ارزیابی آفلاتوکسین ها و عوامل مولده آنها در نانهای قابل تغذیه در دام

دکتر علیقلی رامین[1]*

دریافت مقاله: ۲۶ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۳۰ تیرماه ۱۳۸۲

هدف: ۱- بررسی مقایسه ای آلودگی نانهای سالم، نیمه آلوده و کپک زده به آفلاتوکسین و آسپرژیلوس، ۲- تعیین مقادیر و انواع آفلاتوکسین به همراه نوع قارچ مولده، ۳- شمارش کلنی های قارچی نانهای فاقد وحاوی آفلاتوکسین و ۴- تعیین رابطه احتمالی بین آفلاتوکسین آسپرژیلوس و شمارش کلنی قارچی.

طرح: بررسی مشاهده ای تعیین مقادیر و انواع آفلاتوکسین به همراه عوامل مولده آنها در نانهای قابل تغذیه دردام.

روش: دویست و بیست و دو نمونه نان قابل تغذیه در دام در سالهای ۸۱-۱۳۸۰ در ارومیه تهیه گردیدند. تعداد نانهای سالم، نیمه آلوده و کپک زده تهیه شده از محلهای جمع آوری نان به ترتیب ۵۴، ۵۶ و ۱۱۲ نمونه بوده است. آفلاتوکسین های B1، B2، G1 و G2 به روش کروماتوگرافی با لایه نازک تعیین گردید. برای جدا سازی آسپرژیلوس، نانها در محیط سابورو دکستروز آگار کشت شدند و کلنی قارچی نیز با روش رقت و کشت شمارش گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری:مربع کای و ضریب همبستگی.

نتایج: ۴۲ نمونه (۱۸/۱ درصد) دارای حداقل یک نوع آفلاتوکسین، چهار نمونه (۱/۸درصد) دارای دو نوع آفلاتوکسین، یک مورد سه (۰/۵درصد) و مورد دیگر چهار نوع آفلاتوکسین (۰/۵ درصد) داشتند. تعداد و درصد آفلاتوکسین های B1، B2، G1 و G2 به ترتیب ۱۶ (۳۶/۶درصد)، ۱۸ (۴۲/۸درصد)، ۷ (۱۶/۶درصد) و ۱۰ (۲۴درصد) مورد بوده است. مقادیر آفلاتوکسین در ۱۰ مورد (۴/۵درصد) بالای ۲۰ppm ، در ۸ مورد (۳/۶درصد) بین ۱۹-۱۰ppm و ۲۴ مورد (۱۰/۸درصد) کمتر از ۱۰ppm آفلاتوکسین داشتند. درصد آلودگی نانهای سالم، نیمه آلوده و کپک زده به آفلاتوکسین به ترتیب ۵/۵ درصد، ۱۰/۹درصد و ۳۲/۴درصد بودند که اختلاف بین آنها معنی دار (P<۰/۰۵) بوده است. نتایج کشت قارچی نشانگر آلودگی حدود ۹۴/۱ درصد (۸۰/۸۵) نانها به *آسپرژیلوس نیجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاوس* بوده که ۵۰ مورد *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ۵۶ مورد *آسپرژیلوس نیجر* و ۲ مورد *آسپرژیلوس فلاوس* بوده است. تعداد نانهای حاوی یک نوع آسپرژیلوس ۵۳ مورد (۶۲/۳۵ درصد)، ۲ نوع آسپرژیلوس ۲۶ مورد (۳۱/۱۸ درصد) و سه نوع آسپرژیلوس یک مورد گزارش می گردد. همچنین از ۸۰ نمونه کشت مثبت ۵ مورد مربوط به هر کدام از نانهای سالم و نیمه آلوده و ۷۰ مورد نانهای کپک زده بوده است. از ۸۵ نمونه نان کشت شده ۴۳ مورد فاقد آفلاتوکسین و ۴۲ مورد دارای آفلاتوکسین بوده که ۳۸ مورد توام با آفلاتوکسین، آسپرژیلوس و شمارش کلنی مثبت بودند و ۴۱ مورد با داشتن کلنی قارچی و آسپرژیلوس، فاقد آفلاتوکسین بودند. دامنه کلنی های قارچی تا ۴۵۰۰۰۰ کلنی در گرم نان متغیر بوده است. آنالیز آماری همبستگی بین آفلاتوکسین و شمارش کلنی (P<۰/۰۱) آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس نیجر* (P<۰/۰۱) آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (P<۰/۰۵) شمارش کلنی و آفلاتوکسین B1 (P<۰/۰۱) شمارش کلنی و آفلاتوکسین G2 (P<۰/۰۵) رابطه مثبتی را نشان داد.

