ هفته می شود. به علت خطر باقی مانده آفلاتوکسین در شیر، آفلاتوکسین رژیم غذایی باید زیر ۲۵ ppm نگه داشته شود. این مقدار محافظه کارانه بعثت توزیع غیر یکنواخت آفلاتوکسین در دانه ها و مواد غذایی، قطعی نبودن نمونه برداری و آنالیز جیره و وجود بیش از یک منبع آفلاتوکسین در جیره است. آفلاتوکسین ها با کاهش هضم سلولز، تولید اسید چرب فرار و پروتئولیز می توانند روی حرکات و عملکرد شکمبه تأثیر گذار باشند (پلیدین و همکاران، ۲۰۱۴).

روش های تشخیص آلودگی مواد غذایی به آفلاتوکسین ها

برای تشخیص و اندازه گیری آفلاتوکسین موجود در مواد خوراکی مختلف روش های متفاوتی مانند کروماتوگرافی لایه نازک^{۲۴}، کروماتوگرافی مایع با فشار بالا^{۲۵}، کروماتوگرافی گازی - اسپکترومتری جرمی^{۲۶} و الیزا^{۲۷} وجود دارند (رنجبر، ۱۳۸۹). روش TLC دارای ضریب تغییرات نسبتاً بالایی می باشد و تنها در جایی که سطوح آلودگی میکوتوکسین بالاتر از حدود کنترل باشد، کاربرد دارد. سایر روش های کروماتوگرافی مانند HPLC تکنیک های بسیار گران قیمت و وقت گیر هستند. از طرف دیگر در روش های TLC و HPLC نیاز به یک مرحله استخراج با فاز جامد یا ستون ایمونوآفینیتی^{۲۸} می باشد. بنابراین در مطالعات و آزمون های معمول، روش های ایمونولوژیک گتونی به روش های کروماتوگرافی ترجیح داده می شوند. در حال حاضر علاقه به استفاده از کیت های تست ELISA به دلیل نیاز به حجم کم نمونه و روش ساده تر تخلیص نمونه نسبت به روش های مرسوم مانند TLC و HPLC بیشتر می باشد. این روش ها سریع، ساده، خاص، حساس و قابل استفاده در بسیاری از موارد بوده و از متداول ترین روش های سریع برای تشخیص میکوتوکسین ها در غذا دام و خوراک انسان شناخته شده اند. از این رو در این پژوهش این روش مورد استفاده قرار گرفته است (سالاری، ۱۳۹۰).

پیشینه تحقیق

تا کنون مطالعات متعددی در زمینه بررسی میزان آفلاتوکسین در اقلام خوراک دام در شهرهای مختلف ایران و در جهان صورت گرفته است.

سالامی و همکاران (۱۳۹۳) تعیین میزان آفلاتوکسین B₁ در خوراک جوجه گوشتی در مرغداری های استان اصفهان را مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد ۹۸/۹٪ نمونه ها آلوده می باشند و محدوده آلودگی در نمونه های مثبت بین ۰/۶۴ تا ۰/۶۴ ug/kg و میانگین آنها ۹/۹۱ ug/kg بود. بیشترین میزان آلودگی در سطح بالاتر از ۱۰ ug/kg (حد مجاز آفلاتوکسین در جیره مرغ گوشتی) به دان مخلوط (۴۶/۲ ug/kg) و سویا (۳۳/۴ ug/kg) تعلق دارد و ۲۸/۸۱ درصد از مجموع نمونه ها آلودگی بیشتر از حد استاندارد دارند. نمونه های تهیه شده در فصل تابستان به دلیل دمای بالای محیط و مساعد بودن هوا جهت رشد قارچها از آلودگی بیشتری برخوردار بودند و نسبت به نمونه های سایر فصول اختلاف معنی داری داشتند (P<۰/۰۵).

عزیزی و همکاران (۱۳۹۱) میزان آفلاتوکسین B₁ را در ۹۶ نمونه خوراک دام شامل کنسانتره، تفالنه چغندر قند و کنجاله پنبه و در ۳ فصل زمستان، بهار و تابستان با روش الیزا در شمال ایران بررسی کردند. ۴٪، ۴۴٪ از نمونه هایی که از گاوداری های سنتی و ۱٪، ۴۳٪ از نمونه هایی که از گاوداری های نیمه صنعتی تهیه شده بودند بیش از میزان مجاز آلودگی داشتند. میزان

2 . Ray 3

2 . Pleadin 4

2 Thin Layer Chromatography 5

2 High Pressure Liquid Chromatography

2 Mass Spectrophotometry 7

2 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

2 immunoaffinity 9

3 Immunologic 0

آفلاتوکسین B₁ در کنسانتره، تفاله چغندرقد و کنجاله پنبه به ترتیب ۰.۸٪، ۵.۸٪، ۷٪، ۴۳٪ و ۷٪، ۲۶٪ در زمستان، بهار و تابستان به ترتیب ۴٪، ۵۶٪، ۷٪، ۳۸٪ و ۴٪، ۳۴٪ گزارش شد (عزیزی، ۲۰۱۳).

به طور مثال جمالی و معینی (۱۳۸۹) وضعیت آلودگی آفلاتوکسین در اقلام خوراک دام گاوداری‌های (کوچک، متوسط و بزرگ) استان کرمانشاه را مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد آلودگی نمونه‌های یونجه و ذرت در گاوداری‌های کوچک بیشتر بود که مهمترین علت آن نحوه مدیریت گاوداری‌ها بویژه روش ذخیره و نگهداری علوفه می‌باشد.

رحیمی و همکاران ۱۳۸۷ در مطالعه خود میزان آفلاتوکسین B₁ در 108 نمونه خوراک دام شامل یونجه خشک، ذرت، سیلوی ذرت، کنجاله تخم پنبه، جو و سبوس گندم که از مزارع پرورش گاو شیری استان چهارمحال بختیاری جمع‌آوری شدند را با روش الیزا بررسی نمودند. میزان آفلاتوکسین در محدوده‌های مابین ۰/۸ میکروگرم در کیلوگرم ردیابی شد. در ۱۵۵، ۱۸ میکروگرم در کیلوگرم ردیابی شد. در ۱۹ نمونه میزان آفلاتوکسین B₁ بیش از حداکثر قابل قبول بود. هم‌چنین نتایج نشان دادند که سطح آلودگی آفلاتوکسین B₁ در اقلام خوراک دام در نمونه‌های زمستان بطور قابل ملاحظه‌ای بیش از نمونه‌های زمستان بوده است.

