ارزیابی فلور قارچی خوراک دام و سنجش غلظت آفلاتوکسین M_1 در شیر گاوداری‌های سنتی استان چهارمحال و بختیاری

رحیمیان، ی.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

خلاصه

این پژوهش که به منظور بررسی فلور قارچی خوراک دام مصرفی و غلظت آفلاتوکسین M_1 در شیر تولید شده گاو داری های سنتی استان چهارمحال و بختیاری صورت گرفت، از ابتدای سال ۱۳۹۹ تا ابتدای سال۱۴۰۰ (به مدت یکسال) از نمونه‌های خوراک دام مصرفی سالانه در هر فصل چهار نوبت در دوازده گاوداری شیری سنتی با تعداد دام بالای ۱۵ راس، واقع در نقاط مختلف شهرستان شهرکرد مرکز استان چهارمحال و بختیاری به صورت تصادفی نمونه‌برداری انجام گرفت. جداسازی، کشت و تشخیص قارچ های موجود در خوراک و همچنین غلظت آفلاتوکسین موجود در شیر تولیدی به منظور بررسی ارتباط بین ترکیب خوراک دام، کپک و آفلاتوکسین M_1 در شیر گاو با استفاده از روش الایزا مورد سنجش و اندازه گیری قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد موادتشکیل دهندهٔ خوراک دام شامل ذرت، کنجاله پنبه دانه و کلزا، مکمل های غذایی، جو، سبوس گندم، نان خشک، پودر چربی و یونجه حاوی عوامل آلودگی و کپک های آسپرژیلوس فلاووس،کلاوانتوس و ریزوفوس استولونیفر بودند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد آفلاتوکسین M_1 در شیر تمامی دامداری های تحت مطالعه در طی دوره آزمایش وجود داشت. نتایج آنالیزهای آماری صورت گرفته بر روی داده های خوراک دام و آفلاتوکسین وجود ضریب همبستگی قوی بین کنجاله کلزا و سویا با کپک های آسپرژیلوس در خوراک دام و آلودگی شیر به آفلاتوکسین را تأیید نمود. به صورت کلی با توجه به نتایج این تحقیق، کنترل آلودگی خوراک دام به کپک‌ها و قارچ ها، بهترین روش برای جلوگیری از آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به آفلاتوکسین‌ها است که نقش مهمی را در بهبود سلامت جامعه ایفاء می‌نماید.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین، آسپرژیلوس، خوراک، شیر، گاوداری سنتی، استان چهارمحال و بختیاری.

---

۱ . گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد،شهرکرد،ایران.
*نویسنده مسئول: yas.rahimiyan.yr@gmail.com

