

## بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین در خوراک مصرفی و شیر تولیدی و شناسایی مولکولی سویه قارچی آن در برخی از گاوداری‌های استان آذربایجان شرقی

مهری منتظر هرزند<sup>۱</sup>، حمید پایا<sup>۲\*</sup>، اکبر تقی‌زاده<sup>۲</sup> و علی حسینخانی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۸

<sup>۱</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

<sup>۲</sup> به ترتیب استادیار، استاد و دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

\* مسئول مکاتبه: Email: hamid.paya@tabrizu.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** آفلاتوکسین‌ها گروهی از میکوتوکسین‌های تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه سمی هستند که باعث آلودگی خوراک می‌شوند. هدف: پژوهش حاضر به منظور شناسایی میزان آلودگی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> شیر، آفلاتوکسین B<sub>1</sub> خوراک و متعاقباً جداسازی و شناسایی مولکولی گونه قارچی آسپرژیلوس فلاوس طراحی گردید. روش کار: بدین منظور از ۱۰ گاوداری سطح استان آذربایجان شرقی به طور تصادفی نمونه‌های خوراک و شیر در ماه‌های اسفند و فرودین جمع آوری گردید و متعاقباً تعیین میزان آفلاتوکسین‌ها، به روش الایزا انجام گرفت. همچنین جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاوس نمونه‌هایی با حداکثر آلودگی (۲ نمونه) و سویه‌های خالص آسپرژیلوس فلاوس با استفاده از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار، پرایمر اختصاصی و واکنش PCR انجام پذیرفت. یافته‌های به دست آمده از آنالیز آفلاتوکسین M<sub>1</sub> و B<sub>1</sub> توسط آزمون آماری T و با نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اعداد به دست آمده با اعداد استاندارد جهانی و ملی مقایسه شد. نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که تمامی نمونه‌های شیر و خوراک آلوده به آفلاتوکسین بودند ولی میزان آلودگی نمونه‌های شیر کمتر از مقادیر مجاز استاندارد ایران، آمریکا و اتحادیه اروپا (به ترتیب ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۰۵ میکروگرم در کیلوگرم) بود و از بین ۱۰ نمونه تنها دو نمونه خوراکی میزان آلودگی آفلاتوکسین B<sub>1</sub> بالاتر از حد مجاز استانداردهای ایران و اتحادیه اروپا (۵ میکروگرم در کیلوگرم) بود. محدوده آلودگی نمونه‌های شیر و خوراک به ترتیب در دامنه‌های ۰/۰۲۱ الی ۰/۰۵ و ۱/۱ الی ۶/۹ میکروگرم در کیلوگرم مشاهده شد. از لحاظ آماری نیز آلودگی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> و B<sub>1</sub> سطح منطقه از استانداردهای ملی و بین المللی پایینتر بود. تفاوت معنی‌داری بین میانگین وجود داشت و به طور معنی‌داری میانگین آلودگی‌ها پایین‌تر از این استانداردها بود (به ترتیب  $p < 0/001$  و  $p < 0/01$  برای شیر و خوراک). بر اساس نتایج به دست آمده در خصوص شناسایی گونه قارچی نیز با توجه به عدم تشکیل باند در محدوده ۱۳bp، می‌توان نتیجه گرفت که گونه غالب و عامل اصلی آلودگی خوراک‌های نمونه برداری شده، گونه فلاوس نبوده است. نتیجه گیری نهایی: تفاوت معنی‌داری بین میانگین آلودگی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> و B<sub>1</sub> سطح منطقه با استانداردهای ملی و بین المللی وجود داشت و میانگین آلودگی‌ها پایین‌تر از این استانداردهای مزبور بود.

**واژگان کلیدی:** آسپرژیلوس، آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، آفلاتوکسین M<sub>1</sub>، خوراک دام، شیر، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

## مقدمه

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از میکوتوکسین‌ها می‌باشند که از طریق مسیر پلی‌کتایدی توسط گونه‌های خاصی از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و به میزان محدودی نیز توسط *آسپرژیلوس نومیوس* تولید می‌شوند. این سموم از خطرناک‌ترین میکوتوکسین‌های مؤثر بر سلامتی انسان و دام شناخته شده‌اند (پلیدین و همکاران ۲۰۱۴). در میان ۴۰۰ نوع میکوتوکسین شناخته شده، آفلاتوکسین  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$  و  $G_2$  جزو مهم‌ترین میکوتوکسین‌های مواد غذایی و خوراکی می‌باشند (منافی و همکاران ۱۳۹۷ و کاستانزو و همکاران ۲۰۱۵). آفلاتوکسین  $M_1$  و  $M_2$  متابولیت هیدروکسیله آفلاتوکسین  $B_1$  و  $B_2$  می‌باشند که می‌توانند در شیر و یا سایر محصولات دامهایی که خوراک آلوده مصرف کرده‌اند، پیدا شوند (حسین و براسل ۲۰۰۱). یک رابطه مستقیم بین میزان آفلاتوکسین  $M_1$  و مصرف آفلاتوکسین  $B_1$  مواد غذایی وجود دارد. نرخ تبدیل آفلاتوکسین  $B_1$  به آفلاتوکسین  $M_1$  بسیار متغیر بوده و در حدود ۰/۳ درصد تا ۶/۲ درصد می‌باشد (کرپی ۲۰۰۲).