هونگ و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود میزان آفلاتوکسین B₁ و B₂ را در 20 نمونه محصولات ذرت و بادام زمینی به روش کروماتوگرافی مایع بررسی کردند. آفلاتوکسین B₁ و B₂ در 5 نمونه از ۹ نمونه بادام زمینی و ۵ نمونه از ۱۱ نمونه ذرت با دامنه‌ای از ۰.۲ تا ۱.۰۱، ۸ میکروگرم در کیلوگرم تعیین شد (هونگ، ۲۰۱۰).

ایجویو و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه خود از روش الیزا جهت تعیین سطح آفلاتوکسین B₁ در ۹۹ نمونه بادام زمینی و حبوبات مصرفی شهروندان نیجریه استفاده کردند. نتایج نشان داد که 51 درصد از کل نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین B₁ هستند و میزان آلودگی آفلاتوکسین B₁ در نمونه‌های بادام زمینی طیفی از ۰.۶ تا ۲۵، ۰.۷ تا ۸۰ نانوگرم در گرم، در نمونه‌های ارزن طیفی از ۰.۴ تا ۱۸، ۰.۲۸ تا ۵ نانوگرم در گرم و در نمونه‌های ذرت طیفی از ۰.۲ تا ۵۱، ۰.۳ تا ۹۴ نانوگرم در گرم بود (ایجویو، ۲۰۱۳).

روش تحقیق

با توجه به گسترش دامداری‌های بزرگ و خصوصاً گاو شیری در شهرستان تربت حیدریه، برای این منظور، خوراک دام ۵ گاوداری شیری اطراف شهر تربت-حیدریه از آبان ماه ۱۳۹۷ تا مرداد ماه ۱۳۹۸ انتخاب و بررسی گردید. آفلاتوکسین موجود در خوراکی‌های (سیلو ذرت، کنسانتره، خوراک آماده و گاه) گاوهای شیری با استفاده از کیت الیزا مختص اندازه گیری آفلاتوکسین B₁ (شرکت Euro Proxima، هلند) اندازه گیری شد. به منظور اجرای این بررسی با توجه به شرایط آب و هوایی منطقه از آبان ماه ۱۳۹۷ لغایت مرداد ماه ۱۳۹۸ در قالب ۲ فصل سرد و گرم، به طور انتخابی ۵ گاوداری در مناطق مختلف شهر تربت حیدریه (و در هر مسیر به تعدادی از دامداری نیمه صنعتی و سنتی که دارای حداقل ۲۰ رأس گاو شیروار بودند مراجعه و ضمن تکمیل پرسشنامه در خصوص نوع خوراک مصرفی دام‌ها، نحوه نگهداری خوراک دام، منابع تأمین خوراک دام و نوع یا علایم بیماری‌های رایج در دامداری، به طور جداگانه اقدام به برداشت نمونه خوراک دام مصرفی گردید. جهت نمونه برداری از قسمت‌های مختلف خوراک، حداقل به مقدار ۵۰۰ گرم به طور تصادفی برداشت شده و در بسته‌بندی پلاستیکی و سپس کاغذی قرار گرفته و در شرایط سرد و دور از نور آفتاب به آزمایشگاه دکتر ذاکری واقع در شهر تربت حیدریه منتقل گردیدند. این نمونه‌ها در فریزر با دمای صفر درجه سانتیگراد و به دور از نور تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. بدین ترتیب در مجموع ۸۰ نمونه خوراک دام از انواع مختلف در ۲ فصل سرد و گرم جمع آوری و به روش الیزا از نظر میزان آلودگی به آفلاتوکسین B₁ مورد سنجش قرار گرفتند. سپس به منظور عصاره گیری، تمامی نمونه‌ها به صورت همزمان از فریزر خارج شدند. طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت خریداری شده ۵۰-۱۰۰ گرم از نمونه به کمک آسیاب برقی کاملاً خرد و پودر گردید. سپس ۳ گرم از پودر به دست آمده توزین شده و ۹ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه به طور کامل شیکر گردید. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ Xg سانتریفوژ

3 Azizi	1
3 Hong	2
3 Ayejuyo	3

گردید. سپس توسط سمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت فوقانی مایع برداشت و درون چاهک‌های میکرو پلیت الگو ریخته شد؛ سپس توسط سمپلر ۸ کاناله ۱۵۰ میکرولیتر محلول بافر رقیق کننده به هر چاهک اضافه گردید که بدین ترتیب محلول با متانول ۲۰٪ تهیه شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از این محلول جهت تست الایزا برداشت و به پلیت اصلی منتقل گردید. در ضمن جهت عدم تداخل نمونه‌ها به هر لوله یک شماره اختصاص داده شد و در طول مراحل آزمایش این شماره ثابت، ملاک شناسایی نمونه قرار گرفت. طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، بافر رقیق کننده ۴ برابر و بافر شستشو ۲۰ برابر رقیق می‌گردید که جهت این کار ۲۰ میلی لیتر بافر رقیق کننده با ۶۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و به حجم ۸۰ میلی لیتر رسانده شد و ۳۰ میلی لیتر بافر شستشو با ۵۷۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و به حجم ۶۰۰ میلی لیتر رسانده شد. جهت آماده سازی sample dilution buffer ۲ میلی لیتر متانول ۱۰۰ درصد به ۸ میلی لیتر بافر رقیق کننده اضافه گردید. به دلیل لئوفیلیزه بودن ویال‌های کنژوگه و آنتی بادی به هر ویال ۴ میلی لیتر بافر رقیق کننده اضافه گردید. همچنین مطابق دستورالعمل کیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر رقیق سازی استاندارد در چاهک A₁ بعنوان شاهد و مقدار ۵۰ میکرولیتر از استاندارد صفر در چاهک B₁ بعنوان B_{MAX} (حداکثر جذب نوری) و مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر محلول استاندارد آفلاتوکسین B₁ (۶ استاندارد) تهیه شده بوسیله‌ی شرکت سازنده (Europro ima) در چاهک‌های C₁ تا H₁ ریخته شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های آماده شده در مرحله قبل در مابقی چاهک‌ها افزوده شد. سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول کونژوگه (flatox_{in}-H R P) و سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول آنتی بادی در همه‌ی چاهک‌ها به جز چاهک شاهد افزوده شد. میکرو پلیت چند ثانیه تکان داده شده و سپس به مدت یک ساعت دور از نور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس محلول موجود در چاهک‌ها از میکرو پلیت تخلیه و همه‌ی چاهک‌ها ۳ مرتبه با بافر شستشو، شسته شدند و قطرات باقی مانده با زدن میکروپلیت روی چند لایه دستمال کاغذی خشک و تمیز خارج گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه گردید. در این مرحله واکنش رنگی با رنگ آبی صورت گرفت که شدت رنگ با مقدار آفلاتوکسین موجود در نمونه رابطه عکس داشت. در خاتمه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده در هر چاهک ریخته شد و رنگ آبی به زرد تغییر یافت و بلافاصله میزان جذب نوری (OD) نمونه‌ها با قرائت کننده مخصوص الایزا در طول موج ۴۵۰ nm قرائت گردید.