نتیجه گیری: اولاً آفلاتوکسین مترشحه از آسپرژیلوس در نانهای سالم یاکپک زده مصرف شده در تغذیه دام مهم و خطرناک می باشد. آفلاتوکسین B1 با مقادیر بالای ۲۰ppm در نانهای مذکور از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *نیجر و فلاوس* از گونه های عمده آسپرژیلوس در نانهای آلوده می باشند. همچنین رابطه مثبتی بین آفلاتوکسین، شمارش کلنی و آسپرژیلوس وجود دارد. سرانجام با تأکید بر اصلاح نانهای کپک زده می توان میزان انتقال آفلاتوکسین به دام و انسان را کاهش داد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۵۱-۳۴۷.

واژه های کلیدی: *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *نیجر*، *فلاوس*، آفلاتوکسین B1، M1، TLC.

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
*) نویسنده مسؤول aligholiramin@yahoo.com

The study of aflatoxins and their producing agents in bread that consumed as ruminant foodstuffs

Ramin, A.G.[1]

[1] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.*

Objectives: 1) Comparative investigation of normal, partially infected and moldy breads to aflatoxin and their causative agents, 2) Determination of amounts and types of aflatoxin and *Aspergillus spp* 3) Determination of total fungal counts in either breads containing aflatoxin or without aflatoxin, 4) Correlations between aflatoxin, *Aspergillus* and total fungal count.

Design: Observational study.

Procedure: 222 bread samples which consumed as ruminants foodstuffs were collected from bread shops in urmia during 2001-2002. The number of normal, partially infected and moldy breads were 54, 56 and 112, respectively. Aflatoxins (AF) were assessed by Thin Layer Chromatography Methed using standard aflatoxins B1, B2, G1, G2. Breads were cultured for *Aspergillus spp* using Saboroud Dextrose Agar Media and total fungal counts were calculated using dilution and culture method.

Statistical analysis: Chi-square test and correlations coefficient.

Results: Aflatoxin was found in 42 (18.17%) breads in which 4 had 2 types of aflatoxin (1.8%) and in one bread 3 (0.5%) and another 4 types of aflatoxin (0.5%). Distribution and percent of aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1 and aflatoxin G2 were 16 (36.67%.), 18 (42.87%), 7 (16.6%) and 10 (247%), respectively. 10 of 42 breads had aflatoxin B1over 20 ppm (4.5%), 8 had 10-19 ppm (3.6%) and 24 had less then 10 ppm (10.8%). The percentage of aflatoxin contamination in normal, partially infected and moldy bread were 5.5%, 10.9% and 32.4%., respectively, which were significantly different (P<0.05). The results of fungal culture showed 94.1% (80/85) infected to *A. fumigatus* (50 cases), *A. niger* (56 cases) and *A. flavus* (2 cases). 53 cases (63.357%) had *A. fumigatus* or *A. niger*, 26 cases (31.18%) showed two types of *Aspergillus* and one case had all three *Aspergilluses*. 10 of 80 cases were diagnosed in apparently normal and partially infected bread while 70 cases were in moldy breads. Aflatoxins were found in 42 of 85 cultured cases while 43 cases had no aflatoxins. Also 38 samples showed either aflatoxin, *Aspergillus* or total fungal count while in 41 cases instead of positive total fungal count and *Aspergllus*, no aflatoxin was detected. Total fungal count varied from 1 to 450000 fungi colony per gram bread. Positive correlations were found between aflatoxin and fungal count (r = 0.44), aflatoxin and *A. niger* (r = 0.58), aflatoxin and *A. fumigatus* (r = 0.85), total fungal count and (r = 0.90), total fungal count and (r = 0.70).

Clinical implications: It is concluded that 1) aflatoxins produced by *Aspergillus* in normal and moldy breads could be an important as ruminant foodstuffs, 2) aflatoxin B1 with over 20 ppm was found as a main aflatoxin in breads, 3) *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. flavus* were the *main Aspergillus* strains in urmia, and finally 4) It is recommended to modify the collecting and consumption methods of bread as ruminant foodstuffs to minimize the transmission of aflatoxin to ruminants and human as well. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4:347-351, 2003.***

Key words: Aflatoxin, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, aflatoxin B1, aflatoxin M1, TLC.