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها گروهی از سموم قارچی و از متابولیت های ثانویه گونه هایی از کپک ها مانند آسپرژیلوس هستند که به آسانی در طی رشد و انبارداری خوراک دام و طیور ایجاد می شوند (آدامز و همکاران،۱۹۹۳). در علوفه ها و غلاتی مانند ذرت، جو، گندم و برنج، دانه‌های روغنی مانند سویا، بادام زمینی، پنبه و آفتابگردان کپک ها به آسانی در حین داشت، برداشت، فرآوری، حمل و انبارداری رشد کرده و منجر به تولید افلاتوکسین می شوند (نظری و همکاران،۱۳۸۶). امروزه حدود بیست نوع متفاوت از انواع متابولیت‌های آفلاتوکسین شناسایی شده است و از میان آنها M_2, M_1, B_2, B_1 مهمترین ها می‌باشند (نظری و همکاران،۲۰۰۷). اگرچه به طور طبیعی غلظت آفلاتوکسین B_1 بیشتر بوده و مصرف آن توسط دام و طیور موجب افزایش نیاز پروتئینی در آن‌ها می‌گردد ولی آفلاتوکسین M_1 از متابولیت نوع B_1خطرناکتر بوده و ایجاد سمیت بیشتری می کند(رنجبر و همکاران،۱۳۸۹). آفلاتوکسیکوزیس(مسمومیت با آفلاتوکسین)، نوعی بیماری است که با مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین ایجاد می شود و یکی از مهمترین مسمومیت‌های ناشی از مایکوتوکسین ها به شمار می‌رود که توسط قارچ های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند و می‌تواند خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت دامپروری وارد نماید و در مزارع پرورش گاو شیری مسمومیت مزمن با آفلاتوکسین ها باعث تضعیف سیستم ایمنی و ایجاد مشکلاتی در متابولیسم پروتئین‌ها ، ویتامین‌ها و مواد معدنی در بدن آن‌ها و به تبع آن کاهش شدید تولید شیر می‌شود(نوروزی و همکاران،۱۳۹۳). گاوهای شیری که به صورت صنعتی و سنتی پرورش داده می‌شوند دائما در معرض مسمومیت و اثرات منفی ناشی از مصرف خوراک‌های آلوده به آفلاتوکسین‌ها هستند و این سموم در طی یک زنجیره از طریق شیر و گوشت به بدن انسان منتقل می‌شود و ازآن-جایی‌که آفلاتوکسین‌ها در انسان نیز اثرات زیان باری از قبیل ایجاد سرطان، مشکلات تولیدمثلی و غیره ایجاد می-کنند، وجود این عوامل مضر در تغذیه انسان نیز با حساسیت ویژه‌ای روبرو است (قاسمی پناهی و همکاران،۱۳۹۳). وجود آفلاتوکسین در خوراک گاوهای شیری موجب افزایش استرس اکسیداتیو، کاهش سطح ایمنی و افزایش بروز ورم پستان و در نتیجه مرگ سلول‌های پستانی و افزایش سلول-های سوماتیک شیر می‌شود(آدام و همکاران ۱۹۹۳). از مهم ترین قارچ های آلوده کننده اقلام خوراکی که سبب مسمومیت غذایی در حیوانات می‌گردند می‌توان به آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس اشاره نمود که با مصرف خوراک دام آلوده توسط حیوان، شیر نیز آلوده می‌شود (قانعیان و همکاران،۱۳۹۴). بسیاری از محصولات کشاورزی که در تهیه خوراک دام استفاده می‌شوند، مستعد آسیب پذیری توسط گروهی از قارچ ها می‌باشند که قادرند متابولیت‌های سمی تولید کنند (ارسالی و همکاران، ۲۰۰۸). گزارش‌های متعددی در خصوص آلودگی کپکی خوراک حیوانات و وجود آفلاتوکسین در آن‌ها و نرخ تلفات بالا در دام و طیور مصرف کننده این خوراک‌ها گزارش شده است. مصرف خوراک دام آلوده به آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 توسط گاوهای شیری سبب هیدروکسیله شدن این سموم و تبدیل به آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 در بدن حیوان می-شود که در شیر نیز قابل ردیابی و مشاهده می‌باشند (تامسون و همکاران،۲۰۰۰) .انجمن غذا و دارو آمریکا یک حد کلی در حدود ۲۰ نانوگرم در گرم را برای آلودگی‌های آفلاتوکسینی در غذاهای مورد مصرف دامی و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم یا ۵۰ نانوگرم در لیتر آفلاتوکسین در شیر را به عنوان حد مجاز مصرف بیان کرده است، همچنین قابل ذکر است که کشورهای اروپایی سطح مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر، فرآورده‌های شیری و غذای کودکان را ۰/۰۰۰۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به عنوان استاندارد در نظر گرفته اند (کن و همکاران،۲۰۰۷). یافته‌های تحقیق قانعیان و همکاران(۱۳۹۴) نشان داد بین خوراک‌های دام مورد مطالعه به ترتیب تعداد کلنی‌های قارچی رشد کرده روی سیلاژ ذرت و مواد متراکم در هر گرم خوراک دام، بالاترین میانگین آلودگی را دارا بودند. در مطالعه نظری و همکاران(۱۳۸۶) در چهل و یک نمونه از مجموع ۸۶ نمونه آزمایش شده وجود آفلاتوکسین M_1 با غلظتی بین ۲/۸۶۸ تا ۱۷۶/۱۹۲ نانوگرم در لیتر تعیین شد و در۱۸/۶ درصد از نمونه های مثبت، سطح آلودگی به آفلاتوکسین M_1 بیش از حد مجاز استاندارد بود.

برای تشخیص و اندازه گیری آفلاتوکسین موجود در مواد خوراکی مختلف روش های متفاوتی مانند کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا و کروماتوگرافی گازی، اسپکترومتری جرمی وجود دارد و

روش الایزا به علت سرعت بالا بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (رحیمی و همکاران،۲۰۰۸). گزارش‌های زیادی در مورد مسمومیت، بیماری و مرگ در حیوانات و انسان در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به این آفلاتوکسین ها وجود دارد (آدام و همکاران، ۱۹۹۳و قاسمی پناهی و همکاران، ۱۳۹۳) . عوارض ناشی از آفلاتوکسین‌ها موجب شده است که برخی کشورها برای این سموم حدود قانونی و مجاز تعیین کنند. هدف از این پژوهش بررسی میزان انتقال آلودگی قارچی خوراک دام مصرفی و رابطه آن با غلظت آفلاتوکسین M_1 در شیر گاوداری‌های شیری سنتی در استان چهارمحال و بختیاری بود.