محاسبه نتایج

جذب نوری شاهد از جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها کسر شده، سپس با تقسیم میزان جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها در میزان جذب نوری استاندارد صفر که بیشترین جذب نوری را دارد، ضرب در صد، درصد جذب حاصل گردید.

$$\text{درصد جذب (OD)} = \frac{\text{جذب نوری شاهد} - \text{جذب نوری استاندارد یا نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد صفر}} \times 100$$

رسم منحنی کالیبراسیون

حداکثر درصد جذب محاسبه شده برای نمونه‌های استاندارد، روی محور Y و غلظت آفلاتوکسین B₁ موجود در نمونه‌های استاندارد بر حسب نانوگرم در میلی لیتر (ng/ml) روی محور X مشخص شده و منحنی کالیبراسیون به وسیله‌ی کامپیوتر رسم گردید. براساس درصد جذب هر نمونه و انطباق با منحنی کالیبراسیون میزان آفلاتوکسین B₁ هر نمونه حاصل شد.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت مقایسه میزان آفلاتوکسین بین فصول مختلف، بین جیره‌های مختلف، بین فارم‌های مختلف، بین جیره‌های مختلف در فصول مختلف و بین جیره‌های مختلف در نیمه اول و نیمه دوم سال از آزمون Kruskal Wallis Test استفاده شد. در صورت معنی دار شدن تست اول، مقایسه دو تایی گروه‌ها توسط تست-mann withney U test با تصحیح bonferroni انجام شد.

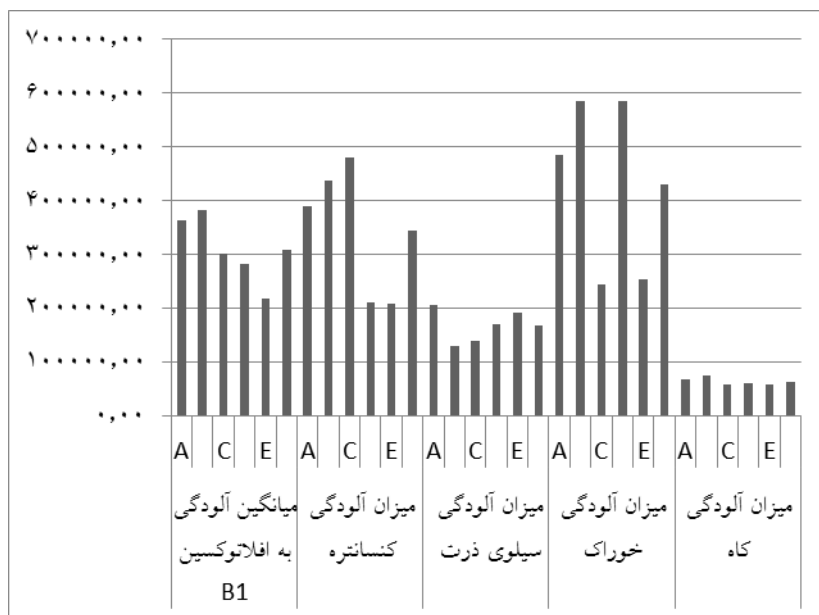
جدول ۴-۱ دامنه، میانگین و انحراف معیار میزان آفلاتوکسین B1 در تمامی نمونه‌های خوراک دام طی فصول مختلف

سال

نوع خوراک	گاوداری	میانگین	انحراف استاندارد
میانگین آلودگی به افلاتوکسین B1	A	۳۶/۲۵۰۰	۱۳/۱۲۴۴۰
	B	۳۸/۲۵۰۰	۲۱/۱۸۷۶۵
	C	۳۰/۲۵۰۰	۲۱/۴۸۴۴۹
	D	۲۸/۲۵۰۰	۱۳/۶۷۱۷۵
	E	۲۱/۷۵۰۰	۷/۴۵۵۴۲
	کل	۳۰/۹۵۰۰	۱۵/۶۷۹۲۷
میزان آلودگی کنسانتره	A	۳۹/۰۰۰۰	۱۷/۹۰۷۱۷
	B	۴۳/۷۵۰۰	۵۲/۶۲۰۵۰
	C	۴۸/۰۰۰۰	۵۴/۲۲۷۹۱
	D	۲۱/۰۰۰۰	۱۳/۷۳۵۶۰
	E	۲۰/۷۵۰۰	۱۶/۹۱۸۹۲
	کل	۳۴/۵۰۰۰	۳۴/۱۴۵۹۷
میزان آلودگی سیلوی ذرت	A	۲۰/۵۰۰۰	۱۴/۳۸۷۴۹
	B	۱۲/۸۷۵۰	۲/۳۹۳۵۷
	C	۱۳/۸۷۵۰	۹/۶۱۲۲۸
	D	۱۷/۰۰۰۰	۴/۹۶۶۵۵
	E	۱۹/۲۵۰۰	۹/۳۹۴۱۵
	کل	۱۶/۷۰۰۰	۸/۶۷۱۴۹

ادامه جدول ۴-۱ دامنه، میانگین و انحراف معیار میزان آفلاتوکسین B1 در تمامی نمونه‌های خوراک دام طی فصول مختلف سال