Corresponding author email:aligholiramin@yahoo.com

تغذیه صحیح و اصولی در سیستمهای شیری و پرواربندی تضمین کننده کیفیت تولید، کمیت مطلوب و متوازن با معیارهای بهداشتی خواهد بود. عدم آگاهی از نیاز دام، حاکمیت فقر غذایی و استفاده اجتناب ناپذیر از ضایعات متنوع مغذی نه تنها منطبق با موازین تولیدات دامی نبوده بلکه با عوارضی نیز همراه خواهد بود. بهره مندی از نان در تغذیه دام به عنوان منبع انرژی و پروتئینی و رغبت دام برای تغذیه از آنها و جلوگیری از اتلاف ضایعات در تغذیه دام کارآیی فراوانی دارد. صرف نظر از اثرات جانبی نان در ایجاد اسیدوز و مسمومیت، مهمترین نگرانی آلودگیهای قارچی و مشتقات آنها مانند آفلاتوکسین‌ها می باشد. آفلاتوکسین ها سموم قارچهای *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم*، *رایزوپوس* و *استرپتومایسس* هستند که در علوفه، کاه آلوده و مواد دانه ای قابل تخمیر در تحت شرایطی دیده می شوند (۶). آلودگی با آسپرژیلوس عوارض تناسلی (۳۱)، گوارشی (۳۰) و تنفسی (۲۰) ایجاد کرده و آفلاتوکسین ها با خاصیت تومورزایی (۴) و مسمومیت (۲۶) مسبب عوارضی در دام و انسان هستند. تغذیه دام از مواد غذایی حاوی آفلاتوکسین B1 در کبد و شیر تجمع کرده که از نظر بهداشت همگانی مخاطره آمیز است. محققان حداقل ۴ نوع سموم قارچی مهم به استثناء آفلاتوکسین را در مواد غذایی گاو جدا نموده اند (۳). در یک مطالعه دیگر علی رغم آلودگی بالای ۵۳ درصد شیر خام به *آسپرژیلوس فلاوس*، آفلاتوکسینی جدا نگردید (۷). در صورتی که *آسپرژیلوس فلاوس* و *پارازیتیکوس* از مهمترین گونه های مولد آفلاتوکسین بوده (۱،۲۵) و سایر گونه ها مانند *آسپرژیلوس نیجر* و *فومیگاتوس* *آفلاتوکسین* کمتری تولید می کنند (۱۴،۲۹). تجارب آلودگی حدود ۱۸/۶ درصد نانهای سالم به *آسپرژیلوس* (۳۶) ۱۳/۲ درصد نان به آفلاتوکسین B1 (۳۲) و استخراج *آسپرژیلوس فلاوس* را به همراه آفلاتوکسین های B1 و B2 نشان داده اند (۲۱،۲۸). سرانجام محققان مقدار آفلاتوکسین B1 را ۵/۵ ppm درماده غذایی گزارش نموده اند (۱۱) در صورتی که نمونه های مورد آزمایش همگی به ظاهر سالم بودند. باتوجه به یافته های فوق اولاً حضور و فقدان *آسپرژیلوس* در نمونه دلیل بر وجود یا عدم آفلاتوکسین نبوده وتشخیص قطعی مبتنی بر جدا سازی آفلاتوکسین می باشد. همچنین در هیچ گزارشی نان قابل تغذیه در دام حاوی آلودگیهای عینی و باطنی تجربه نشده و سرانجام با توجه به تغذیه اجباری دامها از نان آگاهی از وجود، مقدار و عوامل مولده آفلاتوکسین و مقایسه آن با معیارهای استاندارد امری ضروری و اجتناب ناپذیرمی باشد. لذا اهداف این مطالعه عبارت اند از: ۱- بررسی مقایسه ای آلودگی نانهای سالم، نیمه آلوده و کپک زده به *آسپرژیلوس* و آفلاتوکسین، ۲- تعیین مقادیر و انواع آفلاتوکسین به همراه عوامل مولده، ۳- شمارش کلنی های قارچی نانهای حاوی آفلاتوکسین و ۴- تعیین رابطه احتمالی بین آفلاتوکسین، *آسپرژیلوس* و شمارش کلنی قارچی.

مواد و روش کار

تعداد ۲۲۲ نمونه نان به مقدار ۵۰۰ گرم از محلهای جمع آوری نان در ارومیه در سالهای ۸۱-۱۳۸۰ تهیه شدند. اکثریت نمونه ها نان لواش بوده و سنگک و بربری در اقلیت بودند. وضعیت نمونه ها از نظر رنگ، ظاهر و بو به سه گروه نان به ظاهر سالم، نیمه آلوده و کپک زده تقسیم گردیده که تعداد آنها به ترتیب ۵۴، ۵۶ و ۱۱۲ نمونه بودند. نان به ظاهر سالم سفید رنگ بدون بو و کپک بوده است. نانهای نیمه آلوده برنگ تیره و کدر دارای بو و جزیی قارچ زدگی داشتند. نان کپک زده عموماً تغییر رنگ یافته کپک زده و دارای بو بودند. در هنگام برداشت نمونه ها از ۴۰ مرکز کسب مشخصات نمونه، تاریخ تهیه، محل و نوع نمونه ثبت می شدند. نمونه برداریها معمولاً به فاصله ۱۵ روز بودند. نانها پس از جمع آوری در دکانهای مذکور در گونیها بسته بندی و به دامداریها ارسال می شدند.

