فصلنامه پژوهش در علوم، مهندسی و فناوری
دوره ۹، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۱-۲۱
Print ISSN: 2476-5082
www.uctjournals.com

مقایسه میزان وجود آفلاتوکسین B1 در خوراک دام گاوداری‌های شیری در فصول مختلف سال

محسن وظیفه دوست۱، هادی حسن نیا۲ و فرزاد کدخدایی۳

۱گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

m. vazifedoost@iau-neyshabur. ac. ir

۲دانشجوی دکتری رشته زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران(نویسنده مسوول)

hadi. hasannia2020@gmail. com

۳دانشجوی دکتری رشته زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

farzadkad321@gmail. com

چکیده

هدف: این پژوهش با هدف مقایسه میزان وجود آفلاتوکسین B1 در خوراک دام گاوداری‌های شیری در فصول مختلف سال انجام گردید.

موارد و روش‌ها: برای تعیین این میزان محدوده زمانی بین(آبان ماه ۱۳۹۷لغایت مرداد ماه ۱۳۹۸) درگاوداری‌های شیری اطراف شهر تربت-حیدریه انتخاب و بررسی گردید. آفلاتوکسین موجود در خوراک‌های (سیلو ذرت، کنسانتره، خوراک آماده و کاه) گاوهای شیری به روش الایزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین آلودگی اقلام خوراکی در فصل پاییز ۲۴/۵۹ میکروگرم در کیلوگرم، در فصل زمستان۴۸/۴۲ 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 نمونه‌های خوراک آماده با میانگین ۴۳/۱ میکروگرم در کیلوگرم و کمترین میزان آلودگی آن مربوط به کاه نمونه‌های با میانگین ۶/۳۸ میکروگرم در کیلوگرم بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که در فصول 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 شایط نگهداری مناسب در انبارها باشد. و متأسفانه به دلیل انبارداری نامناسب، عدم دسترسی به علوفه تازه به اندازه کافی، شرایط بد ازیافت و عدم نگه‌داری صحیح نان‌های خشک در هر زمانی ایجاد آلودگی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسینB1 ، خوراک دام، گاوداری شیری، فصول.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ی قارچی می‌باشند که به وفور در مواد خوراکی و غذای دام یافت می‌شوند (ویلد[1] ۲۰۰۲). لغت آفلاتوکسین از سه‌بخش تشکیل شده است: A مربوط به جنس آسپرژیلوس و Fla مربوط به سویه‌فلاووس و Toxin به‌معنی سم (بکردری[2] ۲۰۱۲). این سموم در دهه‌ی 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 زمینی‌های برزیلی آلوده به مقدار زیادی آسپرژیلوس فلاووس بوده است. بعد از آنالیز این موادغذایی مشخص شد که یک سری ترکیبات فلورسنت مسئول این واقعه بوده‌اند. در سال ۱۹۶۲ نام آفلاتوکسین بر این مواد سمی مشتق شده از قارچ آسپرژیلوس فلاووس گذاشته شد (اگاگ[3] ۲۰۰۴). در ابتدا ۲ نوع ترکیب سمی به وسیله‌ی کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer Chromatography)شناسایی شد که آفلاتوکسین B_1 و آفلاتوکسین G_1 نامیده شدند (بر اساس رنگ آبی و سبز فلورسنسی که هنگام تابیدن اشعه فرابنفش بر آن‌ها از خود ساطع می‌کنند (اگاگ، ۲۰۰۴). در سال ۱۹۶۳ به وسیله‌ی برخی از محققان طبیعت فیزیکی و شیمیایی آفلاتوکسین، B_2، B_1 و G_2، G_1 مشخص شدند. به‌طور شیمیایی آفلاتوکسین‌ها دی‌فورانو دی‌فورو کومارولاکتون (مشتق‌های دی‌فوروکومارین) هستند. ساختار آن‌ها شامل یک حلقه‌ی بی‌فوران ترکیب شده با یک هسته‌ی کومارین و یک حلقه‌ی پنتئون (در نوع B وM) یا ۶ حلقه‌ی لاکتونی (در نوع G) است. بر اساس تفکیک رنگ‌های ساطع شده تحت تاثیر تابانیدن اشعه ماورابنفش (UV)۴ نوع ترکیب از یکدیگر افتراق داده شدند (اگاگ، ۲۰۰۴). نوع B برگرفته از رنگ آبی (Blue) و نوع G برگرفته از رنگ سبز (Green). ۲ آفلاتوکسین M_1و M_2 متابولیت‌های آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 هستند که از ادرار و شیر پستانداران جداشده‌اند (پاترسون، ۱۹۷۸). ۱۸نوع آفلاتوکسین تاکنون شناسایی شده‌اند که B_1-B_2- G_1-G_2 و M_1 عمده‌ترین آن‌ها هستند (درس، ۲۰۱۱). امروزه مشخص شده است که این سموم به وسیله‌ی ۳ نوع کپک آسپرژیلوس فلاووس, آسپرژیلوس پارازیتیکو(Aspergillus parasiticus) و آسپرژیلوس نومیوس (Aspergillus nomius) و سویه‌های متفاوت پنی‌سیلیوم (Penicillium), ریزوپوس (Risopos), موکور (Mucor) و استرپتومایسز (Streptomyces) که گیاهان و محصولات گیاهی را آلوده می‌نمایند تولید می‌گردد. آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس در اکثر خاک‌ها یافت می‌شوند و معمولاً در پوسیدگی گیاه دخیل هستند. آن‌ها معمولاً عامل فساد غلات انبار شده و تحت شرایط معینی باعث فساد غلات در مزرعه می‌شود (اگاگ، ۲۰۰۴). عفونت معمولاً بعد از صدمه دیدن دانه یا هسته‌ی محصولات به وسیله‌ی حشرات، پرندگان، موش‌ها، سرمای زودرس، تگرگ، استرس‌های حرارتی، خشکی، گردباد و دیگر شرایط نامساعد هوایی رخ می‌دهد (اگاگ، ۲۰۰۴). در میان انواع سموم آفلاتوکسین شناسایی شده نوع B_1 سمی‌ترین نوع آفلاتوکسین شناخته شده است. میزان سمیت در میان ۴ نوع عمده‌ی آفلاتوکسین به این صورت می‌باشد: $B_1>G_1>B_2>G_2$ ۵۷ آلودگی آفلاتوکسین می‌تواند در طیف وسیعی از غذای دام شامل ذرت, سورگوم, جو, گندم چاودار, گندم, انواع بادام, سویا, برنج , تخم کتان انجیر، ادویه‌جات, انواع آجیل و مواد مختلف غذایی که برگرفته از این مواد اولیه هستند را آلوده می‌نماید شیر تخم‌مرغ و محصولات گوشتی نیز به‌علت آلودگی خوراک دام و طیور می‌توانند آلوده باشند (دیشپاند[4] ۲۰۰۲). ایزوله‌های سمی آسپرژیلوس فلاووس به‌طور کلی تنها آفلاتوکسین B_1 و B_2 را تولید می‌کنند، در حالی‌که ایزوله‌های اسپرژیلوس پارازیتیکوس کلا انواع B_1 B_2 G_1 G_2 را تولید می‌نمایند (اگاگ، ۲۰۰۴؛ دیشپاند، ۲۰۰۲) برخی دیگر از متابولیت‌های شناسایی شده شامل B_{2a}, آفلاتوکسیکول (Aflatoxicol)، آفلاتوکسین H_1، آفلاتوکسین P_1 و آفلاتوکسین Q نیز شناسایی شدند. از میان آفلاتوکسین‌های موجود در غذا نوع B_1، M_1 و G_1 پرایمرهای مهم می‌باشند. که همراه با توکسیکول از نگرانی‌های مربوط به سلامت هستند و در این میان نوع B_1 غالب بوده و ۶۰ تا ۸۰٪ کل آفلاتوکسین‌ها را تشکیل داده و در غیاب آن نوع G_2 G_{12} B12 بروز پیدا نمی‌کنند (اگاگ، ۲۰۰۴).

---
[1] . Wild
[2] . Bakirdere
[3] . Agag
[4] . Deshpande

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، مقایسه میزان وجود آفلاتوکسین B1 در خوراک‌های دام گاوداری‌های شیری در فصول مختلف سال با روش الایزا انجام گرفت.

عوامل مؤثر در رشد قارچ‌ها و تولید مایکوتوکسین در موادغذایی

- ترکیبات موادغذایی

کلیه موادغذایی که به مصرف انسان و یا حیوان می‌رسند به استثنای پروتئین و چربی محیط مناسبی برای رشد قارچ‌ها می‌باشند. تولید ترکین توسط قارچ به محیط کشت آن وابسته است. به‌عنوان مثال ادویه‌ها محیط مناسبی برای رشد قارچ‌ها می‌باشند اما برای تولید توکسین محیط مناسبی نیستند.