مواد و روش ها

تعداد دوازده گاوداری به طور تصادفی از بین دامداری‌های سنتی با دام بالای ۱۵ رأس در اطراف شهرستان شهرکرد واقع در استان چهارمحال و بختیاری انتخاب و نمونه برداری از ترکیبات خوراک دام‌های مورد استفاده در آن‌ها از بهار۱۳۹۹ لغایت بهار۱۴۰۰در چهار فصل بهار، تابستان، پائیز و زمستان و در هر فصل به تعداد چهار بار صورت گرفت. مقدار ۲۵۰ گرم از هریک از ترکیبات مورد استفاده در خوراک دام‌ها از مکان‌های مختلف انبار در کیسه‌های استریل برچسب دار کاغذی برداشت وتعداد ۱۹۲ نمونه به آزمایشگاه منتقل شد. علایم اختصاری برای هر نمونه تعیین و وجود یا عدم وجود هریک برای هر دامداری ارزش گذاری گردید و در ثبت داده ها و انجام آنالیز آماری استفاده شدند. به منظور بررسی اولیه وجود یا عدم وجود کپک در خوراک دام، از هر یک از خوراک‌های دام اسلایدهای میکروسکوپی نیمه دائمی به کمک بلولاکتوفنل تهیه و مورد مطالعه قرار گرفتند و در صورت وجود کپک در هر اسلاید برچسب دار، کپک ها با استفاده از منابع قابل دسترس و کلید های شناسایی، شناسایی و از آن‌ها عکس تهیه شد. سپس به منظور ایجاد محیط کشت، با ریختن مقدار معینی از هر یک از مواد نمونه برداری شده در پلیت‌های استریل برچسب دار و افزودن مقدار معینی آب مقطر به هر یک از پلیت ها درب آن‌ها را بسته و در انکوباتور۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته قرار داده شدند و پس از آن محتویات هر پلیت بررسی و از هر کدام اسلایدهای میکروسکوپی در محلول بلولاکتوفنل تهیه و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. هر یک از کپک های شناسایی شده درون پلیت ها جداسازی و در پلیت‌های استریل حاوی محیط سابورو دکستروآگار کشت و در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و جهت اطمینان از خلوص نمونه‌ها از روش کشت بر روی لام نیز استفاده شد. به منظور بررسی تعیین غلظت آفلاتوکسینM_1 نمونه برداری از شیر دامداری‌ها بر اساس روش استاندارد معرفی شده توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران با شماره ۷۱۳۳ انجام شد. سپس چربی شیر پس از سانتریفوژ کردن جدا و از شیر بدون چربی برای آزمایش استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد (۰/۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ قسمت در تریلیون) و نمونه های شیر آماده سازی شده را به کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتری به حفره های میکروپلیت اضافه و سپس به مدت یک ساعت به دور از نور و در درجه حرارت۲۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس مایع موجود در میکروپلیت خارج و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن به صورت وارونه بر روی کاغذهای جاذب رطوبت، مایع موجود در حفره ها به طور کامل تخلیه شد. سپس همه حفره ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شدند. هر بار بعد از تخلیهٔ مایع شستشو، میکروپلیت به طور واژگون بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار گرفت تا کاملاً باقیمانده آب شستشو خارج شود. به این ترتیب موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده اند، خارج شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول آفلاتوکسین کونژوگه شده با آنزیم و استفاده از کیت تشخیصی به حفره ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در انکوباتور با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن مایع به دست آمده و موجود در حفره ها به طور کامل تخلیه و همه آن‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص دو بار شسته و با دستمال کاغذی استریل خشک شدند. پس از آن میزان ۵۰ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر کروموژن به هر حفره اضافه شد و پس از مخلوط کردن ، میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با محیط تاریک نگهداری شد. نهایتا در نبود آفلاتوکسین M_1 در نمونه (منفی بودن نمونه) واکنش رنگی با رنگ آبی مشخص گردید و شدت رنگ با مقدار آفلاتوکسین موجود در نمونه ها رابطه غیرمستقیم داشت. بدین صورت که با افزایش مقدار سم در حفره‌ها از شدت رنگ کاسته می‌شد و حفره های بی رنگ معرف وجود متابولیت‌های آفلاتوکسین بودند. در ادامه برای توقف واکنش، محلول قطع واکنش به

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره ها افزوده گردید و رنگ آبی موجود نیز به رنگ زرد تغییر یافت. نهایتا نمونه ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید و اطلاعات مربوط به میزان جذب نوری هر حفره به تفکیک ثبت شد و با کسر میزان جذب نمونه ها و استاندارد ها بر میزان جذب استاندارد صفر، ضرب در ۱۰۰، درصد جذب محاسبه شد. سپس بر اساس درصد جذب نمونه های استاندارد و میزان آفلاتوکسین M_1 موجود در نمونه های استاندارد، منحنی کالیبراسیون رسم شد. به دنبال آن بر اساس درصد جذب هر نمونه شیر و انطباق با منحنی کالیبراسیون میزان آفلاتوکسین M_1 هر نمونه به دست آمد و برای نمونه های شیر که غلظت آفلاتوکسین M_1 آن ها به حدی اندک بود که امکان خطا در روش الایزا وجود داشت، شاخص آلودگی ۲/۵ نانوگرم در لیتر یا ۱/۲ حداقل غلظت قابل شناسایی در نظر گرفته شد. کلیه داده های آماری حاصل از مطالعات خوراک دام و غلظت و موجودیت آفلاتوکسین پس از ثبت، مرتب سازی و کد گذاری با استفاده از نرم افزارهای Microsoft Excel ۲۰۱۰ ثبت شده و توسط نرم افزار SPSS آنالیز آماری شدند. همچنین برای یافتن ضریب همبستگی بین خوراک های دام و داده های حاصل از آزمایشات بر روی میزان آفلاتوکسین در فصول مختلف سال، داده ها پس از ثبت و مرتب سازی به روش های اسپیرمن، کندال و پیرسون مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