اثراتی نظیر سمیت حاد و مزمن، سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، جهش‌زایی، سمیت کبدی و تضعیف سیستم ایمنی را می‌توان به آفلاتوکسین‌ها نسبت داد (لویس ۲۰۰۵). از آنجایی که آفلاتوکسین‌ها بر سلامتی انسان‌ها تأثیرگذارند، لذا به تدریج مقرراتی برای آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی و خوراکی توسط چندین مؤسسه توسعه یافته است و حداکثر سطوح آفلاتوکسین  $B_1$ ،  $M_1$  و کل آفلاتوکسین‌ها (آفلاتوکسین  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$  و  $G_2$ )، پارامترهایی است که در حال حاضر برای محدود کردن آفلاتوکسین‌ها در بسیاری از مواد غذایی و خوراکی استفاده می‌شود (هرناندز-هیرو و همکاران ۲۰۰۸). تا کنون سم‌زدایی آفلاتوکسین‌ها از طریق حذف محصولات آلوده و یا از طریق غیرفعال‌سازی سموم موجود در این محصولات توسط روش‌های مکانیکی (تمیز کردن، مرتب‌سازی و بسته‌بندی)، فیزیکی (حرارت، تابش و جذب)،

شیمیایی (ترکیبات شیمیایی) و بیولوژیکی (باکتری‌ها و مخمرها و قارچ‌ها) انجام شده است (ولازهن و همکاران ۲۰۱۰). نظارت بر آفلاتوکسین‌های مواد غذایی و خوراکی در مقررات قانونی به طور مستقیم به روش‌های تحلیلی دقیق و قابل اعتماد جهت تشخیص آن‌ها بستگی دارد. برای این منظور از روش‌های مختلفی مانند روش‌های کروماتوگرافی TLC و HPLC همراه با آشکارسازهای مختلف و روش‌های ایمونولوژیکی مانند الایزا استفاده می‌شود (اکس آی و همکاران ۲۰۱۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به عنوان یک ابزار مهم برای تشخیص و مطالعه قارچ‌های فیتوپاتوژنیک شناخته شده است که به کاهش برخی از مشکلات مرتبط با شناسایی، کنترل و مهار پاتوژن‌های گیاهی کمک کرده است (مارتین و همکاران ۲۰۰۰). PCR یک فناوری حساس می‌باشد که در مقایسه با روش‌های سنتی تشخیص دارای مزایایی نظیر توانایی تشخیص یک مولکول هدف در یک ترکیب پیچیده بوده و روشی سریع و همه‌جانبه می‌باشد. بسته به طراحی پرایمرها، ممکن است انتخابات گسترده و وسیعی صورت پذیرد، بنابراین تشخیص یک پاتوژن در سطح گونه یا سویه را فراهم می‌سازد (چنا و همکاران ۲۰۰۴). به دلیل اهمیت این سموم و نقش آن در سلامتی انسان و دام، برآن شدیم تا میزان آفلاتوکسین  $M_1$  و  $B_1$  شیر و خوراک و نوع آلودگی قارچی خوراک را در برخی از گاوداری‌های آذربایجان شرقی مورد مطالعه قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها

## جمع‌آوری نمونه

در مطالعه حاضر، مراکز پرورش گاوشیری سنتی و صنعتی به طور تصادفی از بین مراکز اطراف شهر تبریز انتخاب و نمونه برداری از خوراک‌های دام و شیر تولیدی آنها در اسفند ماه سال ۹۵ و فروردین ماه سال ۹۶ انجام گردید. در این مطالعه از ۱۰ نمونه شیر (نمونه‌گیری از مخزن نگهداری شیر) و ۱۰ نمونه خوراک از جیره کاملاً مخلوط مصرفی دام‌ها جمع‌آوری و بلافاصله بعد از نمونه

$B_{max}$  (چاهک‌های  $A1$  و  $A2$ ) تقسیم شده و در عدد ۱۰۰ ضرب شد.

$$\text{درصد میزان جذب} = 100 \times \frac{\text{چگالی نوری استاندارد (یا نمونه)}}{\text{چگالی نوری استاندارد صفر } B_{max}}$$

مقادیر محاسبه شده برای استانداردها روی محور  $Y$  و غلظت آنالیت‌ها معادل پیکوگرم در میلی‌لیتر در محور  $X$  لگاریتمی ترسیم شد. غلظت آفاتوکسین  $M_1$  در نمونه‌های شیر به طور مستقیم از منحنی استاندارد خوانده شد.

### اندازه گیری آفاتوکسین $B_1$ خوراک

برای آماده‌سازی نمونه‌های خوراک نیز، ۵ گرم از نمونه همگن شده را در ظرف مناسبی ریخته و ۲۵ میلی‌لیتر از متانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه توسط شیکر مخلوط گردید. عصاره به دست آمده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد و توسط ۱ میلی‌لیتر آب مقطر یا دیونیزه رقیق گردید. برای اندازه گیری آفاتوکسین  $B_1$  موجود در نمونه‌ها از روش الایزای رقابتی استفاده شد. برای این کار کیت  $R$ -biopharm Ridascreen، آلمان به کار رفت و مراحل زیر مطابق دستورالعمل کیت انجام شد: به تعداد کافی چاهک کیت برای تمامی استانداردها و نمونه‌ها آماده کرده و موقعیت استانداردها و نمونه‌ها ثبت شد. ۵۰ میکرولیتر از نمونه آماده یا استاندارد، جداگانه در چاهک‌ها قرار گرفت. ۵۰ میکرولیتر کونژوگه و ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی به هر چاهک ریخته شد سپس توسط شیکر به آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. مایع موجود در چاهک‌ها تخلیه و داخل آن‌ها با ۲۵۰ میلی‌لیتر بافر شست و شو، شسته شد. چاهک‌ها دوباره تخلیه شده و این عمل دو بار تکرار شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای کروموژن به هر چاهک اضافه شد و سپس توسط شیکر به آرامی مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه گردید. سپس توسط شیکر مخلوط شده و پس از افزودن متوقف کننده به مدت ۱۵ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

برداری به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان انجام آزمایشات اندازه گیری میزان آلودگی آفاتوکسین در فریز  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد.