گوشت و فرآورده‌های گوشتی، ماهی و تخم‌مرغ محیط مناسبی برای رشد و نمو قارچ‌ها هستند اما تولید توکسین در آن‌ها به‌صورت متوسط صورت می‌گیرد. غلات و فرآورده‌های آن، دانه‌های روغنی و هم‌چنین چای، قهوه، کاکائو محیط مناسبی برای تولید توکسین گزارش شده‌اند (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶؛ لندنفسیلیسر، ۱۹۷۰).

- درجه حرارت

یکی از فاکتورهای مناسب برای رشد میسیلیوم قارچ‌ها، تشکیل جوانه و رشد و ایجاد اسپورها، درجه حرارت می‌باشد. اکثر قارچ‌ها در درجه حرارت بین ۱۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند و درجه حرارت مطلوب برای رشد آن‌ها ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد است.

قارچ‌ها بر اساس درجه حرارت مورد نیاز برای رشد به سه دسته سرمادوست، معتدل - دوست و گرمادوست تقسیم می‌شوند (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶؛ لندنفیسلیسر، ۱۹۷۰).

- رطوبت

مهم‌ترین فاکتور مؤثر در رشد قارچ‌ها رطوبت است. رطوبت علاوه بر تأثیر در میزان رشد

میسیلیوم قارچ و تولید اسپور در میزان جوانه‌زنی اسپورها نیز نقش عمده‌ای دارد. در صورتی که غلات در زمان ذخیره‌سازی دچار صدمه شوند نقش رطوبت در رشد و تکثیر قارچ بیش‌تر آشکار می‌گردد (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶؛ دیسون[5] ۱۹۹۷).

قارچ‌ها را بر اساس نیاز رطوبتی به سه دسته تقسیم می‌کنند:

۱) قارچ‌های خشکی‌دوست که اسپور این قارچ‌ها می‌تواند در شرایط رطوبت کم‌تر از ۸۰ درصد جوانه بزند. رطوبت مناسب برای رشد این قارچ‌ها حدود ۹۵ درصد است.

۲) قارچ‌های معتدل که اسپور آن‌ها در شرایط رطوبت نسبی ۸۰-۹۰ درصد قادر به جوانه زدن هستند و رطوبت نسبی مناسب برای رشد این قارچ‌ها ۹۵-۱۰۰درصد می‌باشد.

۳) قارچ‌های هیدروفیلیک[6]که اسپور این قارچ‌ها در رطوبت نسبی بالای ۹۰ درصد قادر به جوانه زدن هستند و رطوبت مناسب رشد نزدیک به رطوبت نسبی یعنی ۱۰۰ درصد است (لندنفیلسیر، ۱۹۷۰).

رطوبت نسبی با مقدار آب موجود در سوبسترا نبایستی اشتباه شود. رطوبت نسبی بر اساس درجه حرارت غلظتی از آب موجود در سربسترا می‌باشد که سوبسترا قادر است آن را به اتمسفر بدهد (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶).

- فشار اسمزی

قارچ‌ها در محیط کشت با فشار اسمزی بالا (کلرور سدیم یا قند) رفتار متفاوتی دارند. به‌عنوان مثال کپک/

[5] Deacon

[6] Hydrophilic

آسپرژیلوس گلایرکوس[7]در محیط کشت با فشار اسمزی بالا رشد نمی‌کند مگر اینکه محیط دارای ۴۰-۲۰ درصد ساکارز یا معادل مولی آن کلروسدیم باشد (اسپادا[8]و همکاران، ۱۹۹۱).

فشار اسمزی قابل تحمل برای رشد و نمو قارچ‌های توکسین‌زا برابر با ۵۰ درصد غلظت ساکارز همراه با فشار اسمزی مؤثر ترکیبات محیط کشت می‌باشد، لذا مرباجات و ترکیبات غذایی که غلظت مواد قندی آن‌ها حدود ۶۰ درصد به بالاست، از نظر توکسین‌زایی موادغذایی مطمئنی می‌باشند.

نمک طعام در غلظت‌های کم بین ۱ تا ۱/۵ درصد بر روی رشد و نمو قارچ و تولید توکسین اثر تشدیدکننده دارد. از طرف دیگر اثر غلظت نمک طعام بر روی رشد و نمو قارچ و تولید توکسین تابع درجه حرارت و رطوبت محیط می‌باشد (روس، ۱۹۹۷).

- pH

اغلب قارچ‌ها در دامنه pH ۴ تا ۸/۵ قادر به رشد هستند. pH مطلوب آن‌ها ۵ تا ۷ می‌باشد اما بعضی از آن‌ها بر روی محیط‌های خیلی اسیدی و یا خیلی قلیایی نیز رشد می‌کنند (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۹، کلیک[9] ۲۰۰۵).

اثر pH در تولید مایکوتوکسین‌ها در انواع قارچ بستگی به شرایط محیط کشت، ترکیبات غذایی محیط کشت و گونه‌ی قارچ تولیدکننده‌ترین دارد. به‌عنوان مثال آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت با pH اولیه کم‌تر از ۴ رشد نمی‌کند. در بررسی روند تخمیر در قارچ آسپرژیلوس فلاووس[10]مشخص گردید که در ابتدای تخمیر که درجه pH رو به کاهش است آفلاتوکسین تولید نمی‌شود اما به دنبال افزایش درجه pH تولید آفلاتوکسین نیز آغاز می‌گردد به‌طوری که در روز سوم تخمیر که pH برابر با ۴/۷ می‌شود حداکثر میزان تولید آفلاتوکسین دیده

می‌شود. امروزه مشخص شده است که کاهش روند تولید آفلاتوکسین در درجه‌های متفاوت pH ناشی از تأثیر غلظت یون‌های هیدروژن بر متابولسیم تولید مواد مختلف در قارچها می‌باشد.

عوامل بسیاری می‌توانند pH را تحت تأثیر قرار دهند که از آن‌ها می‌توانیم به دی‌اکسیدکربن محلول، شارژ پروتئین غشایی، نمک‌های پایین آورنده‌ی pH و پون‌هایی مثل مس، منگنز و آلومینیوم اشاره کر(پیرچاس[11]۱۹۷۴، روس[12]۱۹۹۷).

عوامل مؤثر در تولید آفلاتوکسین‌ها

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 ۸درصد رطوبت دارد (افشاری و همکاران، ۱۳۹۲).

۲) درجه حرارت: اکثر کپک‌ها در درجه حرارت ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد رشد می کنند و اپتیمم درجه حرارت رشد آن‌ها ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد است. بعضی قارچها قادرند در درجه حرارت‌های بسیار بالا رشد کنند مثلاً آسپرژیلوس 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 قارچ‌های توکسین‌زا 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 توکسین‌زایی مواد غذایی مطمئن می‌باشند. نمک طعام در غلظت‌های کم (بین ۱تا ۱/۵ درصد) روی رشد و نمو قارچ و تولید توکسین اثر تشدید کننده دارد. از طرفی دیگر اثر بازدارنده‌ای نمک در غلظت ۱۴ درصد است (صاحب قلم و همکاران، ۱۳۹۲).

---

[7] Aspergillus glaucus
[8] Espada
[9] Celik،
[10] *Aspergillus flavus*
[11] Purchase
[12] Ross

۴) pH: اغلب قارچها در دامنه‌ی 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 مایکوتوکسین‌ها در انواع قارچها بستگی به شرایط محیط کشت، ترکیبات غذایی محیط کشت و گونه قارچ تولید کننده توکسین دارد. برای مثال قارچ آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس 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 مایکوتوکسین‌ها 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 آسپرژیلوس 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 ویژه‌ای دارد. آسپرژیلوس نایجر در غلظت پایین دی اکسید کربن اسپورهایش جوانه می زنند و آسپرژیلوس فلاووس در غلظت‌های بالای دی اکسیدکربن رشدش متوقف می شود. دی اکسیدکربن 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 درصدافزایش یابد، کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد قارچ و تولید اسپور ایجاد نمی شود ولی در غلظت ۷۵ درصد دی اکسید کربن، از تولید مایکوتوکسین 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.

رخداد آفلاتوکسینها درغذای انسان و دام

رشد گونه‌های آسپرژیلوس تولیدکننده آفلاتوکسین بستگی به چندین سوبسترا و فاکتور محیطی همچون فعالیت آبی(a_w)، دما، pH، پتانسیل اکسیداسیون–احیا، وجود نگهدارنده‌ها و رقابت میکروبی دارد. آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می توانند در فعالیت آبی کم رشد کنند (a_w = ۰/۷۵ – ۰/۸۰)، از این رو توانایی زیست در محیط‌های خشک را دارند. هر دو کپک می‌توانند در محدودهٔ دمایی ۴۸-۱۲ درجه سانتیگراد رشد کنند، گرچه محدوده دمایی مطلوب برای رشد این دو ۴۲-۲۵ درجه سانتیگراد می باشد. بهترین شرایط برای رشد آفلاتوکسین دربخش پایین این محدوده یعنی ۲۵ درجه سانتیگراد قرار دارد.