میزان آلودگی خوراک	A	۴۸/۵۰۰۰	۱۹/۷۵۶۸۶
	B	۵۸/۶۲۵۰	۴۱/۵۹۶۰۲
	C	۲۴/۵۰۰۰	۱۲/۴۵۶۵۹
	D	۵۸/۵۰۰۰	۵۰/۱۴۹۷۸
	E	۲۵/۵۰۰۰	۲۰/۱۴۱۱۷
	کل	۴۳/۱۲۵۰	۳۲/۶۳۹۵۳
میزان آلودگی کاه	A	۶/۸۲۵۰	۰/۷۵۰۰۰
	B	۷/۴۰۰۰	۰/۹۸۹۹۵
	C	۵/۹۲۵۰	۰/۷۵۴۴۳
	D	۶/۰۰۰۰	۰/۸۱۶۵۰
	E	۵/۷۵۰۰	۰/۵۰۰۰۰
	کل	۶/۳۸۰۰	۰/۹۴۶۸۰

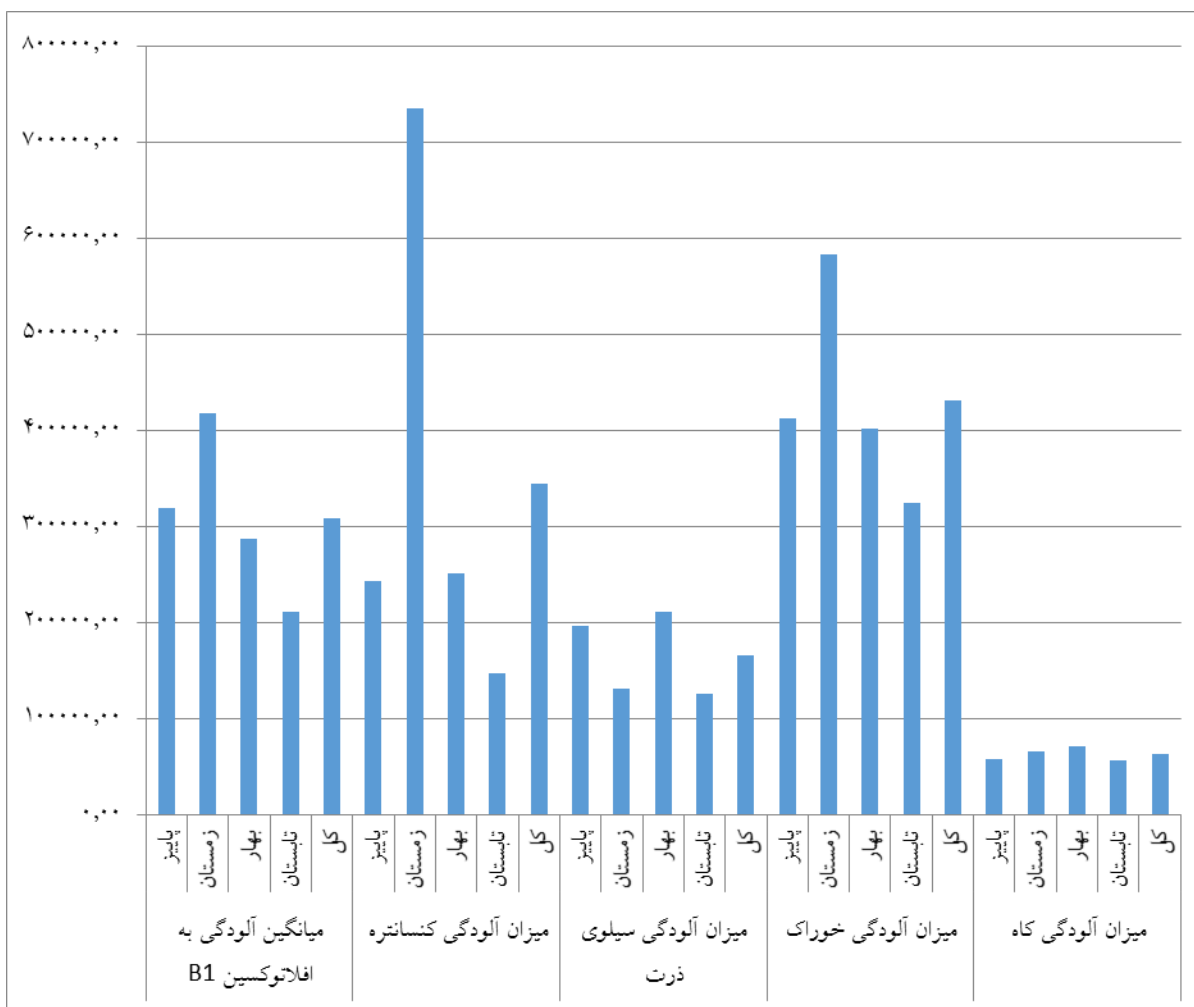


نمودار ۱-۱: میانگین و انحراف استاندارد آلودگی بر حسب گاوداری

جدول ۲-۴: میانگین و انحراف استاندارد آلودگی بر حسب فصل

نوع خوراک	فصل	میانگین	انحراف استاندارد
میانگین آلودگی به افلاتوکسین B1	پاییز	۳۲/۰۰	۱۹/۱۷۰۲۹
	زمستان	۴۱/۸۰	۱۹/۴۳۴۵۱
	بهار	۲۸/۸۰	۱۱/۷۷۷۱۰
	تابستان	۲۱/۲۰	۳/۲۷۱۰۹
	کل	۳۰/۹۵	۱۵/۶۷۹۲۷
میزان آلودگی کنسانتره	پاییز	۲۴/۴۰	۱۹/۴۳۷۰۸
	زمستان	۷۳/۶۰	۴۷/۵۲۱۵۷
	بهار	۲۵/۲۰	۱۴/۴۴۶۴۵
	تابستان	۱۴/۸۰	۷/۸۵۴۹۳
	کل	۳۴/۵۰	۳۴/۱۴۵۹۷
میزان آلودگی سیلوی ذرت	پاییز	۱۹/۷۰	۱۲/۸۵۳۰۲
	زمستان	۱۳/۲۰	۲/۱۶۷۹۵
	بهار	۲۱/۲۰	۸/۴۰۸۳۳
	تابستان	۱۲/۷۰	۶/۶۸۵۸۱
	کل	۱۶/۷۰	۸/۶۷۱۴۹
میزان آلودگی خوراک کاه	پاییز	۴۱/۳۰	۴۶/۶۷۳۸۷
	زمستان	۵۸/۴۰	۳۷/۸۰۶۰۸
	بهار	۴۰/۳۰	۲۷/۲۱۱۲۱
	تابستان	۳۲/۵۰	۱۶/۲۸۶۵۰