نانهای تهیه شده آسیاب و به شکل پودر درآمدند و سپس به میزان ۲۰۰ گرم در کیسه های پلاستیکی به آزمایشگاه کنترل کیفی جهت ارزیابی آفلاتوکسین، کشت و شمارش کلنی قارچی ارسال گردیدند. تعداد نمونه برداری در هر بار از دکانها بین ۴ الی ۱۰ نمونه متغیر بوده ولی ارزیابی آفلاتوکسین با استفاده ازکاغذ کروماتوگرافی در هر آزمایش ۹ نمونه بوده است. تعداد ۸۵ نمونه از نانهای حاوی آفلاتوکسین و فاقد آفلاتوکسین (اکثریت کپک زده و نیمه آلوده) جهت کشت و شمارش کلنی های قارچی اقدام گردیدند.

آفلاتوکسین های گروه B و G به روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) تشخیص داده شدند (۱۵). این روش عمدتاً برای مواد غذایی، نان، خوراک دام و طیور به کار می رود. این روش به علت سرعت عمل، حساسیت و سادگی کار در اغلب آزمایشگاههای جهان استفاده می شود. اساس کار مشتمل برعصاره گیری، خالص کردن، تبخیر و خشک نمودن و محلول کردن مجدد آن است که به وسیله کروماتوگرافی بر روی لایه های نازک انجام می گیرد. این روش مقادیر تا ppm و کسری از آنرا اندازه گیری می نماید.

آسپرژیلوس در محیط سابورو دکستروز آگار کشت و تشخیص داده شد و شمارش کلنی های قارچی بر اساس روش رقت و کشت با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{شمارش قارچی} = \frac{\text{رقت اولیه} \times \text{رقت رشد کرده} \times \text{تعداد پرگنه ها}}{\text{حجم رقیق کننده} \times \text{مقدار اولیه نمونه}}$$

نتایج

از مجموع ۲۲۲ نان ۴۲ نمونه حداقل یک نوع آفلاتوکسین را نشان دادند (۱۸/۱ درصد). چهار مورد ۲ نوع آفلاتوکسین (۱/۸ درصد) یک مورد سه و مورد دیگر چهار نوع آفلاتوکسین(۰/۵ درصد) داشتند. جدول ۱ پراکندگی آفلاتوکسین های G2,G1,B2,B1 را با مقادیر متفاوت در ۴۲ نمونه نشان می دهد. این موارد به ترتیب ۱۶، ۱۸، ۷ و ۱۰ مورد بودند. بیشترین و کمترین موارد به ترتیب مربوط به آفلاتوکسین های B2 و G1 بوده است. براساس استاندارد ایران حد مجاز آفلاتوکسین برای خوراک دام و طیور ۲۰ ppm می باشد لذا در ۱۰ مورد (۴/۵ درصد) بالای ۲۰ ppm در ۸ مورد (۳/۶ درصد) بین ۱۰ ppm تا ۱۹ و ۲۴ مورد (۱۰/۸ درصد) کمتر از ۱۰ ppm بوده است.

درصد آلودگی نانهای سالم، نیمه آلوده و کپک زده به آفلاتوکسین در کل نمو نه ها به ترتیب ۱/۳۵ درصد، ۲/۷۲ درصد و ۱۴/۹ درصد و در بین نانهای سالم ۵/۵ درصد (۳/۵۴)، نیمه آلوده ۱۰/۹ درصد (۶/۵۵) و کپک زده ۳۲/۴ درصد (۳۳/۱۰۳) گزارش می گردد. مربع کای اختلاف معنی داری را در بین سه نوع نمونه ($P<0/05$) نشان می دهد. حداقل آلودگی در نانهای سالم و حداکثر آن در نانهای کپک زده بوده است. در نانهای کپک زده تعداد ۱۹ مورد ۱۰<، ۱۲ مورد بین ۱۹-۱۰ و ۱۱ مورد ۲۰< ppm داشتند که اختلاف بین آنها معنی دار نبوده است.

از مجموع ۸۵ نمونه نان در کشت قارچی، ۵ مورد منفی و از ۸۰ نمونه (۹۴/۱ درصد درصد) *آسپرژیلوس* جدا گردید که ۵۰ مورد *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ۵۶ مورد *آسپرژیلوس نیجر* و ۲ مورد *آسپرژیلوس فلاوس* بودند. تعداد نانهایی

جدول ۱- پراکندگی آفلاتوکسین های G2, G1, B2, B1 با مقادیر ۲۰ppm<، ۱۹ppm_۱۰ و ۱۰ppm> (n=۴۲).