آفلاتوکسین‌های تولید شده می توانند در طیف گوناگونی از محصولات، منجر به فساد غیرقابل مشاهده در مزرعه (قبل از برداشت)، انبار یا طی فرآوری (بعد از برداشت) شوند. با این وجود، سطوح بالای آلودگی آفلاتوکسینها اساساً مربوط به رشد کپکهای آسپرژیلوس بعد از برداشت در شرایط بد انبار است. غلظتهای آفلاتوکسین در چندین مورد در حد mg/kg گزارش شده است (مکتبی و همکاران، ۱۳۹۳).

بیشترین موادغذایی مطرح که حاوی آفلاتوکسین گزارش شده‌اند غلات نظیر ذرت، جو، جو دوسر، میوه‌های خشک شده نظیر انجیر، دانه‌ها و دانه‌های روغنی نظیر پسته یا بادام زمینی و تخم پنبه، همچنین گونه‌هایی مثل فلفل، پودرفلفل یا فلفل قرمز می باشند. ذرت و بادام زمینی بیشترین موادغذایی آلوده شده در جهان می باشند (زابلی و همکاران، ۱۳۹۳). رخداد آفلاتوکسین‌ها در غذای انسان و دام هنوز به عنوان یک موضوع مطرح در امنیت غذایی است.

متابولیسم (مکانیسم سمیت)

آفلاتوکسینها هپاتوتوکسین‌های قوی هستند و بطور بین المللی در دستهٔ سرطان‌زا ها طبقه‌بندی شده‌اند.

همهٔ گونه‌های حیوانی به آفلاتوکسین‌ها حساس هستند و اردک کوچک دارای بیشترین حساسیت می باشد. مسیر متابولیک آفلاتوکسین‌ها هنوز به درستی مشخص نشده است. به‌طور کلی متابولیسم ۲ مرحله‌ای آفلاتوکسین‌ها پذیرفته شده است. در

اولین مرحله آفلاتوکسین بوسیله اکسیداز چند عملکردی وابسته به سیتوکروم P450 به وابسته‌های الکترون دوست فعال تبدیل می شود و سپس با پیوند کوالانسی به نوکلئوفیل هایی مانند DNA و RNA یا پروتئین‌ها در سلول‌های کبدی متصل می شود (استروکا[۱۳]، ۲۰۰۰).

ابتدا تشکیل میانجی‌های ۸-۹- اپوکسید بسیار واکنش پذیر فرض قرار داده شد و سپس بطور تجربی تأییدگردید. ۸، ۹- اپوکسید الکترون دولت توسط مونو اکسیناژ چند عملکردی میکروزومال[۴]تشکیل می شود که علت سمیت و یا سرطان زایی است. مجموعی از شش متابولیت انسانی در خون، ادرار و بافت هایی از قبیل کبد، بندناف و شیر ردیابی شده اند(۲۳-۲۸).

ترکیب گوانوزین-آفلاتوکسین می تواند منجر به جهش ژن سرکوب کننده تومور P53 شود. بدیهی است که تیمین به جای گوانوزین خوانده می شود و در نتیجهٔ آن یک ترجمهٔ غلط رخ می دهد که در سلولهای توموری کبد قابل مشاهده است (۲۹-۳۰). یکی از متابولیتها آفلاتوکسین M1 است که متابولیت اصلی یافت شده در شیر گاو می باشد. تقریباً یک تا سه درصد آفلاتوکسین B1 بلع شده می تواند به عنوان آفلاتوکسین M1 در شیر گاو ظاهر شود. آفلاتوکسین M1 کمتر از آفلاتوکسین B1 سمی است، با این وجود به علت مصرف بالا و اهمیت شیر در تغذیه انسان، بطور روتین اندازه گیری می شود (آگا، ۲۰۰۴).

گرچه کبد به عنوان اندام هدف آفلاتوکسین M1 شناخته شده است، در معرض قرارگرفتن دستگاه تنفس با گرد و غبار آلوده به آفلاتوکسین B1 با افزایش وقوع تومور در مجاری تنفس حیوانات و انسان همراه است. تجزیه آفلاتوکسین B1 توسط سلول‌های ریه و سلول‌های اپی تلیال مخاط بینی و سپس تشکیل ترکیبات اضافی $B1\text{-}^{DNA}$ گزارش شده است. میکروزوم‌های ریوی خرگوش حاوی میزان زیادی از ایزوفرم‌های سیتوکروم ^{P450} هستند که در فعال‌سازی آفلاتوکسین B1 مؤثرند. مخاط بویایی گاو دارای ظرفیت بالای واکنش زیستی آفلاتوکسین B1 می باشد و از این رو حدس زده می شود که آفلاتوکسین B1 در علت تومورهای بینی گاو دارای نقش باشد. در معرض قرارگرفتن دستگاه تنفس با آفلاتوکسین‌ها که مرتبط با شغل بود، همراه با افزایش غیرمعمول وقوع سرطان ریه در کارگران هلندی گزارش شد (موثق و آدینه‌وند، ۱۳۹۲).

آفلاتوکسین در گاو شیری و گوشتی

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

دیگرعلائم مرتبط با آفلاتوکسیکوزیس حاد عبارتند از: کوری، حرکات دایره‌وار کشیدگی گوش‌ها، وجود کف در دهان، کراتوکونژکتیویت و پرولاپس رکتوم (۲۸)

آسیب کبدی یافته ثابت آفلاتوکسیکوزیس حاد است. جراحات شامل دژنرسیون چربی، مگالوسیتوزیس و نکروز همراه با فیبروزیس سلول‌ها و ازدیاد مجاری صفراوی در مراحل پیشرفته بیماری است (کالوین[۵]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 بیماری‌ها می شود (باشتی[۶]و همکاران، ۲۰۰۹).

سایر علائم شامل کاهش تولید شیر، تولد گوسالههای سالم اما کوچک‌تر از حد طبیعی، اسهال، ورم پستانحاد، اختلالات تنفسی، پرولاپس رکتوم و ریزش مو می باشد (ری[۷]و همکاران، ۱۹۸۶).

---

[1] . Stroka [3]

[1] . Microsomal mixed-function mono-oxygenase (MFO) [4]

[1] . Colvin [5]
[1] . Dashti [6]
[1] . Ray [7]

سطح بالای آفلاتوکسین (ppm ۴) باعث افت تولید شیر طی یک هفته و سطوح پایین‌تر (ppm ۰/۴) (باعث افت تولید شیر طی ۴-۳ هفته می شود.

به علت خطر باقی مانده آفلاتوکسین در شیر، آفلاتوکسین رژیم غذایی باید زیر ppm ۲۵ نگه داشته شود. این مقدار محافظه کارانه بعلت توزیع غیر یکنواخت آفلاتوکسین در دانه‌ها و مواد غذایی، قطعی نبودن نمونه‌برداری و آنالیز جیره و وجود بیش از یک منبع آفلاتوکسین در جیره است.

آفلاتوکسین‌ها با کاهش هضم سلولز، تولید اسید چرب فرار و پروتئولیز می توانند روی حرکات و عملکرد شکمبه تأثیر گذار باشند (پلیدین[۱۸] و همکاران، ۲۰۱۴). روش‌های تشخیص آلودگی موادغذایی به آفلاتوکسین‌ها

برای تشخیص و اندازه‌گیری آفلاتوکسین موجود در موادخوراکی مختلف روش‌های متفاوتی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (ThinLayerChromatography)، کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (High Pressure Liquid Chromatography)، کروماتوگرافی گازی - اسپکترومتری جرمی (Mass Spectrophotometry) و الایزا (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) وجود دارند (رنجبر، ۱۳۸۹). روش TLC دارای ضریب تغییرات نسبتاً بالایی می‌باشد و تنها در جایی که سطوح آلودگی مایکوتوکسین بالاتر از حدود کنترل باشد، کاربرد دارد. سایر روش‌های کروماتوگرافی مانند HPLC تکنیک‌های بسیار گران‌قیمت و وقت‌گیر هستند. از طرف دیگر در روش‌های TLC و HPLC نیاز به یک مرحله استخراج با فاز جامد یا ستون ایمونوافینیتی (immunoaffinity)، می‌باشد. بنابراین در مطالعات و آزمون‌های معمول، روش‌های ایمونولوژیک (Immunologic) کنونی به روش‌های کروماتوگرافی ترجیح داده می‌شوند. در حال حاضر علاقه به استفاده از کیت‌های تست ELISA به دلیل نیاز به حجم کم نمونه و روش ساده‌تر تخلیص نمونه نسبت به روش‌های مرسوم مانند TLC و HPLC بیش‌تر می‌باشد. این روش‌ها سریع، ساده، خاص، حساس و قابل استفاده در بسیاری از موارد بوده و از متداول‌ترین روش‌های سریع برای تشخیص مایکوتوکسین‌ها در غذا دام و خوراک انسان شناخته شده‌اند. از این‌رو در این پژوهش این روش مورد استفاده قرار گرفته است (سالاری، ۱۳۹۰).