### اندازه گیری آفاتوکسین $M_1$ شیر

برای آماده‌سازی نمونه‌ها، نمونه‌های شیر پس از یخگشایی در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت  $g$  ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ لایه بالایی نمونه‌ها به طور کامل برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از شیر بدون چربی جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه گیری آفاتوکسین  $M_1$  موجود در نمونه‌ها از روش الایزای رقابتی استفاده شد و برای این کار از کیت  $Euro$  Proxima، هلند استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های شیر چربی‌زدایی شده در چاهک-های جداگانه قرار گرفت. به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از بلانک (چاهک‌های  $A1$ ،  $A2$ ) و ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردهای ۱ تا ۶ در چاهک‌های دوتایی ریخته شد. صفحه میکروتیتر چسب زده شده و به مدت چند ثانیه در شیکر قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه نیز در تاریکی در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  تا ۲۰ قرار گرفت. مایع موجود در حفرات تخلیه و داخل آن‌ها سه مرتبه با بافر شست و شو شد. ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه (آفاتوکسین  $M_1$ -HRP) به تمام چاهک‌ها (به جز چاهک‌های  $H1$  و  $H2$ ) ریخته شد. صفحه میکروتیتر به مدت چند ثانیه در شیکر قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مجدداً مایع موجود در حفرات تخلیه و داخل آن‌ها سه مرتبه با بافر شسته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به هر چاهک ریخته شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای اتمام واکنش ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

مقادیر چگالی نوری نمونه‌ها و ۶ استاندارد (میانگین مقادیر دو حفره‌ها) بر مقدار میانگین چگالی نوری بلانک/

### جداسازی قارچ

جهت شناسایی نوع گونه قارچی، از بین ۱۰ نمونه خوراکی، دو نمونه‌ایی که بالاترین میزان آلودگی به آفلاتوکسین B<sub>1</sub> را نشان داده بودند، انتخاب (نمونه شماره ۱ و ۹) و بر اساس روش کار احمد و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. از نمونه‌های خوراکی تازه جهت جداسازی قارچ‌ها استفاده شد و ابتدا ۲ گرم از نمونه خوراک آسیاب شده توزین و به یک فالکون حاوی ۱۸ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه توسط ورتکس به خوبی مخلوط شد. توسط آنس سوزنی مقداری از خوراک رقیق شده برداشته و در پلیت‌های حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA، ۳۹ گرم محیط کشت PDA در یک لیتر آب مقطر) در چند نقطه کشت گردید. پلیت‌ها به مدت ۷ روز و در دمای ۲۵ °C در انکوباتور قرار داده شد. سپس پلیت‌های کشت داده شده بررسی و از گونه غالب قارچی در داخل پلیت‌ها به پلیت‌های تازه حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار و عاری از آلودگی قبلی انتقال داده شد تا در نهایت پلیت‌هایی حاوی قارچ خالص شده از گونه غالب ابتدایی بدست آید.

### استخراج DNA

سویه‌های خالص اسپرژیلوس فلاوس متعلق به کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران PTTC با شماره ۵۰۰۴ تهیه شد. جهت استخراج DNA از محیط کشت پوتیتو دکستروز براث (PDB) استفاده گردید (۲۴ گرم PDB در یک لیتر آب مقطر). کلنی‌های قارچی رشد کرده در محیط کشت PDA را با آنس سوزنی به فالکون-های حاوی محیط کشت PDB انتقال داده و به مدت ۳ روز در دمای ۲۸ °C درون انکوباتور شیکردار کشت داده شد. جهت استخراج DNA سویه خالص نیز مستقیماً سویه را به محیط کشت مایع انتقال داده و مطابق روش ذکر شده کشت داده شد.

۲۰۰ میلی‌گرم توده مسیلیومی حاصل منجمد و توسط نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر یکنواختی تبدیل گردید. ۸۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (۰/۱ مولار Tris

HCl، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، ۲/۵ مولار NaCl، ۳/۵ درصد CTAB، ۱۵۰ میکرولیتر از ۲۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر پروتئیناز K) به محیط کشت پودر شده اضافه شده و توسط ورتکس به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید. میکروتیوپ‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C در بن ماری قرار داده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی جمع‌آوری شده و معادل حجم نمونه با فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) مخلوط گردید. نمونه-ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مجدداً مایع رویی جمع‌آوری شده و حجم مساوی با کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) مخلوط و تحت شرایط ذکر شده سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و معادل حجم نمونه‌ها، الکل ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۲۰ °C- انکوبه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دکانته شده و با ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شست و شو شد. DNA پودر شده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی‌مولار Tris HCl، ۱ میلی‌مولار EDTA) حل گردید. ۵ میکرولیتر RNase A (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به نمونه‌های DNA اضافه شده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. مایع به دست آمده به عنوان محلول DNA خالص تا زمان لازم برای مصرف در دمای ۲۰ °C- نگهداری گردید (گونیتا-میشرا و همکاران ۲۰۱۴).

### انتخاب پرایمرهای اختصاصی

در این بررسی، طراحی پرایمر بر اساس توالی ژن AFLA-F و AFLA-R برای اسپرژیلوس فلاوس، با استفاده از نرم افزار BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) با توالی-های مشابه در بانک ژن (GenBank) مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفت. شناسایی ایزوله مورد نظر در صورت وجود تشابه توالی بالا (۹۹-۱۰۰ درصد) با یک یا بیش از

و تهیه شد. آغازگرها توسط شرکت بیوتکنولوژی پیشگام به ماکروژن کره جنوبی سفارش داده شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

یک توالی قابل اطمینان از یک گونه شناخته شده در پایگاه داده‌های NCBI انجام گردید. پرایمر به طول ۲۴ جفت باز نوکلئوتیدی (برای ژن AFLA-F) و ۱۹ جفت باز انتخاب

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های AFLA

Table 1- Primer sequence used to reproduce amplified PCR size

Primer name	Primer sequence	Product size
AFLA-F	5'-GGT GGT GAA GAA GTC TAT CTA AGG-3'	413bp
AFLA-R	5'-AAG GCA TAA AGG GTG TGG AG-3'	

درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس از هر نمونه به مقدار ۱۰ میکرولیتر با ۲ میکرولیتر رنگ Dye مخلوط کرده و توسط سمپلر به داخل چاهک‌ها ریخته شد. اتصالات مولد به گونه ای به تانک وصل شد که همواره چاهک‌ها به سمت الکتروود منفی قرار داشتند. DNA چون دارای بار منفی است به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند و نمونه‌ها با ولتاژ ۷۰ ولت و شدت جریان ۶۵ میلی آمپر به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، عکس ژل توسط دستگاه ژل داک گرفته و ذخیره شد.