مقادیر آفلاتوکسین	آفلاتوکسین B1	آفلاتوکسین B2	آفلاتوکسین G1	آفلاتوکسین G2	جمع کل
<۱۰ppm	۴	۱۲	۴	۷	۲۷a
۱۹ppm_۱۰	۴	۴	۲	۲	۱۲b
>۲۰ppm	۸	۲	۱	۱	۱۲c
مجموع	۱۶	۱۸	۷	۱۰	۵۱d

a)سه مورد، b)چهار مورد، c)دو مورد و d) ۹ مورد بیش از یک نوع آفلاتوکسین نشان دادند.

که یک نوع *آسپرژیلوس* داشتند ۵۳ مورد (۶۲/۳۵ درصد)، ۲ نوع *آسپرژیلوس* ۲۶ مورد (۳۱/۱۸ درصد) و سه نوع *آسپرژیلوس* یک مورد بوده است. همچنین از ۸۰ نمونه مثبت ۵ مورد مربوط به هر کدام از نانهای سالم و نیمه آلوده و هفتاد مورد در ارتباط با نانهای کپک زده بوده است. از مجموع ۸۵ نمونه کشت قارچی ۳۴ نمونه فاقد آفلاتوکسین و ۴۲ مورد حاوی آفلاتوکسین بوده اند (پراگندگی نزدیک ۵۰ درصد). در این رابطه ۸۳ نمونه نان در آفلاتوکسین شمارش و کشت قارچی کاملا مثبت بوده اند و ۴۱ مورد با داشتن کلنی قارچی و حداقل یک نوع *آسپرژیلوس* فاقد آفلاتوکسین بوده اند (جدول ۲).

نتایج آنالیز آماری همبستگی (جدول ۳) نشانگر این است که بین آفلاتوکسین و شمارش کلنی (P< ۰/۰۵) آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس نیجر* (P < ۰/۰۱) آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (P< ۰/۰۵)، شمارش کلنی و آفلاتوکسین B1 (P < ۰/۰۱) شمارش کلنی و آفلاتوکسین G2 (P< ۰/۰۵) رابطه مثبتی وجود دارد.

بحث

آفلاتوکسین های M1 و B1 از متابولیتهای برخی *آسپرژیلوس ها* هستند که به واسطه خاصیت تومورزایی از نظر بهداشت همگانی قابل توجه بوده و انگیزه ایی برای سالم سازی مواد غذایی محسوب می شوند. آفلاتوکسین ها به وفور در مواد غذایی دامها گزارش شده اند (۲۸). جهت تعیین میزان آلودگی نانهای قابل مصرف در تغذیه دام به *آسپرژیلوس* و سموم آنها، روش کشت و کروماتوگرافی با لایه نازک به کار رفته لذا در ۱/ ۱۸ درصد نانها حداقل یک نوع آفلاتوکسین مشخص گردید. بعضی از محققان حتی نتوانستند آفلاتوکسین را از نان جدا نمایند (۳) در صورتی که عده ای (۱۱) میزان آفلاتوکسین از نان را حدود ۱۳/۲ درصد گزارش نمودند (۳۲،۳۶). به هر حال یافته های این مطالعه با گزارشات فوق مطابقت دارد با این تفاوت که تجارب آنها در نانهای سالمی بوده که مورد تغذیه دامها قرار نمی گرفت.

در این تحقیق *آسپرژیلوسهای* موجود در نان اکثراً یک نوع سم تولید کردند که با معدودی از یافته ها (۹) هماهنگی دارد ولی در مواردی چند نوع سم نیز مشاهده شده که با نتایج سایرین همخوانی دارد (۲۱،۲۸). لذا می توان اذعان نمود که آفلاتوکسین های G2,G1,B2,B1 می توانند به وسیله آسپرژیلوسی تولید شوند که در این تحقیق *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *نیجر* و *فلاوس* بودند. منابع *آسپرژیلوس فلاوس* و *پارازیتیکوس* را به عنوان مهمترین عامل آفلاتوکسین می دانند (۱،۲۵) در صورتی که در این تحقیق موارد *آسپرژیلوس فلاوس* جدا شده از نان کمتر و موارد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *نیجر* بیشتر از همه بوده است. محققان معتقدند که *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *نیجر* در مقایسه با *آسپرژیلوس فلاوس* آفلاتوکسین کمتری تولید می کنند (۱۴،۲۹) بنابراین در این تحقیق عامل آفلاتوکسین در نانهای آلوده یا پس از تولید از بین رفته و یا این که *آسپرژیلوس نیجر* و *فومیگاتوس* به معنای

جدول ۲- مقایسه نانها در کشت شمارش قارچی و آفلاتوکسین (n=۸۵).