اقدامات ایمنی و سلامتی هنگام کار کردن با آفلاتوکسین‌ها

- از سیگار کشیدن یا خوردن یا آشامیدن یا پیپت کردن با دهان در آزمایشگاه خودداری نمایید.
- هنگام کار کردن با نمونه‌های آلوده، دستکش یک‌بار مصرف بپوشید.
- از تماس محلول سوبسترا و متوقف‌کننده با پوست و مخاط جلوگیری نمایید (باعث تحریک، سوختگی یا مسمومیت می‌شوند). در صورت تماس، ناحیه‌ی آلوده شده را با مقدار زیادی آب شستشو دهید.
- کارکردن و انهدام محصولات شیمیایی باید طبق اصول آزمایشگاهی انجام شود.
- آفلاتوکسین‌ها مواد بسیار سمی هستند. می‌توانند باعث سرطان یا آسیب‌های غیرقابل بازگشت در ماده ژنتیکی شوند. آفلاتوکسین‌ها بعد از استنشاق، بلع یا تماس پوستی سمی هستند، لذا باید لباس محافظت کننده‌ی مناسب پوشیده شود (تاجیلی[۱۹]۲۰۱۱).

پیشینه تحقیق

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

سالمی و همکاران (۱۳۹۳) تعیین میزان آفلاتوکسین B_1 در خوراک جوجه گوشتی در مرغداری‌های استان اصفهان را مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد ۹۸/۹٪ نمونه‌ها آلوده می‌باشند و محدوده آلودگی در نمونه‌های مثبت بین ۰/۶۴ تا ug/kg ۸۸/۵ و میانگین آنها ug/kg ۹/۹۱ بود. بیشترین میزان آلدوگی در سطح بالاتر از yg/kg ۱۰ (حد مجاز آفلاتوکسین در جیزه مرغ گوشتی) به‌دان مخلوط (ug/kg ۴۶/۲) و سویا (ug/kg ۳۳/۴) تعلق دارد و ۲۸/۸۱ درصد از مجموع نمونه‌ها

[1] . Pleadin [8]
[1] Tajalli [9]

آلودگی بیشتر از حد استاندارد دارند. نمونه‌های 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 نمونه‌های سیار فصول اختلف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$).

عزیزی و همکاران (۱۳۹۱) میزان آفلاتوکسین B_1 را در ۹۶ نمونه خوراک دام شامل کنسانتره، تفاله چغندر قند و کنجاله پنبه و در ۳ فصل زمستان، بهار و تابستان با روش الایزا در شمال ایران بررسی کردند. ۴٪ ۴۴ از نمونه‌هایی که از گاوداری‌های سنتی و ۱٪ ۴۳ از نمونه‌هایی که از گاوداری‌های نیمه صنعتی تهیه شده بودند بیش از میزان مجاز آلودگی داشتند. میزان آفلاتوکسین B_1 در کنسانتره، تفاله چغندرقند و کنجاله پنبه به ترتیب ۸٪، ۵۸، ٪۷، ۴۳ و ٪۷، ۲۶ در زمستان، بهار و تابستان به ترتیب ٪۴، ۵۶، ٪۷، ۳۸ و ٪۴، ۳۴ گزارش شد (عزیزی،[۲۰۱۲]).

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 آفلاتوکسینB_1 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 چهار محال بختیاری جمع‌آوری شدند را با روش الایزا بررسی نمودند. میزان آفلاتوکسین در محدوده‌ای مابین ۰/۸ میکروگرم در کیلوگرم ردیابی شد. در ۱۵۵، ۱۸ میکروگرم در کیلوگرم ردیابی شد. در ۱۹ نمونه میزان آفلاتوکسین B_1 بیش از حداکثر قابل قبول بود. هم‌چنین نتایج نشان دادند که سطح آلودگی آفلاتوکسین B_1 در اقلام خوراک دام در نمونه‌های زمستان بطور قابل ملاحظه‌ای بیش از نمونه‌های زمستان بوده است.

عباسی فر (۱۳۸۴) نیز در مطالعه‌ای مشابه در زمینه بررسی آفلاتوکسین B_1 خوراک دام در گاوداری‌های صنعتی اطراف شیراز نشان داد بالاترین سطح آلودگی به آفلاتوکسین B_1 مربوط به کنجاله پنبه دانه، ذرت و تفاله چغندر قند بوده است.

مصری‌پور و همکاران (۱۳۸۴) وجود آفلاتوکسن B_1 را در ۹۷ نمونه خوراک دام شامل ذرت، گندم، جو، سبوس برنج، سبوس پنبه، خوراک علوفه خشک و نان بازیافت شده در مناطق مختلف اصفهان بررسی کردند.

کاظمی (۱۳۷۸) در همین راستا در بررسی میزان آلودگی کنجاله پنبه دانه مصرفی در گاوداری‌های صنعتی اطراف اصفهان مشخص گردید که در ۶ نمونه (۴۰ درصد) میزان آلودگی به آفلاتوکسین بین ۲۵ تا ۵۰ نانوگرم در گرم (میانگین ۳۹/۱۶ نانوگرم در گرم) بود

همچنین رحیمی و همکاران (۱۳۷۸) در تحقیق دیگری، گزارش نمودند که در ۱۷/۶ درصد نمونه‌های خوراک دام مورد بررسی (یونجه خشک، ذرت، سیلوی ذرت، کنجاله تخم پنبه، جو و سبوس گندم) میزان آلودگی بیشتر از حد مجاز بود.

در این خصوص رضوی دهکردی (۱۳۵۴) میانگین میزان آلودگی به آفلاتوکسین در ۱۴۷ نمونه پنبه دانه و ۱۴۳ نمونه کنجاله پنبه دانه جمع‌آوری شده از سراسر ایران را ۴۶ نانو گرم در گرم گزارش نموده است.

در بررسی ارسالی و همکاران (۲۰۰۸) از ۹۱ نمونه خوراک دام مورد آزمایش در فصل بهار، تابستان، پائیز و زمستان به ترتیب ۱۵/۷۸، ۵۶/۲۵، ۷۵ و ۳۳/۳۳ درصد، آلودگی بالاتر از سطح مجاز را نشان دادند.

آکسوی و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود میزان آفلاتوکسین B_1، زرالنون و T-2 TOXINرا در ۴۰ نمونه خوراک نشخوارکنندگان در ایالت سامسون ترکیه به روش الایزا بررسی کردند. دامنه و میانگین آلودگی به آفلاتوکسین B_1 به ترتیب ۳۲-۱۵ میکروگرم در کیلوگرم و ۶، ۸۱ میکروگرم در کیلوگرم بود. میزان آلودگی نمونه‌ها به آفلاتوکسین B_1 حدود ۹۵ درصد، زرالنون ۸۷، ۵ درصد و T-2 TOXIN ۶۵درصد گزارش شد (آکسوی،[۲۰۰۹۲۱]).

---

[2] Azizi [0]

[2] Aksoy [1]

الزوپیر و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه دیگری میزان آلودگی خوراک و شیر 5 مزرعه گاو شیری را به آفلاتوکسین‌ها و اکراتوکسین در سودان بررسی کردند. آفلاتوکسین‌ها با روش HPLC اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که 6 نمونه از ۹ نمونه خوراک (۶۶، ۶۷درصد) به آفلاتوکسین با دامنه غلظت ۱۴۷، ۱۳تا ۲، ۷۹ میکروگرم در کیلوگرم آلوده بودند. آفلاتوکسین B_1 غالب‌ترین نوع آلودگی آفلاتوکسین بود که در 5 نمونه از ۹ نمونه (۶۰درصد) و AFMI نیز در ۳ نمونه از 5 نمونه (۶۰ درصد) با میانگین غلظت ۰، ۱۶ میکروگرم در لیتر وجود داشت (ایزوپیر[۲]،۲۰۰۹).