### نتایج و بحث

#### آفاتوکسین شیر

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای آفاتوکسین  $M_1$  بودند (جدول شماره ۲). کمترین و بیشترین میزان آلودگی به ترتیب ۰/۰۲۱ و ۰/۰۵ میکروگرم در کیلوگرم بود. میانگین و انحراف از معیار آلودگی به آفاتوکسین  $M_1$ ،  $0.083 \pm 0.03$  تعیین گردید. از لحاظ آماری نیز تفاوت معنی‌داری بین میانگین آلودگی آفاتوکسین  $M_1$  شیر سطح منطقه با استانداردهای ملی و بین المللی وجود داشت و به طور معنی‌داری میانگین آلودگی‌ها پایین‌تر از این استانداردها بود ( $p < 0.001$ ). مقایسه میزان آلودگی شیر تولیدی دام‌ها با استانداردهای

برای انجام PCR از کیت Tag2xMasterMixRed 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> استفاده شد. کیت مزبور حاوی ۱/۵ میلی مولار -MgCl<sub>2</sub> ۰/۴ میلی مولار dNTPs و ۰/۰۵ واحد در میکرولیتر Ampliqon Tag DNA Polymeras بود. واکنش PCR در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی لیتری انجام گرفت. حجم نهایی مخلوط واکنش در هر لوله ۳۰ میکرولیتر بود. از DNA استخراج شده ۴ میکرولیتر به هریک از تیوب‌ها اضافه گردید. سپس به هر نمونه ۱۶ میکرولیتر از مخلوط Master Mix2x اضافه شد. از هرکدام از پرایمرها حدود ۱ میکرولیتر به مخلوط اضافه شد. فزونی یون‌های منیزیم در واکنش می‌تواند منجر به ترکیب اتصالات غیر اختصاصی پرایمر الگو شود و نیز مقادیر کم آن می‌تواند منجر به کاهش بازده محصول مورد نظر شود. در نهایت به هر تیوب ۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه گردید. تیوب‌ها در سانتیفریوژ قرار داده و سپس به دستگاه PCR منتقل گردید که پروتکل استفاده شده دارای ۳۴ مرحله بود و بعد از اتمام تمام چرخه‌ها که حدود ۲/۵ ساعت طول کشید تیوب‌ها را به فریزر -۲۰ انتقال گردید.

برنامه حرارتی برای ۳۴ چرخه شامل دمای واسرشته شدن اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، دمای واسرشته ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۱ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲

انجام این قبیل مطالعات در تمامی کشورها از اهمیت زیادی برخوردار است.

ایران و بین الملل و سطح معنی‌داری آن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

محققین بیشتر کشورها جهت تعیین وضعیت آلودگی شیر و فرآورده‌های آن تحقیقات گسترده‌ای را انجام داده‌اند و

جدول ۲- مقایسه میزان آلودگی شیر تولیدی دام‌ها با استانداردهای ایران و بین الملل (میکروگرم در کیلوگرم)

Table 2- Comparison of cows milk contamination with Iranian and international standards ( $\mu\text{g} / \text{kg}$ )

Country	Limit of standard	P value	t value	Mean $\pm$ Std dev	DF
Iran	0.1	<0.0001	-26.25	0.03 $\pm$ 0.0083	9
America	0.5	<0.0001	-177.96	0.03 $\pm$ 0.0083	9
EU	0.05	<0.0001	-7.38	0.03 $\pm$ 0.0083	9

گیزاچیو و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند آفلاتوکسین  $M_1$  در تمام نمونه‌های شیر جمع آوری شده از دامداری-های آدیس آبابا (اتیوپی) در محدوده ۰/۰۲۸-۰/۹۸ میکروگرم بود و به طور کلی در ۹ نمونه (۸/۲ درصد) از مجموع ۱۱۰ نمونه شیر، آلودگی کمتر یا برابر با ۰/۰۵ میکروگرم در لیتر و در ۲۹ نمونه شیر (۲۶/۳ درصد) میزان آلودگی بالای ۰/۵ میکروگرم در لیتر بوده است. بررسی سطح آفلاتوکسین  $M_1$  شیر در اتیوپی به روش HPLC نشان می‌دهد که میزان آلودگی ۱۰ نمونه مورد بررسی، ۰/۰۲-۰/۳۱ میکروگرم در لیتر بوده است (بسوفکاد و همکاران ۲۰۱۸). وقوع آفلاتوکسین  $M_1$  در ۶۹ نمونه شیر جمع‌آوری شده در منطقه جنوب ایتالیا به روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده هیچ کدام از نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز استاندارد اروپا نبوده است. بالاترین سطوح آلودگی  $M_1$  در شیر ۴۴/۳۹ نانوگرم در کیلوگرم یافت شد (کامپونه و همکاران ۲۰۱۸).

#### آفلاتوکسین خوراک

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها دارای آفلاتوکسین  $B_1$  بودند. میزان آلودگی تمامی نمونه‌ها پایین‌تر از حد مجاز استاندارد ایالت متحده آمریکا بود ولی در مقایسه با استانداردهای ایران و اتحادیه اروپا به جز نمونه ۱ و ۹ سایر نمونه‌ها پایین‌تر از مقادیر استانداردها را نشان داد. کمترین و بیشترین میزان

تعیین سطح آفلاتوکسین  $M_1$  نمونه‌های شیر پاستوریزه استان مازندران به روش الیزا نشان می‌دهد که از ۷۶ نمونه شیر جمع آوری شده، آلودگی در تمامی نمونه‌ها گزارش شده است. متوسط غلظت آفلاتوکسین  $M_1$ ، ۶۵/۸ نانوگرم در لیتر با دامنه ۱۱/۷-۱۰۶/۶ نانوگرم در لیتر بود. سطح آفلاتوکسین  $M_1$  در ۴۶ نمونه (۶۰/۵۳ درصد) بیش از حد مجاز تعیین شده اتحادیه اروپا بود (محمدی و همکاران ۲۰۱۶). یحیی رایت و همکاران (۲۰۱۷) آلودگی آفلاتوکسین  $M_1$  در نمونه‌های شیر خام استان یزد را با روش الیزا در فصل زمستان و بهار مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاکی از آلودگی ۱۰۰ درصد نمونه‌ها بود که غلظت آلودگی از ۳/۱۸ تا ۹۲/۲۴ نانوگرم در لیتر با میانگین غلظت ۲۲/۰۷ نانوگرم در لیتر گزارش شده است. سطوح آلودگی در نمونه‌های زمستان بالاتر از نمونه‌های بهار بوده است. ۱۳/۷ درصد از نمونه‌ها حاوی آفلاتوکسین  $M_1$  در سطح خطرناک برای سلامتی انسان بودند.