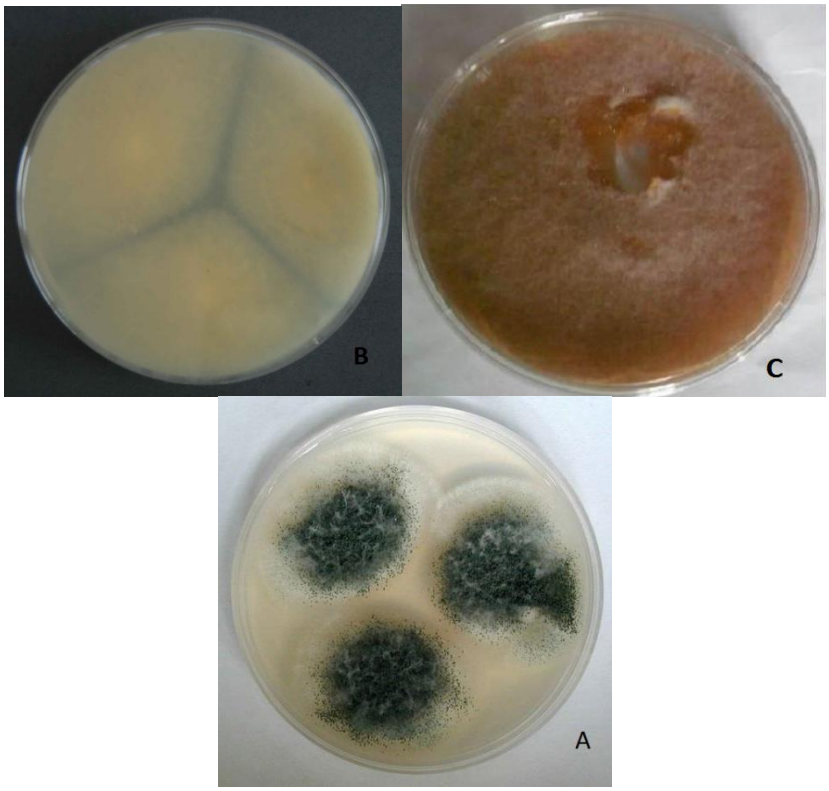
نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در جدول شماره ۱ نشان داد تعداد ترکیبات متشکله خوراک دام گاو داری های تحت مطالعه از ۶ تا ۲۲ اقلام غذایی و عمدتا شامل ذرت، کنجاله پنبه دانه و کلزا، مکمل های غذایی، جو، سبوس گندم، نان خشک، پودر چربی و یونجه بودند و بیشترین آلودگی موارد و اقلام خوراکی به طور کلی مربوط به وجود کپک فلاووس،کلاوانتوس و ریزوپوس استولونیفر در آن‌ها می باشد (شکل ۱).

جدول ۱. نتایج آنالیز و مطالعه بر روی تعداد اجزای تکیل دهنده خوراک دام و میزان آفلاتوکسینM_1 ترکیبات در گاوداری‌های تحت مطالعه

شماره گاوداری	تعداد ترکیبات موجود در خوراک	*Aspergilus favus*	*Aspergilus slavatus*	*Rhizopus stolonifer*	*Saccharomyces servisea*	Aflatoxin M ± SE ngr.l
۱	۲۲	+	+	+	–	۱/۲۶±۶/۲۵
۲	۲۱	+	+	+	–	۱/۱۴±۶/۰۵
۳	۲۰	+	+	+	+	۲/۴۲±۲۴/۱۶
۴	۱۹	+	+	+	–	۱/۳۹±۵/۴۶
۵	۱۸	+	+	+	+	۲/۲۵±۲۸/۱۱
۶	۱۶	+	+	+	-	۱/۵۱±۱۰/۳۲
۷	۱۴	+	+	+	–	۳/۳۷±۷/۱۱
۸	۱۱	+	+	+	–	۲/۴۹±۹/۲۴
۹	۹	+	+	+	+	۳/۵۶±۲۳/۴۲
۱۰	۸	+	+	+	-	۱/۴۱±۶/۲۶
۱۱	۷	+	+	+	+	۱/۲۰±۱۶/۱۱
۱۲	۶	+	+	+	-	۲/۲۷±۶/۲۹

+ : وجود ، – : عدم وجود. خطای استاندارد میانگین ها =SE، نانو گرم بر لیتر=ngr.l

بر اساس نتایج به دست آمده از جدول شماره (۱) دامداری شماره ۳،۵، ۹ و۱۱ به ترتیب دارای بیشترین میزان مقادیر آفلاتوکسین و دامداری شماره ۵ کمترین میزان آفلاتوکسین در خوراک مصرفی بود.



شکل ۱- اشکال کپک های آسپرژیلوس فلاووس(A)،کلاوانتوس(B) و ریزوفوس استولونیفر(C)

نتایج این مطالعه در خصوص وجود آفلاتوکسین سالانه در شیرهای مورد آزمایش در گاوداری های مورد مطالعه در جدول شماره ۲ نشان دهنده وجود آفلاتوکسینM_1 در همه آن نمونه ها بود. با توجه به نتایج به دست آمده دامداری های ۵ و ۹ و ۳ به ترتیب بیشترین مقدار آفلاتوکسین را در فصول پاییز و زمستان نشان دادند، در حالی که دامداری ۹ بیشترین مقدار آفلاتوکسین را در فصل تابستان دارا بود.