	کل	۴۳/۱۲۵۰	۳۲/۶۳۹۵۳
میزان آلودگی کاه	پاییز	۵/۸۸	۰/۶۷۲۳۱
	زمستان	۶/۶۸	۰/۸۹۲۷۵
	بهار	۷/۲۰	۰/۹۲۷۳۶
	تابستان	۵/۷۶	۰/۶۳۴۸۲
	کل	۶/۳۸	۰/۹۴۶۸۰



نمودار ۴-۲: میانگین و انحراف استاندارد آلودگی بر حسب فصل

نتایج حاصل از آزمایشات انجام گرفته طی ۴ فصل پاییز و زمستان ۱۳۹۷ و بهار و تابستان ۱۳۹۸ در این مطالعه، به منظور تعیین میزان سطح آلودگی آفلاتوکسین B₁ در ۸۰ نمونه خوراک دام شامل ۲۰ نمونه کنسانتره، ۲۰ نمونه سیلوی ذرت، ۲۰ نمونه خوراک آماده و ۲۰ نمونه کاه مصرفی در ۵ گاوداری پرورش گاو شیری شهر تربت حیدریه در جدول ۱-۷ منعکس شده است. از ۸۰ نمونه خوراک آزمایش شده، تعداد ۸۰ نمونه با میانگین ۲۵/۷۹ میکروگرم آلوده به آفلاتوکسین B₁ بودند. میانگین غلظت آفلاتوکسین B₁ در کل نمونه‌های کنسانتره، سیلوی ذرت، خوراک آماده و کاه در فصل پاییز به ترتیب ۱۹/۷، ۴۱/۳ و ۵/۸۱ میکروگرم در کیلوگرم و در فصل زمستان به ترتیب ۴۱/۸، ۷۳/۶، ۱۳/۲، ۵۸/۴ و ۶/۶۸ میکروگرم در کیلوگرم و در فصل

بهار به ترتیب ۲۸/۸، ۳۴/۵، ۲۱/۲، ۴۰/۳ و ۷/۲ میکروگرم در کیلوگرم و در فصل تابستان به ترتیب ۲۱/۱، ۱۶/۸، ۱۲/۷، ۳۲/۵ و ۵/۷۶ میکروگرم در کیلوگرم به دست آمد (جدول ۴-۲).

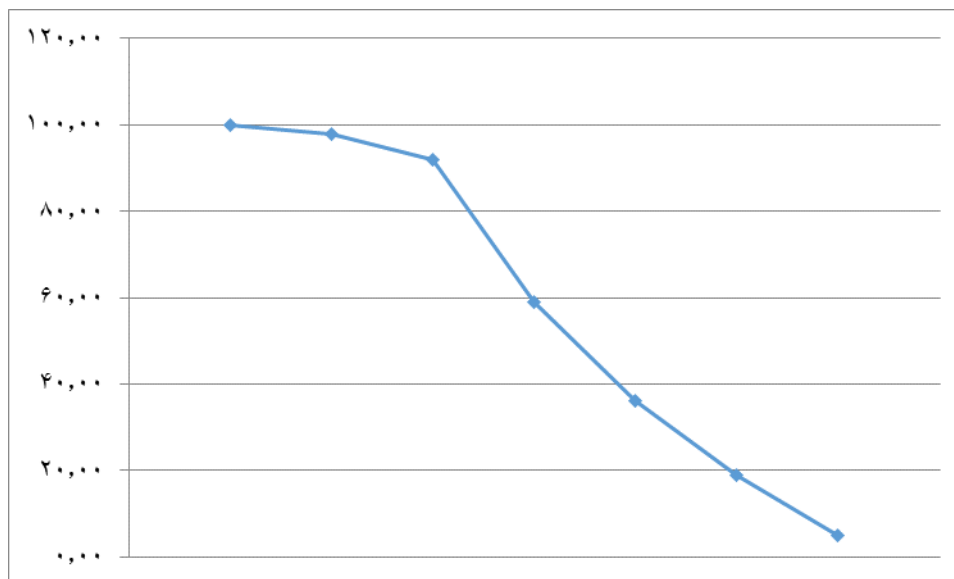
میانگین آلودگی اقلام خوراکی در فصل پاییز ۲۴/۵۹ میکروگرم در کیلوگرم، در فصل زمستان ۴۸/۴۲ میکروگرم در کیلوگرم، در فصل بهار ۲۸/۶۷ میکروگرم در کیلوگرم و در فصل تابستان ۲۱/۷۱ میکروگرم در کیلوگرم به دست آمد.

بیشترین آفلاتوکسین B₁ ۳۲/۱۷ میکروگرم در کیلوگرم در گاوداری B و کمترین میزان آن ۱۸/۶ میکروگرم در کیلوگرم در E و میانگین میزان آلودگی در تمامی نمونه‌ها هم ۲۶/۳۲ میکروگرم در کیلوگرم به دست آمد.

بیشترین میزان آلودگی آفلاتوکسین B₁ بین سه جز خوراک بررسی شده، مربوط به نمونه‌های خوراک آماده با میانگین ۴۳/۱ میکروگرم در کیلوگرم و کمترین میزان آلودگی آن مربوط به گاه نمونه‌های با میانگین ۶/۳۸ میکروگرم در کیلوگرم بود (جدول ۴-۱؛ نمودار ۴-۱).

بیشترین میزان آلودگی آفلاتوکسین B₁ بین چهار فصل بررسی شده، مربوط به فصل زمستان با میانگین ۴۸/۴۲ میکروگرم در کیلوگرم و کمترین میزان مربوط به فصل تابستان با میانگین ۲۱/۷۱ میکروگرم در کیلوگرم بود (جدول ۴-۲؛ شکل ۴-۲).

سطح آلودگی به آفلاتوکسین B₁ در تمامی اقلام خوراکی بجز یک نمونه بالاتر از حداکثر میزان قابل قبول استاندارد ملی (۵ ng/g) بود.