هونگ[۳] و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود میزان آفلاتوکسین B_1 وB_2 را در 20 نمونه محصولات ذرت و بادام زمینی به روش کروماتوگرافی مایع بررسی کردند. آفلاتوکسین B_1و B_2 در 5 نمونه از ۹ نمونه بادام زمینی و ۵ نمونه از ۱۱ نمونه ذرت با دامنه‌ای از ۰، ۲ تا ۱۰۱، ۸ میکروگرم در کیلوگرم تعیین شد (هونگ، ۲۰۱۰).

آیجویو و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه خود از روش الایزا جهت تعیین سطح آفلاتوکسین B_1 در ۹۹ نمونه بادام زمینی و حبوبات مصرفی شهروندان نیجریه استفاده کردند. نتایج نشان داد که 51 درصد از کل نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین B_1 هستند و میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در نمونه‌های بادام زمینی طیفی از ۶، ۲۵ تا ۷، ۸۰ نانوگرم در گرم، در نمونه‌های ارزن طیفی از ۴، ۱۸ تا ۲۸، ۵ نانوگرم در گرم و در نمونه‌های ذرت طیفی از ۲، ۵۱ تا ۳، ۹۴ نانوگرم در گرم بود (ایجوی[۴]، ۲۰۱۱).

روش تحقیق

با توجه به گسترش دامداری‌های بزرگ و خصوصا گاو شیری در سراسر کشور به منظور تامین شیر ومواد لبنی مورد نیاز مردم، بررسی مواد غذایی که به این حیوانات داده می‌شود اهمیت می‌یابد. برای این منظور، خوراک دام ۵ گاوداری شیری اطراف شهر تربت-حیدریه در محدوده زمانی ده ماهه(از آبان ماه ۱۳۹۷ تا مرداد ماه ۱۳۹۸)انتخاب و بررسی گردید. آفلاتوکسین موجود در خوراک‌های (سیلو ذرت، کنسانتره، خوراک آماده و کاه) گاوهای شیری با استفاده از کیت الایزا مختص اندازه گیری آفلاتوکسین B_1 (شرکت Euro Proxima، هلند) در قالب ۲ فصل سرد و گرم، اندازه گیری شد و با توجه به منابع تأمین خوراک دام و نوع یا علایم بیماری‌های رایج در هر دامداری، به طور جداگانه اقدام به برداشت نمونه خوراک دام مصرفی گردید. جهت نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف خوراک، حداقل به مقدار ۵۰۰ گرم به‌طور 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 تربت‌حیدریه 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 جمع‌آوری و به روش الایزا از نظر میزان آلودگی به آفلاتوکسینB_1 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 کاملا خرد و پودر گردید. سپس ۳ گرم از پودر به دست آمده توزین شده و ۹ میلی لیتر متانول۸۰٪ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه به طور کامل شیکر گردید. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت Xg ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس توسط سمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت فوقانی مایع برداشت و درون چاهک‌های میکرو پلیت الگو ریخته شد؛ سپس توسط سمپلر۸ 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، باقر رقیق کننده ۴ برابر و بافر شستشو ۲۰ برابر رفیق می‌گردید که جهت این کار ۲۰ میلی لیتر باقر رقیق کننده با ۶۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و به حجم ۸۰ میلی لیتر رسانده شد و ۳۰ میلی لیتر باقر شستشو با ۵۷۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و به حجم ۶۰۰ میلی لیتر رسانده شد. جهت آماده‌سازی saunple

[2] Elzupir [2]
[2] Hong [3]
[2] Ayejuyo [4]

dilution buffer ۲ میلی لیتر متانول ۱۰۰ درصد به ۸ میلی لیتر باقر 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 رقیق‌سازی استاندارد در چاهک A_1 بعنوان شاهد و مقدار ۵۰ میکرولیتر از استاندارد صفر در چاهک B_1 بعنوان B_{MAX} (حدکثر جذب نوری) و مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر محلول استاندارد آفلاتوکسینB_1 (۶استاندارد) تهیه شده بوسیله‌ی شرکت سازنده (Europro ima) در چاهک‌های C_1 تا H_1 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 $flato_x$ ine-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 ($_0D$) نمونه‌ها با قرائت کننده مخصوص الایزا در طول موج ۴۵۰ nmقرائت 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.

$$\text{درصدجذب (OD)} = \frac{\text{جذب نوری شاهد} - \text{جذب نوری استاندارد یا نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد صفر}} \times ۱۰۰$$

رسم منحنی کالیبراسیون

حداکثر درصد جذب محاسبه شده برای نمونه‌های استاندارد، روی محور Y و غلظت آفلاتوکسین B_1 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.

یافته ها

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.

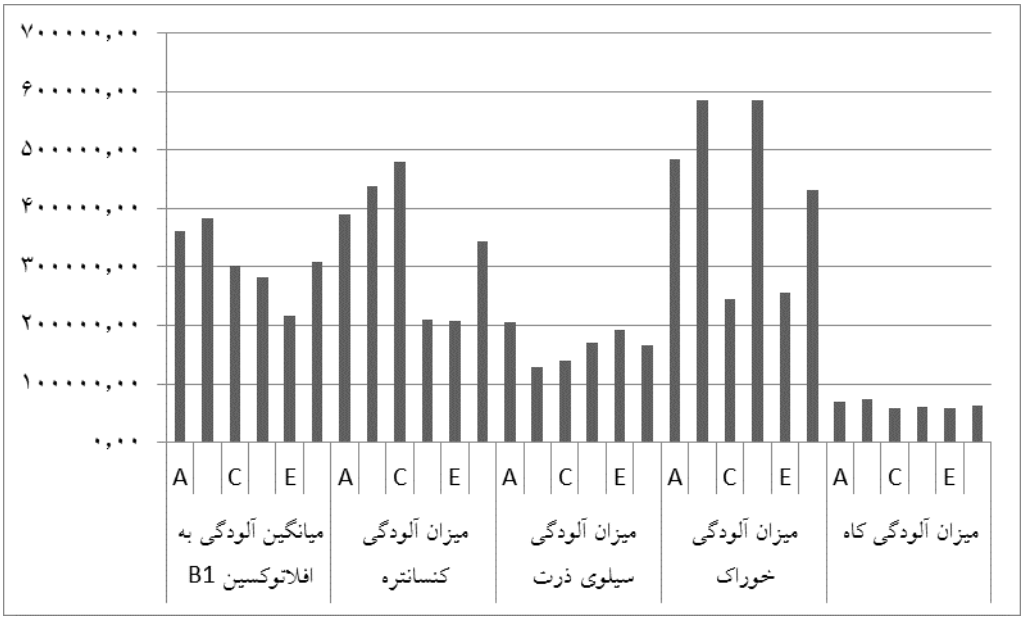
جدول۱: دامنه، میانگین و انحراف معیار میزان آفلاتوکسین B1 در تمامی نمونه‌های خوراک دام طی فصول مختلف سال

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 جدول۱: 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	۰/۵۰۰۰
	کل	۶/۳۸۰۰	۰/۹۴۶۸۰