آفلاتوکسین	آسپرژیلوس	شمارش قارچی	تعداد موارد	جمع کل
–	+	+	۴۱	۴۳
–	–	+	۱	
–	–	–	۰	
–	+	–	۱	
+	–	–	۴	۴۲
+	+	–	۰	
+	+	+	۳۸	
+	–	+	۰	
جمع کل			۸۵	۸۵

واقعی عوامل تولید آفلاتوکسین هستند که نیازمند تأیید به وسیله تجارب دیگر می باشد.

منابع مقادیر آفلاتوکسین در غذا و بدن موجودات را بر حسب ppm و ppb گزارش نموده اند. این مطالعه تا ۲۰ ppm را در نظر گرفته و ۱۰ مورد مثبت را گزارش نمود. این مقادیر در گزارشات و تحقیقات بین المللی از ۵ تا ۱۰۰ ppm (۳۳) ذکر گردیده است. مقادیرآفلاتوکسین B1 در جیره غذایی در گزارشات ۱۲/۸ ppm ذکر شده است (۱۷). به هر حال حدمجاز آفلاتوکسین در کشورهای مختلف متفاوت بوده و نیازمند یک هماهنگی بین المللی است. حد قابل قبول آفلاتوکسین B1 در جیره غذایی ۵ ppm در کیلوگرم جیره و برای مجموع چهار آفلاتوکسین حدود ۲۰_۱۰ ppm در کیلوگرم غذا می باشد (۱۰). دز تحت کشندگی آفلاتوکسین B1 در گوساله حدود ۱۰ ppm (۱۶) و برای B2 حدود ۵ ppm در کیلوگرم جیره بوده است (۳۴). محققین نتیجه می گیرند که میزان ۰/۱۴ ppm در کیلوگرم جیره کوچکترین تأثیری در رشد دام نگذاشته است (۸) در صورتی که ۵ ppm با ضایعاتی در دام همراه بوده است (۲۲). بنابراین می توان نتیجه گرفت که حد مجاز آفلاتوکسین در غذای انسان و دام ppm یا کسری از آن باشد.

آفلاتوکسیکوزیس با تجمع آفلاتوکسین در بافتها و ادرار (۲۶)، کبد (۸) و شیر (۱۸) آشکار شده لذا اهمیت بهداشت همگانی را برانگیخته است. مصرف حداقل ۰/۸ ppm آفلاتوکسین بر کیلوگرم وزن بدن برای تجمع آفلاتوکسین در بافتها و ادرار کافی است (۲۶) و ۱۰ ppm آفلاتوکسین در کنسانتره برای تخلیه ۵۰ ppb در شیر (۱۰،۱۹) ضروری است. درصد تبدیل آفلاتوکسین از جیره به بدن معادل ۱ به ۱۰۰ (۳۵) و آفلاتوکسین B1 به M1 تا ۱ به ۲۰۰ متفاوت می باشد (۱۳) یعنی این که تغذیه از نمونه های حاوی ۲۰ ppm تبدیل به ۰/۲ ppm در بدن دام و دفع از شیر به میزان ۱ تا ۱۰ ppb خواهد بود که در حد آلودگی زیاد بوده و ممکن است همراه با اثرات تومورزایی باشد ولی در عمل بایستی با خوراندن نان حاوی آفلاتوکسین میزان تبدیل را سنجید. چنانچه محققان (۴،۷) علی رغم مثبت بودن آفلاتوکسین M1 در بدن، نتوانستند آفلاتوکسین M1 را از شیر جدا نمایند درصورتی که عده ای ۵ ppb را از شیر استخراج نموده اند (۱۳). حد متوسط آفلاتوکسین M1 تا ۱ ppb ذکر شده است (۱۸). تلاشهای جهانی در زمینه آلوده بودن دام به آفلاتوکسین براساس اندازه گیری آفلاتوکسین M1 استوار بوده و با وجود اقدامات شدید پیشگیری کننده مانند استفاده مجاز از اسید پروپیونیک (۱۲) در جیره دامها هنوز هم میزان آفلاتوکسین M1 در اروپا به صفر نرسیده است (۱۹) . در این مطالعه موارد آفلاتوکسین B1 بیشتر از آفلاتوکسین های دیگر بوده که در ارتباط با تومورزایی مسمومیت و دفع از شیر مهم می باشد (۱۷) البته در مواردی آفلاتوکسین های B2، G1 و G2 نیزگزارش گردیدند که با یافته های سایر محققان همخوانی دارد (۱۱،۲۱،۲۸).

جدول ۳- نتایج آنالیز همبستگی بین آفلاتوکسین، *آسپرژیلوس* و شمارش کلنی قارچی.