نمودار ۴-۳: منحنی استاندارد کیت AFB₁

نتیجه گیری

آفلاتوکسین‌ها سمومی هستند که بوسیله تعدادی از قارچ‌ها که بر روی خوراک دام و مواد غذایی رشد می‌کنند، تولید شده و می‌توانند بیماری آفلاتوکسیکوزیس را در حیوانات اهلی و انسان ایجاد کنند. در مورد این سموم و بیماری‌های حاصله در سراسر جهان تحقیقات زیادی صورت گرفته است. عوامل محیطی مختلفی بر روی تولید آفلاتوکسین دخالت دارند از این رو شدت آلودگی بستگی به موقعیت جغرافیایی، شیوه کشاورزی، حساسیت محصولات کشاورزی قبل از درو، پروسه تهیه مواد غذایی و وضعیت انبار محصولات دارد. آفلاتوکسین‌ها نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان زائی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. بسیاری از کشورها با توجه به داشتن آلودگی‌های قارچی در مواد غذایی و محصولات کشاورزی با تصویب قوانین و مقررات ویژه‌ای توانسته‌اند بهداشت و سلامتی مواد غذایی تولیدی خود را تأمین نمایند (آن و جانگ، ۲۰۱۸^۳).

در مطالعه حاضر، از ۸۰ نمونه خوراک آزمایش شده، تعدادا ۸۰ نمونه (۱۰۰٪) با میانگین ۲۵/۷۹ میکروگرم در کیلوگرم آلوده به آفلاتوکسین B₁ بودند و اکثر نمونه‌ها غلظتی بیش از حد مجاز استاندارد ایران (۵نانوگرم در گرم) داشتند.

نتایج این تحقیق نشان داد که بین میزان آلودگی سیلوی ذرت، خوراک دام، کنسانتره و کاه تفاوت معناداری وجود دارد و میزان آلودگی در فصل زمستان به طور قابل توجه‌ای بیش از فصل تابستان گزارش شد که دلیل آن ممکن است چون فصل تابستان فصل برداشت محصولات کشاورزی می‌باشد و گاوداران در این فصل خوراک دام خود را تهیه می‌کنند آلودگی بسیار کمتری دارند البته ناگفته نماند این تفاوت‌ها قابل توجه نیست که علت آن می‌تواند دمای بسیار پایین در فصل زمستان باشد.

در مطالعه‌ای روی آلودگی دانه‌های برنج و ذرت به آفلاتوکسین در استان Liaoning چین در سال ۲۰۰۶ انجام شد نیز آلودگی ذرت به طور قابل توجه‌ای کم بود که علت آن شرایط دمایی پایین این استان و نیز انبارهای استاندارد و مدرن با تهویه مناسب بیان شده است (لیو^۳ و همکاران، ۲۰۰۶). البته شرایط دمایی پایین ذکر شده در این مطالعه با مطالعه‌ای حاضر همخوانی ندارد و احتمال آن وجود دارد که علت آلودگی کمتر از حد استاندارد در غذای دام مورد بررسی در این مطالعه به علت هوای سرد در فصل زمستان (دمای انجماد در شب و دمای نزدیک به یخچال در روز) و هوای خشک در فصل تابستان باشد، زیرا شهرستان تربت حیدریه در منطقه‌ی خشک و نیمه خشک واقع شده است. در این تحقیق به طور کلی بیشترین آلودگی در خوراک آماده و بعد از آن در کنسانتره، سیلوی ذرت و کمترین در کاه می‌باشد.

در مطالعه‌ای که در مورد وقوع قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین در خوراک دام (گاو) در همدان طی فصول تابستان و زمستان توسط Ghiasian و Maghsoud در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت نشان داده شد که از میان ۷۱۳ نمونه‌ی جمع‌آوری شده‌ی مواد غذایی گاوهای ماده‌ی شهرستان همدان شامل نان خشک، سبوس گندم، کاه، یونجه، ملاس، جو و کنسانتره، همگی آلوده به متابولیت‌های ثانویه قارچی بودند و ۱۵۴۲ ایزوله‌ی قارچی از آنها جدا شد. به طور کلی بالاترین میزان نسبی سوبه‌های آسپرژیلوس مربوط به کاه و یونجه و به ترتیب در فصول تابستان و زمستان بوده است. در این مطالعه آسپرژیلوس فلاووس در هر دو فصل مورد بررسی یافت شد (غیاسیان^۳، ۲۰۱۱). براساس نتایج بدست آمده می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که میزان آلودگی کاه و یونجه به سموم قارچی نیز بیش از سایر مواد غذایی مورد آزمون بود. نتایج این بررسی با پژوهش حاضر نیز همخوانی ندارد زیرا در مطالعه‌ی حاضر بیشترین آلودگی مربوط به خوراک دام و کنسانتره بوده و کمترین آلودگی مربوط به کاه بوده است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در فصل بهار و تابستان مقدار آفلاتوکسین B₁ پایین می‌آید. میزان آلودگی خوراک‌های دام 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 انبار شده و عدم رعایت شرایط نگهداری مناسب در انبارها باشد. و متأسفانه به دلیل انبارداری نامناسب، عدم دسترسی به علوفه تازه به اندازه کافی، شرایط بد از یافت و عدم نگهداری صحیح نان‌های خشک در هر زمانی ایجاد آلودگی می‌کند. نتایج مشخص کردند که میزان آلودگی به آفلاتوکسین B₁ در تمامی نمونه‌ها از حد مجاز استاندارد ایران بالاتر می‌باشد. این امر باعث بروز طیف وسیعی از اثرات زیان بار و مسمومیت مزمن و ضعف ایمنی در حیوانات شده که علاوه بر خسارت اقتصادی به صنعت دامپروری، از آن جایی که بلع خوراک آلوده به آفلاتوکسین B₁ توسط حیوانات اهلی باعث تبدیل آنبه آفلاتوکسین M₁ شده که آن هم در شیر ترشح می‌شود و سلامت مصرف‌کنندگان نهایی را به خطر می‌اندازد. لذا باید یک برنامه ایمن برای تعیین نیازمندی‌ها برای پردازش و ذخیره خوراک حیوانات بنا نهاده شود. همچنین سعی می‌شود تا حد امکان خوراک با کیفیت در فارم‌ها مورد استفاده قرار گیرد، گر چه این امر نیازمند صرف هزینه‌ای بیشتر خواهد بود (الزوپیر و همکاران، ۲۰۰۹).