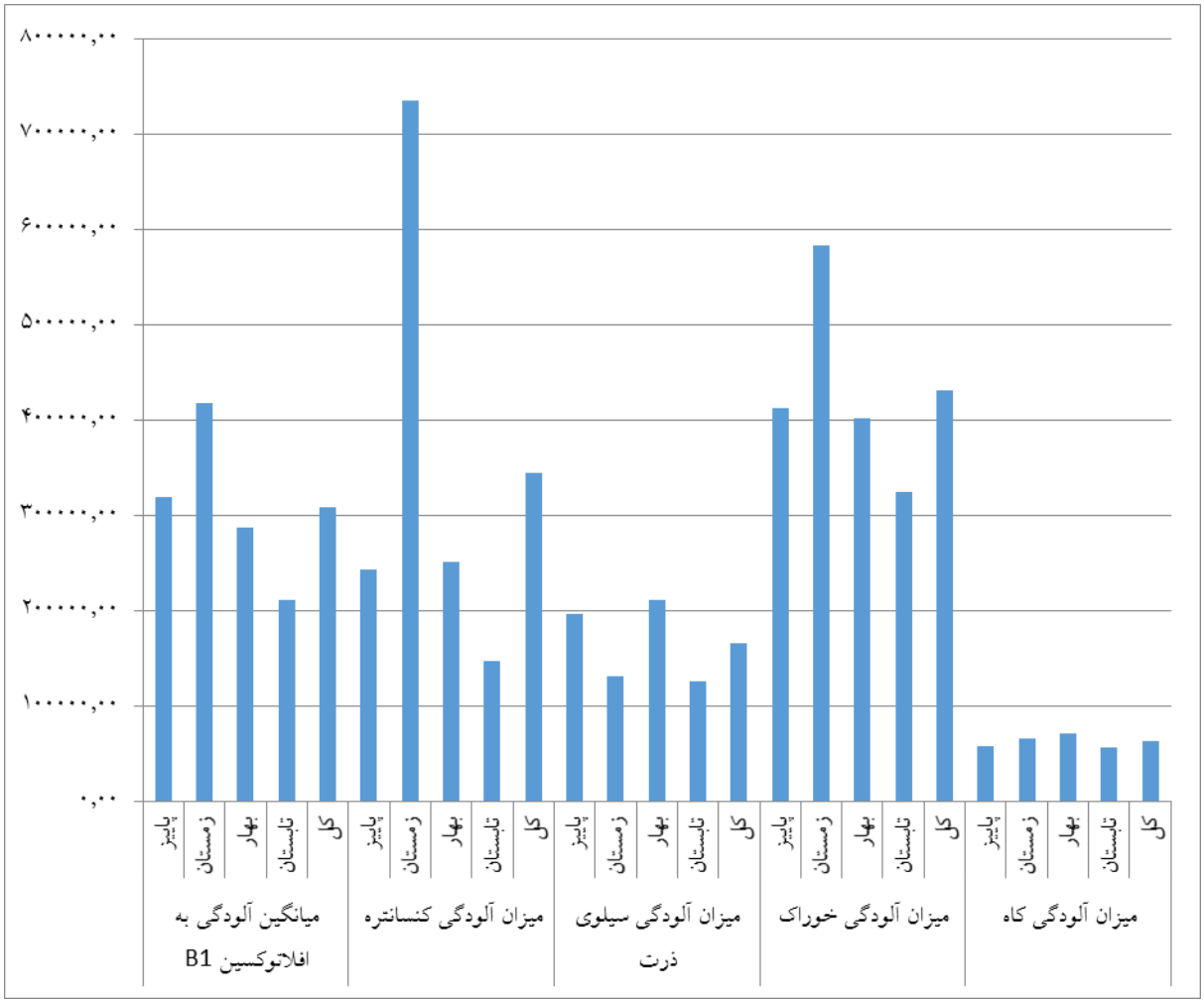


نمودار ۱: میانگین و انحراف استاندارد آلودگی بر حسب گاوداری

جدول۲: میانگین و انحراف استاندارد آلودگی بر حسب فصل

نوع خوراک	فصل	میانگین	انحراف استاندارد
میانگین آلودگی به B1 افلاتوکسین	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	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

۰/۸۹۲۷۵	۶/۶۸	زمستان	
۰/۹۲۷۳۶	۷/۲۰	بهار	
۰/۶۳۴۸۲	۵/۷۶	تابستان	
۰/۹۴۶۸۰	۶/۳۸	کل	



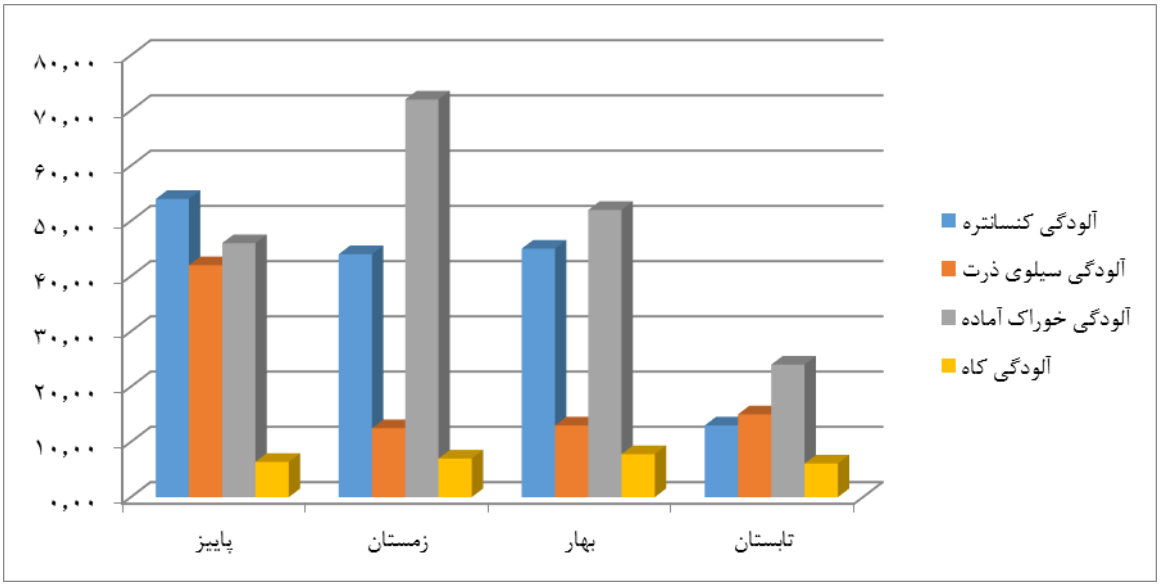
نمودار۲: میانگین و انحراف استاندارد آلودگی بر حسب فصل

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 B_1 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 B_1 بودند.
میانگین غلظت آفلاتوکسین B_1 در کل نمونه‌های کنسانتره، سیلوی ذرت، خوراک آماده و کاه در فصل پاییز به ترتیب ۲۴/۴، ۱۹/۷، ۴۱/۳ و ۵/۸۱ میکروگرم در کیلوگرم و در فصل زمستان به ترتیب۴۱/۸، ۷۳/۶، ۱۳/۲، ۵۸/۴و 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 به‌ترتیب ۲۱/۱، ۱۶/۸، ۱۲/۷، ۳۲/۵ و ۵/۷۶ میکروگرم در کیلوگرم به‌دست آمد (جدول ۴-۲).
میانگین آلودگی اقلام خوراکی در فصل پاییز ۲۴/۵۹ میکروگرم در کیلوگرم، در فصل زمستان۴۸/۴۲ 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 B_1 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 به‌دست آمد.
بیشترین میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 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 کاه نمونه‌های با میانگین ۶/۳۸ میکروگرم در کیلوگرم بود (جدول ۱؛ نمودار ۱). بیشترین میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 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 ۲؛ شکل ۲).
سطح آلودگی به آفلاتوکسین B_1 در تمامی اقلام خوراکی بجز یک نمونه بالاتر از حداکثر میزان قابل قبول استاندارد ملی (۵ ng/g) بود.

جدول۳ میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری A

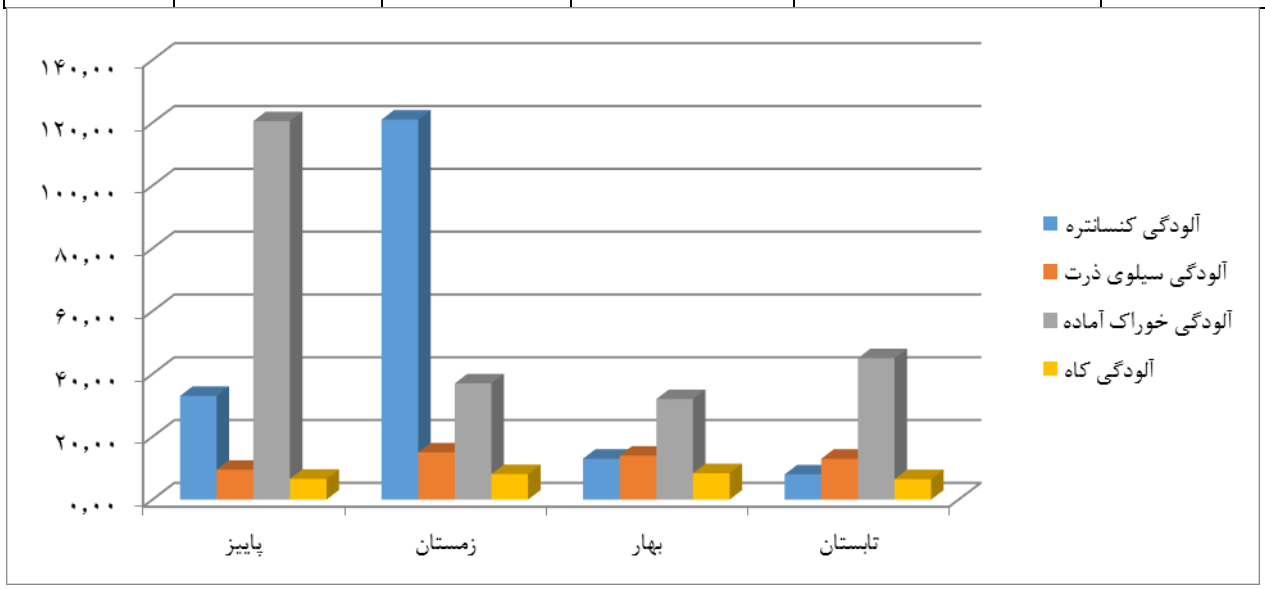
گاوداری A	میانگین آلودگی به افلاتوکسین B1 (میکروگرم/ کیلوگرم)	میزان آلودگی کنسانتره	میزان آلودگی سیلوی ذرت	میزان آلودگی خوراک آماده	میزان آلودگی کاه
پاییز	۴۸	۵۴	۴۲	۴۶	۴ .۶
زمستان	۴۳	۴۴	۱۲/۵	۷۲	۷
بهار	۳۶	۴۵	۱۳	۵۲	۸ .۷
تابستان	۱۸	۱۳	۱۵	۲۴	۱ .۶
	۳۶	۳۹	۲۰/۵	۴۸	۱۳/۵