جدول ۲- مقایسه تراکم آفلاتوکسین M_1 با توجه به فصل در نمونه های شیر استحصال شده از گاوداری تحت مطالعه

نمونه	تجمع میزان آفلاتکوسین M_1 (نانوگرم بر لیتر)			
شماره گاوداری	زمستان	پاییز	تابستان	بهار
۱	۷/۶۹	۷/۵۴	۵/۲۵	۵/۳۶
۲	۶/۱۱	۵/۳۶	۴/۶۵	۴/۹۹
۳	۲۵/۲۶	۲۳/۶۵	۲۱/۱۶	۲۲/۱۲
۴	۵/۲۹	۴/۴۵	۴/۱۱	۴/۳۶
۵	۲۵/۴۱	۲۴/۳۹	۲۴/۰۵	۲۴/۲۹
۶	۹/۱۶	۸/۷۹	۷/۶۵	۸/۴۶
۷	۷/۳۱	۷/۲۳	۵/۵۹	۶/۳۶
۸	۸/۳۴	۸/۱۱	۷/۴۵	۷/۶۹

۹	۲۲/۱۶	۲۱/۲۶	۲۴/۶۹	۲۰/۲۸
۱۰	۵/۷۵	۵/۳۶	۴/۳۹	۵/۵۵
۱۱	۱۴/۸۲	۱۴/۲۸	۱۲/۱۶	۱۳/۷۸
۱۲	۶/۳۸	۶/۱۶	۴/۲۸	۵/۴۴

همچنین نتایج آنالیز آماری داده های سالیانه خوراک دام و آفلاتوکسین به روش پیرسون وجود ضریب همبستگی قوی بین کنجاله کلزا و کنجاله سویا با وجود کپک‌های قارچ آسپرژیلوس در خوراک دام و آلودگی شیر به آفلاتوکسین M_1را تأیید نمود. بررسی بر روی خوراک دام های نمونه برداری شده از خوراک دام مورد استفاده در ده دامداری صنعتی در استان چهارمحال و بختیاری نشان داد که ترکیب خوراک دام مورد استفاده در دامداری‌های مورد مطالعه متشکل از علوفه خسیل و یونجه، ذرت، جو، کنجاله کلزا، و پنبه دانه، سبوس گندم، نان خشک، پودر ماهی و مکمل های چربی، مکمل‌های غذایی خوراک دام، مخلوط آنتی بیوتیک، چغندرخشک، کاه و آرد جو، گندم و ملاس بودند. مطالعات میکروسکوپی ترکیبات خوراک دام نشان داد که با توجه به آن که این مواد از نظر دارا بودن فاکتورهای لازم جهت رشد قارچ ها مانند اسیدیته، کربوهیدرات ها، چربی، املاح، نمک مناسب هستند،گونه های کپک های آسپرژیلوس فلاووس، کلاوانتوس، نوتاتوم و ریزوفوس استولونیفر توانایی روی این مواد رشد را دارا هستند و این ترکیبات غذایی مورد استفاده در خوراک دام را آلوده ساخته اند. در این مطالعه گونه های کپک های آسپرژیلوس فلاووس،کلاوانتوس و ریزوفوس استولونیفر به طور مشترک در خوراک همه دامداری‌های مورد مطالعه بر روی خوراک‌های دام یافت شده و سایر گونه های قارچ فقط در برخی از دامداری‌ها و در بعضی از فصول مشاهده گردیدند. نتایج این بررسی بر روی ترکیبات شیرهای تحت مطالعه نشان داد که شیر دامداری ۵ بیشترین مقدار و شیر دامداری شماره ۱ با کمترین مقدار آفلاتوکسین را نشان می‌دادند. همچنین مقایسه آماری غلظت آفلاتوکسین فصلی در نمونه شیر دامداری های مورد مطالعه نشان داد که شیر دامداری ۵ در فصول پاییز و زمستان دارای بیشترین مقدار آفلاتوکسین است. بررسی محتویات خوراک دام، نسبت آن-ها و مطالعات قارچشناسی در این فصول نشان داد که این دامداری ها از نان خشک آلوده به کپک های آسپرژیلوس استفاده می کنند و لیکن دو دامداری ۱، ۲، ۱۰ و ۱۲ حداقل مقدار آفلاتوکسین را در کلیه فصول نسبت به سایر دامداری ها نشان دادند. بررسی محتویات و نسبت خوراک دام در این دو دامداری در کلیه فصول نشان داد که هر دو آنها از یک روش تغذیه ای استاندارد در کلیه فصول سال پیروی می‌کنند که سبب کاهش مقدار آفلاتوکسین در شیر تولیدی آن ها گردیده است.