برخی مطالعات نشان داده که فصول مختلف سال هم می‌تواند روی میزان آلودگی شیر به آفلاتوکسین تأثیر بگذارد و عنوان شده است شیر تولیدی در فصل پاییز آلودگی بیشتری به آفلاتوکسین داشته و دلیل آن انبارداری خوراک به ویژه بخش علوفه‌ای خوراک عنوان شده است (بلانچو و همکاران، ۱۹۸۸).

وجود داشت و میانگین آلودگی‌ها پایین‌تر از این استانداردها بود ( $P=0/0043$ ). مقایسه میزان آلودگی خوراک مصرفی دام‌ها با استانداردهای ایران و بین الملل و سطح معنی‌داری آن‌ها در جدول ۳ ذکر شده است.

آلودگی نیز به ترتیب ۱/۱ و ۶/۹ میکروگرم در کیلوگرم تعیین گردید. میانگین و انحراف از معیار آلودگی به آفاتوکسین  $B_1$   $2/08 \pm 2/5$  تعیین گردید. از لحاظ آماری نیز اختلاف معنی‌داری بین میانگین آلودگی آفاتوکسین  $B_1$  خوراک سطح منطقه با استانداردهای ملی و بین المللی

جدول ۳- مقایسه میزان آلودگی خوراکی با استانداردهای ایران و بین الملل (میکروگرم در کیلوگرم)

Table 3- Comparison of animal feed contamination with international and Iranian standards ( $\mu\text{g} / \text{kg}$ )

Country	Limit of standard	P value	t value	Mean $\pm$ Std dev	DF
Iran	5	0.0043	-3.79	2.5 $\pm$ 2.08	9
America	20	<0.0001	-26.55	2.5 $\pm$ 2.08	9
EU	5	0.0043	-3.79	2.5 $\pm$ 2.08	9

خوراک برای آفاتوکسین  $B_1$  مثبت بودند و غلظت آفاتوکسین در ۶/۳ درصد و ۲/۳ درصد نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا و چین بوده است. در میان اقلام خوراکی کنجاله بادام زمینی و ذرت حساس به این آلودگی بودند (اونگ و همکاران ۲۰۱۸). لیو و همکاران بین سال‌های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴، ۲۰۸۳ نمونه برای تشخیص آفاتوکسین  $B_1$ ، ۲۵۵ نمونه برای زیرالنون و ۱۹۰ نمونه برای داکسی نیوالنول جمع‌آوری و با روش HPLC مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از آلودگی ۳۳/۹ درصد، ۹۰/۲ درصد و ۷۷/۴ درصد از خوراک به ترتیب برای آفاتوکسین  $B_1$ ، زرالنون و داکسی نیوالنول بود. میزان آلودگی مواد خوراکی به زرالنون بیشتر از دو ترکیب دیگر بود (لیو و همکاران ۲۰۱۶). ژائو و همکاران (۲۰۱۸) از ۱۷۸ نمونه گندم جمع‌آوری شده در چین ۱۸/۸ درصد از نمونه‌ها را آلوده به آفاتوکسین  $B_1$  گزارش کردند.

محمودی و نوریان (۲۰۱۵)، ۲۱۶ نمونه خوراک قزوین را با روش الیزا مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که سطوح آلودگی آفاتوکسین  $B_1$  در فصل زمستان ( $1/76 \pm 2/27$ ) بیشتر از فصل تابستان ( $0/83 \pm 0/60$ ) بوده است ( $P < 0/05$ ).

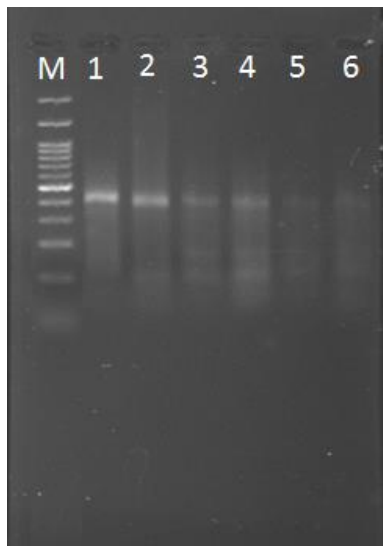
مطالعه انجام شده برای تعیین میزان آفاتوکسین  $B_1$  خوراک به روش الیزا و HPLC در ایران نشان می‌دهد که از ۲۱۰ نمونه تهیه شده (کنسانتره، سیلاژ ذرت و یونجه) از مزارع مختلف، ۸۸ نمونه (۴۱/۹ درصد) در محدوده ۱۹/۴۱-۱/۸۷ میکروگرم در کیلوگرم آلوده به آفاتوکسین  $B_1$  بودند. ۷۰ نمونه (۳۳/۳ درصد) بالاتر از حد مجاز استاندارد ایران و اروپا بودند. (احسانی و همکاران ۲۰۱۶). طاهری و همکاران، ۲۰۰ نمونه گندم در گلستان را برای تعیین میزان آلودگی آفاتوکسین با استفاده از روش HPLC مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. سطح آفاتوکسین  $B_1$  در تابستان و زمستان، به ترتیب، ۳/۱ درصد و ۷/۴ درصد بود. بیشترین فراوانی آلودگی آفاتوکسین‌ها در زمستان، آفاتوکسین  $B_2$  (۹۸ درصد) و در تابستان، آفاتوکسین  $G_1$  (۵۱ درصد) بود (طاهری و همکاران ۲۰۱۲).