نمودار۳: میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری A

جدول۴ میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری B

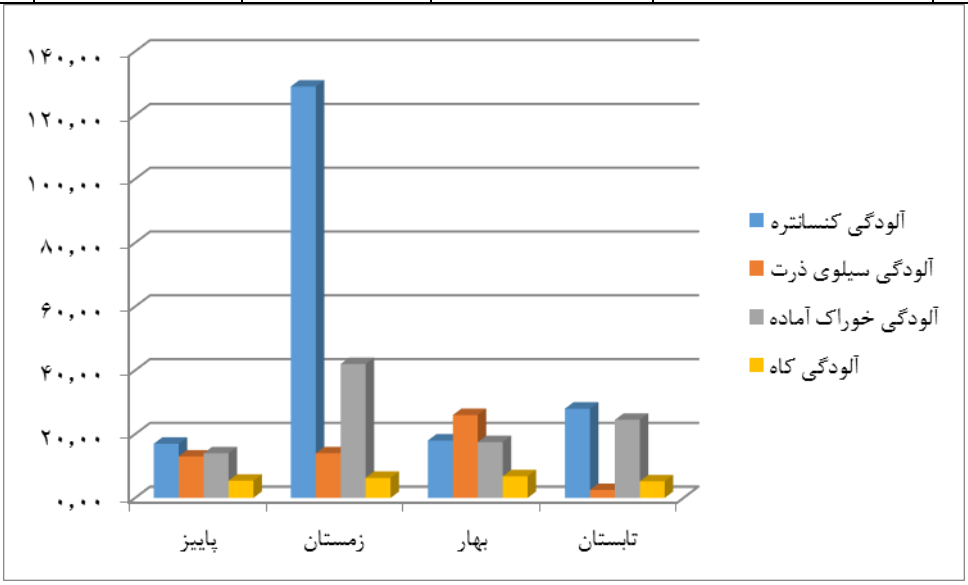
گاوداری B	میانگین آلودگی به افلاتوکسین B1 (میکروگرم/ کیلوگرم)	میزان آلودگی کنسانتره	میزان آلودگی سیلوی ذرت	میزان آلودگی خوراک آماده	میزان آلودگی کاه
پاییز	۵۴	۳۳	۹/۵	۱۲۰/۵	۶ .۶
زمستان	۵۹	۱۲۱	۱۵	۳۷	۱ .۸
بهار	۱۹	۱۳	۱۴	۳۲	۴ .۸
تابستان	۲۱	۸	۱۳	۴۵	۵ .۶
	۳۸	۴۴	۱۳	۳۱	۷/۵



نمودار۴: میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری B

جدول۵: میزان آلودگی آفلاتوکسین B1 در گاوداری C

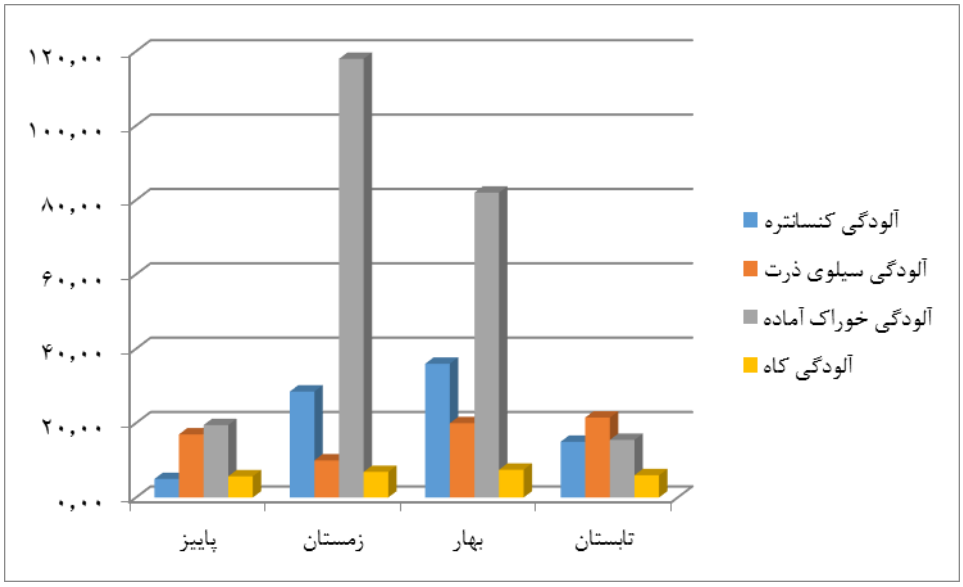
گاوداری C	میانگین آلودگی به افلاتوکسین B_1 (میکروگرم/ کیلوگرم)	میزان آلودگی کنسانتره	میزان آلودگی سیلوی ذرت	میزان آلودگی خوراک آماده	میزان آلودگی کاه
پاییز	۱۵	۱۷	۱۳	۱۴	۴ .۵
زمستان	۶۲	۱۲۹	۱۴	۴۲	۳ .۶
بهار	۲۰	۱۸	۲۶	۱۷/۵	۸ .۶
تابستان	۲۴	۲۸	۲۰/۵	۲۴/۵	۲ .۵
	۳۰	۴۸	۱۸	۲۴/۵	۶



نمودار۵: میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری C

جدول ۶: میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری D

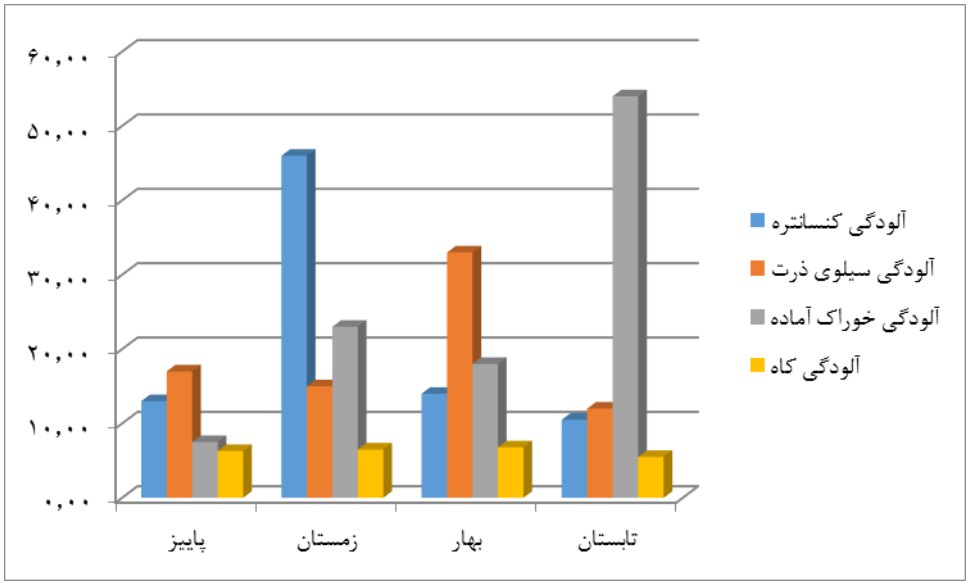
گاوداری D	میانگین آلودگی به افلاتوکسین B_1 (میکروگرم/ کیلوگرم)	میزان آلودگی کنسانتره	میزان آلودگی سیلوی ذرت	میزان آلودگی خوراک آماده	میزان آلودگی کاه
پاییز	۳۲	۵	۱۷	۱۹/۵	۷ .۵
زمستان	۱۷	۲۸/۵	۱۰	۱۱۸	۹ .۶
بهار	۴۶	۳۶	۲۰	۸۲	۵ .۷
تابستان	۱۸	۱۵	۲۱/۵	۱۵/۵	۶
	۲۸	۲۱	۱۷	۵۹	۶/۵



نمودار۶: میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری D

جدول۷: میزان آلودگی آفلاتوکسین B_1 در گاوداری E

گاوداری E	میانگین آلودگی به افلاتوکسین B_1 (میکروگرم/ کیلوگرم)	میزان آلودگی کنسانتره	میزان آلودگی سیلوی ذرت	میزان آلودگی خوراک آماده	میزان آلودگی کاه
پاییز	۱۱/۵	۱۳	۱۷	۷/۵	۳ .۶
زمستان	۲۸	۴۶	۱۵	۲۳	۵ .۶
بهار	۲۳	۱۴	۳۳	۱۸	۸ .۶
تابستان	۲۵/۵	۱۰/۵	۱۲	۵۴	۵ .۵



نتیجه گیری

این پژوهش با هدف مقایسه میزان وجود آفلاتوکسین B1 در خوراک‌های دام گاوداری‌های شیری در فصول مختلف سال انجام گردید. برای تعیین این میزان محدوده زمانی بین (آبان ماه ۱۳۹۷ لغایت مرداد ماه ۱۳۹۸)درگاوداری‌های شیری اطراف شهر تربت-حیدریه انتخاب و بررسی گردید. آفلاتوکسین موجود در خوراک‌های (سیلو ذرت، کنسانتره، خوراک آماده و کاه) گاوهای شیری به روش الایزا اندازه‌گیری شد.