جدول ۳. نتایج ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسینM_1 در فصل بهار با استفاده از روش پیرسون

ضرایب همبستگی (فصل بهار)		
اوره	کنجاله کلزا	آفلاتوکسین
**۰/۸۶۹	**۰/۸۹۱	-----
**۰/۹۲۸	-----	**۰/۸۹۱
-----	**۰/۹۲۸	**۰/۸۶۹

**: $p\leq 0.01$

جدول ۴. نتایج ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسینM_1 در فصل تابستان با استفاده از روش پیرسون

ضرایب همبستگی (فصل تابستان)		
جوش شیرین	مخمر محرک رشد	آفلاتوکسین
**۰/۸۴۲	**۰/۸۴۰	----
**۰/۹۴۵	----	**۰/۸۴۰

----	**۰/۸۴۲	**۰/۹۴۵

**: $p \leq 0.01$

جدول ۵. نتایج ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسین M_1 در فصل پاییز با استفاده از روش پیرسون

ضرایب همبستگی (فصل پاییز)			
مخمر ساکارو مایسیس	کنجاله سویا	کلسیم فسفات	آفلاتوکسین
**۰/۹۲۶	**۰/۹۱۴	**۰/۹۱۲	----
----	**۰/۹۸۹	-----	**۰/۹۱۱
----	----	**۰/۹۸۶	**۰/۸۲۶
----	----	----	**۰/۹۲۸

**: $p \leq 0.01$

جدول ۶. نتایج ضریب همبستگی بین داده های خوراک دام و آفلاتوکسین M_1 در فصل زمستان با استفاده از روش پیرسون

ضرایب همبستگی (فصل زمستان)			
سایر افزودنی ها	کنجاله سویا	کنجاله سویا	آفلاتوکسین
**۰/۹۰۶	**۰/۹۱۱	**۰/۹۲۱	----
----	----	----	**۰/۹۲۵
----	----	**۰/۹۹۷	**۰/۸۲۶
----	----	----	**۰/۹۰۸

**: $p \leq 0.01$

به علاوه نتایج مطالعات نشان داد بین میزان کنجاله سویا، فسفات کلسیم و مخمر ساکارومایسیس سرویسیه با مقدار آفلاتوکسین M_1 در فصل پاییز ضریب همبستگی قوی وجود دارد و مکمل های غذایی، سویا و مخمر ساکارومایسیس سرویسیه نیز وجود ضریب همبستگی قوی را با آفلاتوکسین M_1 در فصل زمستان را نشان داد. به طور کلی این نتایج نشان داد که وجود مخمر در ترکیب خوراک دام سبب افزایش اسیدیته و فراهم نمودن شرایط مساعد برای رشد بیشتر کپک ها و در نتیجه تولید آفلاتوکسین M_1می گردد.

نتیجه گیری و بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در فصل بهار و تابستان مقدار کپک های آسپرژیلوس محدود و مقدار آفلاتوکسین M_1پایین آمد و میزان آلودگی شیر در فصول پاییز و زمستان بیشتر از سایر فصول بود که این امر می تواند به علت عدم در دسترس بودن علوفه تازه و همچنین استفاده از علوفه انبارشده و عدم رعایت شرایط نگهداری مناسب در انبارها باشد، همچنین با توجه به آن که متاسفانه در برخی دامداری های صنعتی از رژیم غذایی متعادل و استاندارد استفاده نمی شود، احتمال وجود آفلاتوکسین در این چنین دامداری‌های بیشتر می‌باشد که سبب عدم تغییر چندان آفلاتوکسین درطول سال می‌گردد.

جدول شماره (۱) دامداری شماره ۵،۳، ۹ و۱۱ به ترتیب دارای بیشترین میزان مقادیر آفلاتوکسین و دامداری شماره ۵ کمترین میزان آفلاتوکسین در خوراک مصرفی بود. در مطالعات آقابابیان و همکاران(۱۳۹۱) نتایج حاصل از آنالیز تعداد ۵۰ نمونه خوراک دام از دامداریهای سنتی و صنعتی اصفهان در تابستان۱۳۹۰ نشان داد که ۱۰ مورد از نمونه ها (۲۰ ٪) آلوده به سم آفلاتوکسین بودند که ۳ مورد از نمونه های آلوده، (۳۰ ٪) بیش از حد مجاز آلودگی داشتند. در تحقیق مروی و همکاران(۱۳۹۷) بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه‌های قارچی آسپرژیلوس تولیدکننده‌ی آفلاتوکسین گونه‌های قارچی جنس آسپرژیلوس مولد سم با تکثیر مولکولی ژن بتا–توبولین با روش PCR و تعیین توالی آن، تعیین هویت شدند. از بین آسپرژیلوس های جدا شده، تعداد ۴ گونهٔ فلاووس، ۲ گونهٔ ورسیکالر، ۲ گونهٔ

فومیگاتوس، ۲ گونهٔ نایجر، ۱ گونهٔ پارازیتیکوس، ۱ گونهٔ اوخراسئوس و ۱ گونهٔ ترئوس شناسایی شد. نتایج مطالعات نامبردگان نشان داد به طور متوسط، ۲۷/۲۵ درصد خوراک دام و ۳۱/۷۰ درصد خوراک طیور آلوده به قارچ آسپرژیلوس بودند.