#### جداسازی و شناسایی مولکولی گونه فارچی آسپرژیلوس

در این تحقیق، واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی شناسایی آسپرژیلوس فلاوس انجام شد. سویه خالص جداسازی شده یک باند در حدود ۴۱۳ bp (آسپرژیلوس فلاوس) نشان داد (شکل ۱). نمونه‌های بدست آمده از آلودگی خوراک‌ها و مورد بررسی در این

مطالعه تعیین میزان آفاتوکسین  $B_1$  خوراک دام با استفاده از روش HPLC در کشور چین نیز نشان می‌دهد که از مجموع ۱۷۴ نمونه، تقریباً ۳۵/۱ درصد از نمونه‌های

آزمایش هیچ بانندی را در این محدوده‌ها نشان ندادند در نتیجه می‌توان گفت که گونه قارچی غالب نمونه‌های مورد بررسی، گونه فلاووس نبوده است.



شکل ۱- محصول PCR (ردیف M= مارکر، ستون‌های ۱ و ۲= سویه خالص و ستون‌های ۳، ۴، ۵ و ۶= سویه‌های نمونه برداری شده از خوراک-های دام)

Figure 1- PCR product (M = MARKER, 1 and 2 columns = pure strain, 3, 4, 5, and 6 columns = strains from feed samples)

آسپرژیلوس نایجر (۱۰ درصد)، آسپرژیلوس پارازیتیکوس (۸/۱۸ درصد) و آسپرژیلوس اوریزه (۴/۵۴ درصد) بوده است (داوری و همکاران ۲۰۱۵). در تحقیقی که بر روی نمونه‌های بادام زمینی و پسته خشک صورت گرفت، انواع آسپرژیلوس به عنوان شایع‌ترین عامل آلودگی شناسایی شدند، به طوری که آسپرژیلوس فلاووس بالاترین درصد آلودگی را در پسته (۲۲ درصد) و سپس در بادام زمینی (۱۹ درصد) ایجاد کرد (خداویسی و همکاران ۲۰۱۲). تعیین میزان آلودگی ۱۲۱ نمونه از خوراک دام تهران و البرز نشان داد که ۶۷ نمونه آلوده به آفلاتوکسین بوده و این نشانگر میزان آلودگی ۵۵/۳۷ درصد به قارچ‌های آسپرژیلوس می‌باشد. بیشترین میزان آلودگی قارچی به ترتیب در جو (۱۴/۱۶ درصد)، سبوس گندم (۱۴/۵ درصد)، کنجاله سویا (۱۰/۸۳ درصد) و ذرت (۱۰/۸۳ درصد) مشاهده شده است (رحیمی و رحیمی ۲۰۱۷). نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داد

مواد خوراکی مورد استفاده در تغذیه دام از نظر دارا بودن فاکتورهای لازم جهت رشد قارچها مانند pH، کربوهیدرات‌ها، چربی، املاح، نمک و فشار اسمزی برای رشد کپک‌ها مناسب هستند. آب و هوای گرم و مرطوب، انبارداری نامناسب و عدم اطلاع کافی دامداران در نگهداری صحیح خوراک دام شرایط مناسبی را برای رشد کپک‌ها فراهم میکند (کافمن، ۲۰۰۷).

۱۱۰ نمونه خوراک (سیلاژ، کنسانتره، یونجه و جیره کاملاً مخلوط) جمع‌آوری شده از ۳۰ گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی استان خراسان رضوی جهت بررسی آلودگی خوراک به گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۱۰ نمونه خوراکی، ۶۸ گونه آسپرژیلوس (۶۱/۸۲ درصد) جدا شد. ایزوله‌های غالب آسپرژیلوس، آسپرژیلوس فومیگاتوس (۲۱/۸۱ درصد) و سپس آسپرژیلوس فلاووس (۱۷/۲۷ درصد)،



به حداقل رساندن این ترکیبات در زنجیره غذایی، برنامه-ریزی‌ها و اقدامات لازم و ضروری انجام پذیرد. در کل تفاوت معنی‌داری بین میانگین آلودگی آفلاتوکسین  $M_1$  و  $B_1$  سطح منطقه با استانداردهای ملی و بین‌المللی وجود داشت و میانگین آلودگی‌ها به طور معنی‌داری پایین‌تر از این استانداردها بود. همچنین برای شناسایی روش‌های مناسب جلوگیری از رشد قارچ‌ها، شناسایی سویه مؤثر در آلودگی نیز ضروری می‌باشد که بر اساس نتایج تحقیق حاضر حاضر، آسپرژیلوس فلاووس عامل اصلی آلودگی قارچی و تولید مایکوتوکسین‌ها در مراکز نمونه برداری شده نبوده است.

#### سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از جناب آقای دکتر جوانمرد و جناب آقای مهندس چراغی برای مساعدت‌هایشان در راستای انجام کارهای مولکولی اعلام می‌دارند.

که ۶۷/۵ درصد و ۵۱/۱ درصد نمونه‌های خوراک به ترتیب آلوده به آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس بوده است (آحمد و همکاران ۲۰۱۷). نتایج تحقیقی در هند نشان داد که از ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده فقط ۹ نمونه (۶۰ درصد) آلوده به آسپرژیلوس بودند. ۷ نمونه توسط آسپرژیلوس فلاووس و ۲ نمونه توسط آسپرژیلوس نایجر شناسایی شدند (خار و همکاران ۲۰۱۸).