3 . Liu

5

3 . Ghiasian

6

سطح بالای آفلاتوکسین در نمونه های خوراک، نیاز به اقدامات نظارتی منظم و کنترل سطح آفلاتوکسین B₁ را در محصولات کشاورزی که به عنوان خوراک دام و غذای انسان استفاده می شوند، تأیید می کند. روش الیزا می تواند روش موثری به منظور نظارت آلودگی آفلاتوکسین در تعداد زیادی از نمونه ها باشد و در صرفه جویی زمان و بها نیز موثر است (آیجو، ۲۰۱۳). بهترین روش برای کنترل آلودگی به آفلاتوکسین ها، می تواند آموزش های مناسب کشاورزان در خصوص مراحل داشت و برداشت محصولات به منظور جلوگیری از آلودگی به قارچ های آسپیریلوس و نیز دامداران به منظور نگهداری خوراک دام در شرایط مناسب انبارداری جهت پیشگیری از رشد و تکثیر قارچ های گروه آسپیریلوس و تولید آفلاتوکسین ها باشد.

پیشنهادات

- بازدید از دامداری ها و ارائه خدمات مشاوره ای توسط کارشناسان.
- انجام اقدامات تشویقی برای دامدارانی که اصول بهداشتی را رعایت می کنند از طریق تحویل سهمیه خوراک دام با قیمت مناسب.
- اعطای وام های ضروری با سود کم به دامداران جهت احداث انبارهای ذخیره خوراک دام بهداشتی.
- بررسی کارخانجات تهیه خوراک دام از نظر آلودگی به آفلاتوکسین B₁.
- سطح وسیع تری از مواد غذایی مورد مصرف دام های شیری مورد بررسی قرار گیرند. و از روش هایی با دقت و حساسیت بالاتر مانند HPLC جهت تأیید تشخیص سطوح آلودگی استفاده گردد.
- آلودگی مواد غذایی به سم آفلاتوکسین که متابولیت ثانویه تولید شده توسط قارچ های رشته ای میباشد، همواره یک مشکل اساسی در مورد ایمنی مواد غذایی مورد استفاده انسان بوده است. در این میان، آلودگی خوراک مصرفی دامها به دلیل امکان توانایی انتقال متابولیت های سمی آفلاتوکسین به سبد غذایی انسان، از طریق مصرف محصولات دامی آلوده، بایستی تحقیقاتی بیشتری در این زمینه صورت گیرد.

منابع و مأخذ

- افشاری، حسین؛ افشاری، مهدی؛ باقری، غلامرضا و لایبی، قنبر (۱۳۹۲). بررسی اقر میدان مغناطیسی ایستا و زمان بر رشد قارچ آسپیریلوس
- جلیل پور، جلیل؛ وهابزاده رودسری، حبیب؛ سپهداری، ابوالفضل و بژند، ذبیح اله (۱۳۹۲). اثر سمیت غذایی آلوده به آفلاتوکسین B₁ بر رشد، بازماندگی و برخی آنزیم های کبدی بچه ماهی ازون برون پرورشی. نشریه توسعه آبی پروری (علوم زیستی). دوره ۷، شماره ۴، ص ۱-۱۱.
- جمالی امام قیس، نگین و معینی، محمد مهدی (۱۳۸۹). مطالعه وضعیت آلودگی آفلاتوکسین در شیر و خوراک دام گاوداری های استان کرمانشاه با استفاده از روش الیزا. نشریه دامپزشکی (پژوهش و سازندگی). شماره ۸۷.
- رحیمی، ابراهیم؛ کارگر، عبدالرسول و زمانی، فرشاد (۱۳۸۷). ارزیابی سطح آفلاتوکسین B₁ در خوراک دام مزارع گاو شیری استان چهار محال و بختیاری. پژوهش و سازندگی در امور دام و آزیان، شماره ۷۹، تابستان ۱۳۸۷.
- رضوی دهکردی، محمد (۱۳۵۴). جستجو و تعیین مقدار آفلاتوکسین در پنبه دانه و باقیمانده آن بعد از روغن کشی، پایان نامه دکترای حرفه ای رشته داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.
- زابلی، فاطمه؛ غلام پورعزیزی، عیسی؛ روحی، سمانه و مهسا، عظیمی (۱۳۹۳). تعیین میزان آفلاتوکسین B₁ در نمونه های آرد گندم شهرستان چالوس (استان مازندران) به روش الیزا. نشریه علوم پزشکی زنکو. دوره ۱۵، شماره ۴۴، ص ۶۰-۶۷.
- سالاری، حبیبی نجفی م ب، بروشکی م ط و همکاران. مقایسه دو روش الیزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در تعیین آفلاتوکسین B₁ و اکراتوکسین A در فلفل قرمز ایران. نشریه پژوهش های صنایع غذایی، ۱۳۹۰؛ ۲۱؛ ۴۸۱-۴۹۱.