ترکیبات شیرهای تحت مطالعه نشان داد که شیر دامداری ۵ بیشترین مقدار و شیر دامداری شماره ۱ با کمترین مقدار آفلاتوکسین را نشان می‌دادند. همچنین مقایسه آماری غلظت آفلاتوکسین فصلی در نمونه شیر دامداری های مورد مطالعه نشان داد که شیر دامداری ۵ در فصول پاییز و زمستان دارای بیشترین مقدار آفلاتوکسین است. بررسی محتویات خوراک دام، نسبت آن‌ها و مطالعات قارچ‌شناسی در این فصول نشان داد که این دامداری ها از نان خشک آلوده به کپک های آسپرژیلوس استفاده می کنند و لیکن دو دامداری ۱، ۲ ،۱۰ و ۱۲ حداقل مقدار آفلاتوکسین را در کلیه فصول نسبت به سایر دامداری ها نشان دادند. بررسی محتویات و نسبت خوراک دام در این دو دامداری در کلیه فصول نشان داد که هر دو آنها از یک روش تغذیه ای استاندارد در کلیه فصول سال پیروی می‌کنند که سبب کاهش مقدار آفلاتوکسین در شیر تولیدی آن ها گردیده است. نتایج مطالعه رنجبر و همکاران(۱۳۸۹) نشان داد بیشترین مواد تشکیل دهنده خوراک دام شامل ذرت، کنجاله پنبه دانه و کلزا، مکمل های غذایی، جو، سبوس گندم، نان خشک، پودر چربی و یونجه می باشند. بیشترین عامل آلودگی وجود کپک فلاووس،کلاوانتوس و ریزوپوس استولونیفر بودند و نتایج مطالعه سالانه آفلاتوکسین در شیر دامداری‌ها وجود آفلاتوکسین M_1 را در همه آن‌ها نشان داد. در مطالعه مروی و همکاران، ۱۳۹۷، مطابق نتایج آنالیز آماری این بررسی، داده‌های سالیانه خوراک دام و آفلاتوکسین وجود ضریب همبستگی قوی بین کنجاله کلزا و سویا با کپک‌های آسپرژیلوس در خوراک دام و آلودگی شیر به آفلاتوکسین را تایید نمود. نتایج مطالعه نوروزی و کاظمی(۱۳۹۳) نشان داد تمام نمونه های خام و پاستوریزه نمونه گیری شده از گاوداری های استان خوزستان در زمستان آلوده بودند و میانگین میزان سم در شیر خام و پاستوریزه در تابستان نسبت به زمستان کاهش معناداری را نشان داد و میزان آفلاتوکسین M_1یک نمونه شیر پاستوریزه در زمستان بیش از حد مجاز بود. نتایج به دست آمده از مطالعات ارسالی و همکاران(۱۳۸۸) نشان داد که در ۴۳/۳۶ درصد از نمونه های خوراک دام میزان آلودگی از حد مجاز آفلاتوکسین B_1 که برابر بیست قسمت در بیلیون می باشد بالاتر بود و در ۳۸/۰۳ درصد از نمونه های شیر خام و ۱۴/۴۲ درصد از نمونه های شیر پاستوریزه میزان آلودگی از حد مجاز تعیین شده نیم قسمت در بیلیون بالاتر بود. در تحقیق حاضر رابطه قوی بین ضرایب همبستگی برخی از اقلام و ترکیبات خوراک دام و میزان آفلاتوکسین بین کنجاله کلزا و اوره در فصل بهار و بین جوش شیرین با میزان آفلاتوکسین در فصل تابستان در نمونه‌های تحت مطالعه مشاهده گردید.

به دلیل انبارداری نامناسب، عدم دسترسی به علوفه تازه بـه اندازه کافی، شرایط بد بازیافت و عدم نگه داری صحیح نان های خشک در هر زمانی ایجاد آلودگی می کند. از آنجا کـه منبع اصلی تأمین کننده شیر، دامداری های سنتی و صنعتی هستند، آلـودگی خـوراک دام بـه آسـپرژیلوس سـبب تولیـد آفلاتوکسین در شیرهای استحصال شده هم می گـردد، لـذا می توان اظهار داشت کـه کنتـرل آلـودگی خـوراک دام بـه کپک ها، بهترین روش بـرای جلـوگیری از آلـودگی شـیر و فرآورده های آن به آفلاتوکسینM_1 است، که در پیشـرفت و بهبود سلامت جامعه موثر می باشد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 14(2022-23)111-120

Evaluation of the fungal flora of animal feed and aflatoxin M_1 Concentration in the milk of traditional cattle farms of Chaharmahal and Bakhtiari province

Rahimian, Y.