#### نتیجه‌گیری کلی

مایکوتوکسین‌ها مواد بیولوژیکی هستند که به دنبال رشد قارچ‌های توکسین‌زا در مواد غذایی و خوراکی، تولید و کیفیت بهداشتی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین جهت تأمین سلامت مصرف‌کنندگان لازم است وجود و میزان مایکوتوکسین‌های مختلف در مواد غذایی و خوراکی و شیر به طور مستمر اندازه‌گیری شده و برای

#### منابع مورد استفاده

- Ahmed AD, Al-Khafaji NJ and Ahmed LT, 2017. Isolation and Molecular Identification of *Aspergillus* spp. Collected from Different Sources of Animals Feed. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 1792-1797.
- Besufekad Y, Ayalew W and Getachew A, 2018. Analysis to Ascertain the Determination for Aflatoxin Contamination of Milk and Feeds from Gurage Zone, Ethiopia. *International Journal of Agricultural Research* 13: 1-11.
- Blanco JL, Dominguez L, Gomez-lucia E, Garayzabal JF, Garcia JA and Suarez G, 1988. Presence of aflatoxin M1 in commercial UHT treated milk, *Applied Environmental Microbiology* 54: 1622-1633.
- Campane L, Piccinelli AL, Celano R, Pagano I, Di Sanzo R, Carabetta S, Mariateresa R and Rastrelli L, 2018. Occurrence of aflatoxin M1 in milk samples from Italy analysed by online-SPE UHPLC-MS/MS. *Natural Product Research* 32: 1803-1808.
- Costanzo P, Santini A, Fattore L, Novellino E and Ritieni A, 2015. Toxicity of aflatoxin B1 towards the vitamin D receptor (VDR). *Food and Chemical Toxicology* 76: 77-79.
- Creppy EE, 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19-28.
- Davari E, Mohsenzadeh M, Mohammadi G and Rezaeian-Doloei R, 2015. Characterization of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 16: 150-155.
- Ehsani A, Barani A and Nasiri Z, 2016. Occurrence of aflatoxin B1 contamination in dairy cows feed in Iran. *Toxin Reviews* 35: 54-57.
- Gizachew D, Szonyi B, Tegegne A, Hanson J and Grace D, 2016. Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control* 59: 773-779.

- Gontia-Mishra I, Tripathi N and Tiwari S, 2014. A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies. *Indian Journal of Biotechnology* 13: 536-539.
- Hernández-Hierro JM, García-Villanova RJ and González-Martín I, 2008. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta* 622: 189-194.
- Hussein HS and Brasel JM, 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.
- Kaufman P, 2007. Mushroom poisoning: syndromic diagnosis and treatment. *Food Additives and Contaminants*. 157: 493-502.
- Khare R, Agarwal MK, Bhagayavant SS, Verma P and Nagar DP, 2018. Detection of *Aspergillus flavus* using PCR method from fungus infested food grains collected from local market. *Annals of Plant Sciences* 7: 2073-2077.
- Khodavaisy S, Maleki A, Hossainzade B, Rezai S, Ahmadi F, Validi A, Rashidi A and Ghahramani A, 2012. Occurrence of fungal contamination in pistachio and peanut samples from retail shops in Sanandaj province, Iran. *African Journal of Microbiology Research* 6: 6781-6784.
- Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Luber G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A and DeCock K, 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives* 113: 1763-1767.
- Liu J, Sun L, Zhang J, Guo J, Chen L, Qi D and Zhang N, 2016. Aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from central China. *Food Additives and Contaminants: Part B* 9: 91-97.
- Mahmoudi R and Norian R, 2015. Aflatoxin B1 and M1 contamination in cow feeds and milk from Iran. *Food and Agricultural Immunology* 26: 131-137.
- Manafi M, Hedayati M and Arak H, 2018. The effect of concomitant use of ethanolic mixture extractions of Thyme and Oregano on performance and morphology of gastrointestinal tract in broilers fed contaminated feed with Aflatoxin B1. *Journal of Animal Science Researches (Agriculture Science)* 18: 1-16. (In Persian)
- Martin RR, James D and Lévesque CA. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38: 207-239.
- Mohammadi H, Shokrzadeh M, Aliabadi Z and Riahi-Zanjani B, 2016. Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk samples in Sari, Mazandaran province, Iran. *Mycotoxin Research* 32: 85-87.
- Pleadin J, Vulić A, Peršić N, Škrivanko M, Capek B and Cvetnić Z, 2014. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* 40: 286-291.
- Rahimi S and Rahimi S, 2017. Evaluation of the Cattle Ration feed Contamination Amount With the *Aspergillus* Fungi by PCR-Based Technique and Based on ITS Gene Sequences. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 14: 53-61.
- Schena L, Nigro F, Ippolito A and Gallitelli D, 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110: 893-908.
- Smith MC, Madec S, Coton E and Hymery N, 2016. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins* 8: 94-109.
- Taheri N, Semnani S, Roshandel G, Namjoo M, Keshavarzian H, Chogan AG, Kebria FG and Joshaghani H, 2012. Aflatoxin contamination in wheat flour samples from Golestan Province, Northeast of Iran. *Iranian Journal of Public Health* 41: 42-47.
- Velazhahan R, Vijayanandraj S, Vijayasamundeeswari A, Paranidharan V, Samiyappan R, Iwamoto T, Friebe B and Muthukrishnan S, 2010. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill-structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G1. *Food Control* 21: 719-725.
- Wang Q, Zhang Y, Zheng N, Guo L, Song X, Zhao SH and Wang J, 2019. Biological System Responses of Dairy Cows to Aflatoxin B1 Exposure Revealed with Metabolomic Changes in Multiple Biofluids. *Toxins* 11: 77-99.

- Xie L, Chen M and Ying Y, 2016. Development of methods for determination of aflatoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56: 2642-2664.
- Xiong J, Xiong L, Zhou H, Liu Y and Wu L, 2018. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feedstuff and aflatoxin M1 in UHT and pasteurized milk in central China. *Food Control*, 92: 386-390.
- Yahyaraeyat R, Shokri H, Khosravi AR and Torabi S, 2017. Evaluation of the contamination of aflatoxin M1 level in raw milk samples by ELISA method in Yazd province. *Journal of Veterinary Research* 72.
- Zachová I, Vytrásová J, Pejchalová M, Červenka L and Tavčar-Kalcher G, 2003. Detection of aflatoxigenic fungi in feeds using the PCR method. *Folia Microbiologica* 48: 817-821.
- Zhao Y, Wang Q, Huang J, Ma L, Chen Z and Wang F, 2018. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China. *Food Additives and Contaminants: Part B* 11: 9-14.