متغیر	تعداد	ضریب همبستگی
آفلاتوکسین B1 و شمارش کلنی	۳۸	۰/۴۴**
آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس نیجر*	۱۷	۰/۵۸**
آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*	۷	۰/۸۵*
آفلاتوکسین و شمارش کلنی	۱۴	۰/۹۰*
آفلاتوکسین و شمارش کلنی	۱۰	۰/۷۰*

*) ($P<0/05$)، **) ($P<0/01$)

مطالعات جهانی درخصوص ارزیابی مقادیر آفلاتوکسین و قارچهای مولد آنها در نانهای سالم بوده در صورتی که این مطالعه مشتمل بر نانهای کپک زده نیز بوده است. مشاهده ۵/۵ درصد آلودگی در نانهای سالم در مقابل ۴۳/۳ درصد نانهای نیمه آلوده و کپک زده مبین این است که نانهای سالم نیز همانند کپک زده آلودگی دارند. این میزان آلودگی در گزارشات بین المللی حدود ۱۳/۲ درصد (۳۲) و میزان آن ppb ۵/۱۵ در کیلوگرم نان (۱۱) بوده که در این مطالعه هم از نظر کمی (تعداد موارد) و کیفی (مقدار آفلاتوکسین) زیاد بوده است. به عبارت بهتر از هر ۲ نان با قارچهای به رنگ سفید، سبز و یا سیاه حتماً یکی از آنها حاوی آفلاتوکسین بوده است.

این مطالعه نشان داد که ۹۴/۱درصد نمونه ها حاوی قارچ *آسپرژیلوس* بودند یعنی این که مضاف بر آلودگی نانهای کپک زده، نانهای سالم نیز می توانند آلودگی قارچی داشته باشند. مطالعات آلودگی حدود ۱۸/۶ درصد نانها به *آسپرژیلوس* را نشان می دهد (۳۶). در مورد علوفه و کنسانتره گزارشات تا حداکثر ۸۰ درصد آلودگی وجود دارد (۹). البته نوع و کیفیت مواد غذایی شاید در میزان آلودگی دخالت داشته باشد (۵). علی رغم آلودگی وسیع محیط دام به *آسپرژیلوس*، عوارض در گاو با سقط جنین (۲۳)، ورم پستان (۲۴)،بیماریهای تنفسی (۲۰) و گوارشی همراه بوده که راه ورود عمدتاً دستگاه گوارش ذکر گردیده است (۲۷). از نظر نوع پراگندگی، گزارشات جهانی به ترتیب *آسپرژیلوس فلاوس*، *پارازیتیکوس*، *فومیگاتوس* و *نیجر* را نشان می دهند که در این رابطه *آسپرژیلوس فلاوس* مهمترین آنها محسوب می گردد (۲). در مطالعه اخیر پراگندگی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *نیجر* بیشتر از بقیه بوده و *پارازیتیکوس* استخراج نگردید. بنابراین می توان اذعان نمود که مناطق مختلف دارای گونه های خاص *آسپرژیلوس* هستند که با آن منطقه هماهنگی پیدا نموده اند و این امر دلیلی بر تغییر در نوع و مقدار آفلاتوکسین تولید شده به وسیله قارچ بوده است به عبارت بهتر *آسپرژیلوس نیجر* و *فومیگاتوس* هم می توانند مانند گونه های *آسپرژیلوس فلاوس* و *پارازیتیکوس* آفلاتوکسیکوژنیک باشند همچنان که مطالعات دیگر نشان می دهند ولی مسلماً مقدار آن کمتر از آفلاتوکسین تولید شده به وسیله *آسپرژیلوس فلاوس* و *پارازیتیکوس* می باشد (۲۹). نتایج مطالعات محققان نشان می دهند که *آسپرژیلوس فلاوس* به همراه آفلاتوکسین های B2 و B1 از نان جدا شده اند (۲۱،۲۸). بنابراین تغذیه از نانهای آلوده در دامهای پرواری فقط عوارض تنفسی و گوارشی ایجاد خواهد نمود که آن هم بستگی به تعداد کلنی های قارچی خواهد داشت که در این مطالعه در رقت یکصد هزار نیز *آسپرژیلوس* رشد نموده است. در یک مطالعه با تجربه روی ۳۶ نمونه غذایی تنها ۱۳ درصد نمونه ها آفلاتوکسیکوژنیک گزارش شدند (۲) در صورتی که در این مطالعه ۵۰ درصد نانها با وجود *آسپرژیلوس* فاقد آفلاتوکسین بودند و یا تقریباً ۵۰ درصد مواردی که آفلاتوکسین داشتند ۹/۵ درصد آنها فاقد *آسپرژیلوس* بودند یعنی اینکه نان حاوی *آسپرژیلوس* الزاماً حاوی آفلاتوکسین نبوده و یا فقدان *آسپرژیلوس* دلیل بر عدم آفلاتوکسین نمی باشد زیرا ممکن است پس از تولید سم به علت شرایط نامطلوب درجه حرارت و رطوبت *آسپرژیلوس* از بین رفته باشد. چنانچه محققان نتوانستند آفلاتوکسین را از نانهای حاوی *آسپرژیلوس* جدا نمایند (۳).