Received:20.07.2022 Accepted: 19.12.2022

Abstract:

In this study, the purpose of the study was to investigate the fungal flora of animal feed and the Concentration of aflatoxin M_1 in the milk produced by traditional cattle ranches in Shahre-kord city, Chaharmahal and Bakhtiari province. For this purpose, since spring 2019 to spring 2020 (During one year), samples of animal feed consumed annually by twelve traditional dairy farms with the number of animals above 15 heads, located in different parts of Shahre-Kord city, the capital of Chaharmahal and Bakhtiari province, were randomly sampled. Isolation, cultivation and detection of fungi in the feed as well as the amount of aflatoxin in the produced milk in order to investigate the relationship between the composition of animal feed, mold and aflatoxin M_1 in cow's milk was measured and measured using the ELISA method. The results of this study showed that the ingredients of animal feed include corn, cottonseed meal and rapeseed meal, nutritional supplements, barley, wheat bran, dry bread, fat powder and alfalfa containing contamination factors and molds of *Aspergillus flavus*, *Clavanthos* and *Rhizophos stolonifer*. In addition, the results of this study showed the presence of aflatoxin M_1 in the milk of all farms under study during the test period. The results of statistical analysis on animal feed and aflatoxin data confirmed the existence of a strong correlation coefficient between rapeseed and soybean meal with Aspergillus molds in animal feed and milk contamination with aflatoxin. In general, according to the results of this research, it seems that controlling the contamination of animal feed with mold and fungi is the best method to prevent the contamination of milk and its products with aflatoxins, which plays an important role in improving the health of society.

Key words: Aflatoxin M1, Aspergillus, Feed, Milk, Dairy farms, Chaharmahal and Bakhtiari province.

---

1. Department of Animal Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: yas.rahimiyan.yr@gmail.com

منابع

ارسالی عبدالعظیم، بهاالدین بیگی فائقه، قاسمی رضا.۱۳۸۸. انتقال آفلاتوکسین از خوراک دام به شیر دام و شیر پاستوریزه در شهر شیراز و حومه. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد.**۱۷،۳(٦٦)** ۱۸۳-۱۷۵.

رنجبر، سمیرا، نوری، میترا، نظری، راضیه.۱۳۸۹. بررسی آفلاتوکسین شیر و رابطه آن با فلور قارچی خوراک دام مصرفی در استان مرکزی. نشریه سلول و بافت. **۱(۱)**:۹-۱۸.

قاسمی پناهی، بابک، ارفعی آخوله، اکبر. مقدم, غلامعلی، لطفی. ایرج، ارجمند، حسن. ۱۳۹۶.مسمومیت با آفلاتوکسین در یکی از گاوداری های صنعتی استان آذربایجان شرقی. مجله دامپزشکی ایران.**۱۳(۱)**:۱۰۹-۱۱۷.

قانعیان، محمد تقی، جعفری، عباسعلی، جمشیدی، سارا، احرامپوش، محمد حسن، مومنی، حبیبه، جمشیدی، امید،قوه، محمد علی.۱۳۹۴. برسی میزان و نوع آلودگی قارچی خوراک دام درگاوداری های شیری شهر یزد. پژوهشهای علوم دامی ایران.**۷ (٤):** ۴۲۲-۴۲۷.

نظری، افشین، نوروزی حسین، موحدی محمد، خاکساریان مجتبی.۱۳۸۶. میزان سم آفلاتوکسینM_1 در شیرهای گاو محلی و پاستوریزه شهرستان خرم آباد به روش HPLC. مجله علمی پژوهشی یافته. **۹ (۳)** :۴۹-۵۷.

نوروزی،حسین، کاظمی، علی.۱۳۹۳.بررسی میزان آفلاتوکسینM_1 در شیرهای تازه خام و پاستوریزه گاو در استان خوزستان. مجله علمی پزشکی جندی شاپور.**(۳)**: ۳۲۷-۳۳۳.

مروی.علی، طبیبی. مریم، یزدان ستاد. سجاد، نادری. محمد علی، خالدی. منصور، پورشهبازی. غلامرضا و محمودی کوهی،احمد.۱۳۹۷. بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه‌های قارچی آسپرژیلوس تولیدکننده‌ی آفلاتوکسین، تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک. **۳۱(۳)** :۳۶-۴۳.

Adams RS, Kenneth BK, Virginia AI, Lawrence JH, Gregory WR. 1993.Mold and mycotoxin problems in Livestock feeding. College of Agricultural Science. Penn State University Das. p: 125.

Berghofer, L. K., A. D. Hocking., D. Miskelly., and E. Jansson. 2003. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology, **85 (1)**: 137-149.

Ersali, A., R. Ghasemi., and F. B. A. Baigi. 2008. Transmission of aflatoxins from Animal Feeds to Raw and Pasteurized Milk in Shiraz City and its Suburbs. Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, **17 (3)**: 175-183.

Jamali Emam Ghedis, N., and M. M. Moeini. 2010. Aflatoxin contamination occurrence in milk and feed in Kermanshah dairy farms by ElISA technique. Veterinary Journal ,Pajouhesh and Sazandegi, **87**: 25-31.

Kan, C., and G. Meijer. 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. Animal feed science and technology, **133 (1)**: 84-108.

Rahimi, E., A. R. Kargar., and F. Zamani. 2008. Assessment of aflatoxin B levels in animal feed of dairy farms in Chaharmahal and Bakhtiari. Pajouhesh and Sazandegi,**79**: 66-71.

Nazari, a., h. Noroozi., m. Movahedi., and m. Khaksarian. 2007. Measurement of Aflatoxin M1 in Raw and Pasteurized. Yafteh, 9(3): 49-57.

Thompson, C., and S. E. Henke. 2000. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. Journal of Wildlife Diseases, **36 (1)**: 172-179.