## Evaluating the rate of aflatoxin contamination in livestock feed and milk and molecular identification of their fungal strains in some dairy farms of East Azerbaijan province

M Montazerharzand<sup>1</sup>, H Paya<sup>\*2</sup>, A Taghizadeh<sup>2</sup> and A Hosseinkhani<sup>2</sup>

Received: December 25, 2018

Accepted February 17, 2019:

<sup>1</sup>MSc in Animal Nutrition Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>Assistente Professor, Professor and Associate Professor, respectively, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

\*Corresponding Author: Email: hamid.paya@tabrizu.ac.ir

**Introduction:** Aflatoxins are a large group of mycotoxins that are produced through Polyketide pathway by specific species of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, and *Aspergillus nomius*. These pesticides are known to be the most dangerous mycotoxins affecting human and livestock health (Pleadin et al. 2014). Several hundred mycotoxins have been identified, and more than 25% of the world annual grain production is contaminated with mycotoxin (Smith et al. 2016). Among the 400 known mycotoxins, Aflatoxin B1, B2, G1, and G2 are the most important food and feed mycotoxins (Costanzo et al. 2015). Aflatoxin M1 and M2 are the hydroxyl metabolite of aflatoxin B1 and B2 that can be found in milk or other animal products (Hussein and Brasel. 2001). At the first level, the main manifestations of mycotoxins exposure in animals are reductions in feed intake and weight gain. At the second level, mycotoxins affect the quantity of animal products. The third level of influence is the safety and quality of the products from exposed animals (Wang et al. 2019). The present study was designed to detect contamination of aflatoxin M1 in milk and, aflatoxin B1 in feed and subsequent molecular isolation and identification of *Aspergillus flavus* species.

**Material and methods:** In this study, 10 milk samples from milk reservoirs and 10 feed samples from a total mixed ration of livestock from dairy farms of East Azarbaijan province (Tabriz and Marand) were collected. After preparation of samples, the experiment was conducted using competitive ELISA method. The principles were as follows: after adding standard solutions or samples to the wells, aflatoxin M1 was bonded from specimens or standards to specific antibody binding sites. After 30 minutes of incubation step, unbound reagents were removed during a single wash step. Horseradish peroxidase (HRP) aflatoxin M1 was added to the wells and after one 15 minutes of incubation, the unlinked conjugate was removed during the washing step. Then, some aflatoxin M1-HRP was coherent by adding a substrate/chromogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB) solution. In the presence of colorless chromogen, mixed conjugated aflatoxin and M1-HRP agent was converted to colored product. The addition of sulfuric acid caused the suspension of the substrate reaction and finally, the light intensity was measured by a photometric method at 450 nm. Optical density had an inverse relationship with the concentration of aflatoxin in the sample. To isolate the fungus, first 2 g of the standardized feed were weighed and milled in a falcon containing 18 ml of physiological serum and then, mixed well with a vortex for five minutes. A portion of the diluted feed was removed and cultured on plots containing a Potato Dextrose Agar medium at several locations. Plates were incubated for 7 days at 25 °C. DNA was extracted from Potato Dextrose Broth (PDB) medium. The resulting mycelium mass was frozen and converted to a uniform powder by liquid nitrogen. DNA extraction was carried out by placing the samples in a buffer and purification with organic solvents such as chloroform/isoamyl alcohol and finally, curing with cold isopropanol. The resulting DNA was stored at -20 °C. In order to evaluate the actuary of identification for *Aspergillus flavus*, the primer sequence of AFLA-F and AFLA-R gene was aligned using the BLAST software (GenBank) to find similarity rate within resisted reference sequences. Each PCR reaction consists of: 6 µl of PCR Master Mix, 2 µl extracted DNA, 0.2 µl of each recipe primer, 1.6 µl of distilled water. Then, 10 µl

of the final volume of reaction was placed on thermosecler device. A PCR program for amplification of the targeted PCR fragment was fixed based on following temperature: Initial denaturant at 95°C for 10 min, {denaturant at 95°C for 1 min, annealing at 66°C for 2 min, extension at 72°C for 2 min (total 34 cycle)} and the final amplification at 72°C for 5 minutes (Zachová *et al.* 2003). Isolated strains of *Aspergillus* strains were verified using the PCR method; its reaction products were detected in 1% agarose gel by electrophoresis.

**Results and discussion:** The results showed that all milk and feed samples were contaminated with aflatoxin, but the contamination rate of milk samples was lower than the standard values of Iran, America, and the European Union (0.1, 0.5 and 0.05 µg / Kg). Among the 10 collected samples, only two edible samples with aflatoxin B1 contamination were higher than the Iranian and European standards (5 µg / kg). The contamination level of milk and feed samples were observed in the range of 0.021-0.05 and 1.1-6.9 µg / kg, respectively. Statistically, there was a significant difference between the mean of contamination of aflatoxin M1 in milk and B1 in feed in the region with national and international standards and the mean of M1 and B1 contamination was lower than these standards. The level of aflatoxin M1 in milk was detected by HPLC method, indicating that the infection rate of 10 samples was 0.02-0.31 µg / l (Besufekad *et al.* 2018). In another study, 178 wheat samples were collected in China and reported 18.8% of the samples contaminated with aflatoxin B1 (Liu *et al.* 2016). The results of the fungal species also showed that the analyzed samples did not show any bands in the 413bp range. As a result, it can be said that the dominant species and the main cause of contamination were not *Flavus* species. Wang *et al.* (2016) reported that aflatoxins are mainly produced by the genus *Aspergillus*, and are commonly found in food and feed in humid and warm environments. Research results in India show that among the 15 collected samples, only 9 samples (60%) were infected with *Aspergillus*. Seven samples were detected as *Aspergillus flavus* and two samples as *Aspergillus niger* (Khare *et al.* 2018).

**Conclusion:** Milk composition, body mass gain, immunity, and reproductive performance are affected in dairy ruminants by feeds contaminated with aflatoxins. It is expected that by controlling animal feed against aflatoxin and reducing its levels in feed by improving production and storage conditions, a suitable method for preventing contamination of milk and its products will be adopted to help improve the health of the community.

**Keywords:** Aflatoxin B1, Aflatoxin M1, Animal feed, *Aspergillus*, Milk, Polymerase chain reaction