- سالمی، اردشیر؛ رحیمی، ابراهیم؛ فغانی، مصطفی و سالمی، نسیم (۱۳۹۳). تعیین میزان آفلاتوکسین B₁ در خوراک جوجه گوشتی در مرغداری های استان اصفهان. مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی، دوره ۵، شماره ۲، ص ۱۱۷-۱۲۳.
- صاحب قلم، هاله؛ محمدی ثانی، علی؛ مهربان سنگ آتش، معصومه (۱۳۹۲). جذب بیولوژیکی آفلاتوکسین B₁ توسط مخمر ساکارومایسی سرویزیه در خوراک دام. نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی). دوره ۵، شماره ۳، ص ۹۹-۱۰۴.
- عباسی فر، آ. رجاییان، ح. شکر فروش، ش و عباسی فر، ر. (۱۳۸۴). بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین M₁ در شیر گاوداری های اطراف شیراز و یافتن منشاء آن در خوراک دام با استفاده از روش الایزا، کتاب خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره ایران، صفحه ۱۸۹.
- عظیمی، مهسا؛ غلام پور عزیزی، عیسی؛ روحی، سمانه و زابلی، فاطمه (۱۳۹۴). کاهش زیستی آفلاتوکسین B₁ در آرد گندم با استفاده از مخمر ساکارومایسی سرویزیه. نشریه طب جنوب. دوره ۱۸، شماره ۴، ص ۷۰۱-۷۱۰.
- کاظمی، ع. ر (۱۳۷۸). بررسی میزان آلودگی کنجاله پنبه دانه مصرفی گاوداری های صنعتی اطراف اصفهان به آفلاتوکسین، پایان نامه دکتراي حرفه ای رشته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد.
- مرتضوی، علی و طباطبایی، فریده (۱۳۷۶). توکسین های قارچی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد، صفحات: ۶۵-۵۶، ۳۹-۳۱.
- مکتبی، سیاوش؛ حاجی حاجی کلایی، محمدرحیم؛ قربانپور، مسعود و ورنامخواستی، محمد (۱۳۹۳). مطالعه آفلاتوکسین B₁ در خوراک دام دامداری های گاو شیری سنتی اهواز. نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی (پژوهشنامه دامپزشکی گرمسار). دوره ۱۰، شماره ۱، ص ۴۵-۵۵.
- موثق، محمدحسین و آدینهوند، سعید (۱۳۹۲). مطالعه میزان آفلاتوکسین M₁ در شیر خام مراکز جمع آوری شیر در شهر تبریز. بهداشت مواد غذایی، دوره ۳، ماره ۱۰، ص ۶۳-۷۰.
- Agag BL. Mycotoxins in foods and feeds 1- Aflatoxins. *The Assiut University Bulletin for Environmental Researches*, 2004; 7: 173-206.
- Aksoy A, Yavuz O, Das YK, Guvenc D, Muglali OH. Occurance of Aflatoxin B₁, T-2 toxin and Zearalenon in compound animal feed. *J. Anim. Vet. Adv.* 2009;8(3): 403-407.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory mycology. 4th ed. Mashhad university's Jihadpubli. 1986. (In Persian).
- Ayejuyo OO, Olowu R A, Agbaje TO, Atamenwan M, Osundiya MO. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (Elisa) of Aflatoxin B₁ in Groundnut and Cereal Grains in Lagos, Nigeria. *Res.J.Chem.Sci.*2011;1(8): 1-5.
- Azizi IG, Ghadi H, Azarmi M. Determination of aflatoxin B₁ levels of the feedstuffs in traditional and semi-industrial cattle farms in Amol, Northen Iran. *Asian J. Anim. vet. Adv.* 2012;7(6): 528-534.
- Bakirdere S, Bora S, Bakirdere EG, *et al.* Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different food stuffs. *Central European Journal of Chemistry*, 2012; 10: 675-685.
- Campagnollo, F. B., Ganev, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., ... & Sant'Ana, A. S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. *Food control*, 68, 310-329
- Celik, T.; Sarimehmetoglu, B. and Kuplulu, O. (2005). Aflatoxin M₁ Contamination in Pasteurized milk. *Veterinarski Arhiv*, 75 (1): 57-65.
- Colvin BM, Harrison LR, Grosser HS, Hall RF. Aflatoxicosis in feeder cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984;184: 956.
- Dashti, B., Al-Hamli, S., Alomirah, H., Al-Zenki, S., Abbas, A. B., & Sawaya, W. (2009). Levels of aflatoxin M₁ in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control*, 20(7), 686-690

- Deshpande SS. *Hand book of food toxicology*, Switzerland, CRC press, 2002; pp: 387-456.
- Elzupir AO, Younis YMH, Fadul MH, Elhussein AM. Determination of aflatoxins in animal feed in Khartoum state, Sudan. *J. Anim. Vet. Adv.* 2009;8(5): 1000-1003.
- Elzupir AO, Younis YMH, Fadul MH, Elhussein AM. Determination of aflatoxins in animal feed in Khartoum state, Sudan. *J. Anim. Vet. Adv.* 2009;8(5): 1000-1003.
- Ersali, A, Grigoran, K, Baho-Aldini, F, Ghasemi, R. and Ersali, M. (2008). Transition of Aflatoxin from Feedstuff to Animal Milk and Pasteurized Milk in Shiraz City and Suburbs (South Iran). *Iranian Journal of Toxicology*, 2(1): 161-168.
- Gary, SK. (2002). *Veterinary Toxicology*, 1st. ed., S.K jain for CBC Publisher and Distributors, Indian, PP: 208-212.
- Ghiasian SA, Maghsood AH. occurrence of aflatoxigenic fungi in cow feeds during the summer and winter season in Hamadan, iran. *African Journal of Microbiology Research*, 2011; 5: 516-521.
- Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001;167: 101-134.
- Lindenfesler, LA. (1970): *Food additives and contaminants*. Inc Company, PP: 167-176.
- Liu Z, Gao J, Yu J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning province, china. *Journal of Stored Products Research*, 2006; 42: 468-479
- Messripour M, Gheisari MM. Occurrence of Aflatoxin B in Some Feedstuffs in Isfahan. *Journal of Research in Agricultural Science*. 2010;6: 49-55.
- Oancea S, Stoia M. Mycotoxins: A review of toxicology, analytical methods and health risks. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY*. 2008;7(1).
- Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., & Cvetnić, Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291
- Purchase, IF. (1974). *Mycotoxins*. Elsevier Scientific Publishing Company, PP: 1-22.
- Rahimi E, Kargar AR, Zamani F. Assessment of aflatoxin B1 levels in animal feed of dairy farms in Chaharmahal & Bakhtiari. *Pajouhsh & Sazandegi*. 2009;79: 66-71. (In Persian).
- Ray AC, Abbitt B, Cotter SR, Murphy MJ, Reagor JC, Robinson RM, West JE, Whitford HW. Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin contaminated peanuts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1986;184: 956.
- Roseanu A, Jecu L, Badea M, Evans R W. Mycotoxins: An overview on their quantification methods. *ROM. J. BIOCHEM.* 2010;47(1): 79-86.
- Salunkhe, DK. (1987). *Aflatoxin in food and feed*. published by, BV. Bupta, PP: 18-28 and 40-63.
- Tajalli F, Sarabi Jamab M, Karazhyan R, Mohsenzadeh M, Mehraban Sang Atash M. The chemical contaminations in milk and dairy products. Mashhad university's jahad public. 2011. (In Persian).
- Wild CP, Turner PC, The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 2002; 17: 471-481.
- Yabe K, Nakajima H. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004;64: 745-755.
- An, Z., & Jang, C. H. (2018). Label-free optical detection of aflatoxin by using a liquid crystal-based immunosensor. *Microchemical Journal*, 142, 335-342.