در مطالعه حاضر، از ۸۰ نمونه خوراک آزمایش شده، تعداد ۸۰ نمونه (٪۱۰۰) با میانگین ۲۵/۷۹ میکروگرم در کیلوگرم آلوده به آفلاتوکسین B_1 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 تهویه‌ی مناسب بیان شده است (لیو[۵]؛ همکاران، ۲۰۰۶). البته شرایط دمایی پایین ذکر شده در این مطالعه با مطالعه‌ی 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 تولید کننده‌ی آفلاتوکسین در خوراک دام (گاو) در همدان طی فصول تابستان و زمستان توسط Ghiasian و Maghsood 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 سویه‌های 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[۶]؛ 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 B_1 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 شایط نگهداری مناسب در انبارها باشد. و متأسفانه به دلیل انبارداری نامناسب، عدم دسترسی به علوفه تازه به اندازه کافی، شرایط بد ازیافت و عدم نگه‌داری صحیح نان‌های خشک در هر زمانی ایجاد آلودگی می‌کند.

نتایج مشخص کردند که میزان آلودگی به آفلاتوکسین B_1 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، اا‌ز آن جایی که بلع خوراک آلوده به آفلاتوکسین B_1 توسط حیوانات اهلی باعث تبدیل آنبه آفلاتوکسین

---

[2] . Liu [5]

[2] . Ghiasian [6]

M_1 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).
سطح بالای آفلاتوکسین در نمونه‌های خوراک، نیاز به اقدامات نظارتی منظم و کنترل سطح آفلاتوکسین B1 را در محصولات کشاورزی که به عنوان خوراک دام و غذای انسان استفاده می‌شوند، تأیید می‌کند. روش الایزا می‌تواند روش موثری به منظور نظارت آلودگی آفلاتوکسین در تعداد زیادی از نمونه‌ها باشد و در صرفه‌جویی زمان و بها نیز موثر است (آیجویو[۲۷]۲۰۱۱).
بهترین روش برای کنترل آلودگی به آفلاتوکسین‌ها، می‌تواند آموزش‌های مناسب کشاورزان در خصوص مراحل داشت و برداشت. محصولات به‌منظور جلوگیری از آلودگی به قارچ‌های آسپیرژیلوس و نیز دامداران به منظور نگهداری خوراک دام در شرایط مناسب انبارداری جهت پیشگیری از رشد و تکثیر قارچ‌های گروه آسپیرژیلوس و تولید آفلاوکسین‌ها باشد.

پیشنهادات

با توجه به نتایج و یافته‌های پژوهش، پیشنهاد می‌شود انجام اقدامات تشویقی برای دامدارانی که اصول بهداشتی را رعایت می‌کنند از طریق تحویل سهمیه خوراک دام با قیمت مناسب توسط وزارت جهادکشاورزی و اتحادیه تعاونی‌های دامداران انجام شود و بازدید از دامداری‌ها و ارائه خدمات مشاوره‌ای توسط کارشناسان در فصول مختلف سال در برنامه اداره دامپزشکی قرار گرد. و با اعطای وام‌های ضروری با سود کم به دامداران جهت احداث انبارهای ذخیره خوراک دام بهداشتی کمک شود و در سطح وسیع‌تری از مواد غذایی مورد مصرف دام‌های شیری مورد بررسی قرار گیرند. و از روش‌هایی با دقت و حساسیت بالاتر مانند HPLC جهت تأیید تشخیص سطوح آلودگی استفاده گردد. همچنین آلودگی مواد غذایی به سم آفلاتوکسین که متابولیت ثانویه تولیدشده توسط قارچهای رشته‌ای میباشد، همواره یک مشکل اساسی درمورد ایمنی مواد غذایی مورد استفاده انسان بوده است. در این میان، آلودگی خوراک مصرفی دامها به دلیل امکان توانایی انتقال متابولیت‌های 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 لایی، قنبر (۱۳۹۲). بررسی اقر میدان مغناطیسی ایستا و زمان بر رشد قارچ آسپرژیلوس
- جمالی امام قیس، نگین و معینی، محمد مهدی (۱۳۸۹). مطالعه وضعیت آلودگی آفلاتوکسین در شیر و خوراک دام گاوداری‌های استان کرمانشاه با استفاده از روش الایزا. نشریه دامپزشکی(پژوهش و سازندگی). شماره۸۷.
- رحیمی، ابراهیم؛ کارگر، عبدالرسولو زمانی، فرشاد (۱۳۸۷). ارزیابی سطح آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام مزارع گاو شیری استان چهار محال و بختیاری. پژوهش و سازندگی در امور دام و آزیان، شماره۷۹، تابستان۱۳۸۷.
- رضوی دهکردی، محمد (۱۳۵۴). جستجو و تعیین مقدار آفلاتوکسین در پنبه دانه و باقیمانده آن بعد از روغن کشی، پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای رشته داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.
- زابلی، فاطمه؛ غلام پورعزیزی، عیسی؛ روحی، سمانه و مهسا، عظیمی (۱۳۹۳). تعیین میزان آفلاتوکسین B_1 در نمونه‌های آرد گندم شهرستان چالوس (استان مازندران) به روش الیزا. نشریه علوم پزشکی زانکو. دوره۱۵، شماره۴۴، ص۶۰-۶۷.
- سالاری ر، حبیبی نجفی م ب، بروشکی م ط و همکاران. (۱۳۹۰) مقایسه دو روش الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در تعیین آفلاکتوسین B_1و اکراتوکسین A در فلفل قرمز ایران. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی؛ ۲۱؛ ۴۸۱-۴۹۱.
- سالمی، اردشیر؛ رحیمی، ابراهیم؛ فغانی، مصطفی و سالمی، نسیم (۱۳۹۳). تعیین میزان آفلاتوکسین B_1 در خوراک جوجه گوشتی در مرغداری‌های استان اصفهان. مجله پژوهش‌های بالینی دامپزشکی، دوره۵، شماره۲، ص۱۱۷-۱۲۳.
- صاحب قلم، هاله؛ محمدی ثانی، علی؛ مهریان سنگ آتش، معصومه (۱۳۹۲). حذب بیولوژیکی آفلاتوکسین B_1 توسط مخمر ساکارومایسی سرویزیه در خوراک دام. نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی). دوره۵، شماره۳، ص۹۹-۱۰۴.

[2] . Ayejuyo [7]

- عظیمی، مهسا؛ غلام‌پورعزیزی، عیسی؛ روحی، سمانه و زابلی، فاطمه (۱۳۹۴). کاهش زیستی آفلاتوکسین B_1 در آرد گندم با استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه. نشریه طب جنوب. دوره۱۸، شماره۴، ص۷۰۱-۷۱۰.
- کاظمی، ع. ر (۱۳۷۸). بررسی میزان آلودگی کنجاله پنبه دانه مصرفی گاوداری‌های صنعتی اطراف اصفهان به آفلاتوکسین، پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای رشته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد.
- مرتضوی، علی و طباطبایی، فریده (۱۳۷۶). توکسین‌های قارچی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد، صفحات: ۶۵-۵۶، ۳۱-۳۹.
- مکتبی، سیاوش؛ حاجی حاجی کلایی، محمدرحیم؛ قربانپور، مسعود و ورنامخواستی، محمد (۱۳۹۳). مطالعه آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام دامداری‌های گاو شیری سنتی اهواز. نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی (پژوهشنامه دامپزشکی گرمسار). دوره۱۰، شماره۱، ص۴۵-۵۵.
- موثق، محمدحسین و آدینه‌وند، سعید (۱۳۹۲). مطالعه میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر خام مراکز جکع‌آوری شیر در شهر تبریز. بهدشات مواد غذایی، دوره۳، ماره۱۰، ص۷۰-۶۳.
- Agag BI. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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
- 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.
- 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.