متغیر بودن کلنی های قارچی از ۱ تا ۴۵۰۰۰۰ کلنی در گرم نان نشانگر پراکندگی وسیع آلودگی قارچی مخصوصاً در نانهای کپک زده بوده است در هر صورت تعداد ۱۰۲ تا ۱۰۸ کلنی قارچی در گرم برای مواد غذایی سالم ذکر شده است (۲). وجود همبستگی بین شمارش کلنی آفلاتوکسین و *آسپرژیلوس* بیانگر این است که با افزایش تعداد کلنی تولید سم نیز افزایش خواهد یافت. این اصل نه تنها برای نان کپک زده بلکه شامل نان سالم نیز می گردد. این یافته در هیچ گزارش علمی ذکر نگردیده و نیازمند مطالعات تکمیلی است. ازآنجایی که این نانها بیشتر در تغذیه دامهای پرواری کاربرد دارد لذا ترس از تجمع آفلاتوکسین در کبد (۸،۲۶) و انتقال آن برای انسان بیشترمطرح بوده ولی از طریق گوشت کمتر خواهد بود مگر این که دام مبتلا به مسمومیت با آفلاتوکسین باشد.

در خاتمه با توجه به نتایج حاصله می توان گفت که آفلاتوکسین مخصوصاً B1 مترشحه از *آسپرژیلوس* در نانهای مصرفی سالم و کپک زده در دام از اهمیت زیادی برخوردار می باشد، عوامل آفلاتوکسین احتمالاً *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *نیجر* و *فومیگاتوس* بودند. همچنین رابطه مثبتی بین آفلاتوکسین، *آسپرژیلوس* و شمارش قارچی وجود دارد و سرانجام با اصلاح و حذف نانهای کپک زده از جیره دام انتقال آفلاتوکسین و عوارض آن از دام به انسان تقلیل خواهد یافت.

References

1. Aja-Nwachukwu, J. and Emejuaiwe, S.O. (1994): Aflatoxin producing fungi associated with Nigerian maize, Environ Toxicol and Water Quali. 9:17-23.
2. Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G. and Cabanes, F.J. (1994): Mycoflora and aflatoxin producting strains in animal mixed feeds. J. Food Protec. 57: 256- 258.
3. Abramson, D., Mills, J.T., Marguardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1997): Mycotoxins in fungal contaminated of samples animal feed from Western Canada. Canad. Vet. Res. 61:49-52.
4. Bailey, G.S., Price, R.L., Park, D.L. and Hendricks, J.D. (1994): Effect of ammoniation of aflatoxin B1 contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M1 content of cows milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. Food & Chem Toxicol. 32: 707-715.
5. Balaraman, N. and Gupta, H.K. (1990): Occurrence of aflatoxin in the livestock feeds of Sikkim. Indi. J. Anim. Nutrit. 7: 143-146.
6. Blood, D.C., Radostitis, O.M. and Henderson, J.A. (1989): Vet. Med. 7th ed. London, Bailliere Tindall. 957, 1309-1316.
7. Correa, B., Galhardo, M., Costa, E.O. and Sabino, M. (1997): Distribution of moulds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. Revista de Microbiologia, 28: 279-283.

8. Dass, R.S. and Arora, S.P. (1989): Distribution and excretion of aflatoxin (3H-AFB1) in lactating goats. Indi J. Anim Nutri. 6: 369-372.
9. El-Maraghy, S.S. (1996): Fungal flora and aflatoxin contamination of feed stuff. Samples in beida governorate. Libya, Folia Microbiologica, 41: 53-60.
10. Eqmond, H.P., Van Egmond, H.P., Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (1989): Current situation on regulation for mycotoxins, Mycotoxins & Phycotoxings, 88: 249-256.
11. Gaur, V.K. and Siradhana, B.S. (1989): Comparison of aflatoxin B1 formation by *Aspergillus flavus* on bread and uncooked grains of maize. Ind. Phytopatol. 42: 589-590.
12. Ghosh, M.K., Chhabra, A, Atreja, P.P. and Chopra, R. C. (1996): Effect of treating with propionic acid, sodium bisulfite and sodum hydroxide on the biosynthesis of aflatoxin on ground nut cake. Anim Feed Sci.Technol. 60: 43-49.
13. Hoogenboom, L.A., Tulliez, J., Gautier, J.P., Coker, R.D. and Melcion, J.P. (2001): Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation. Food Additives Contaminants. 18:47-58.
14. Ibrahim, M.M.K., Ahmed, F.H. and Guergues, S.N. (1990): Mycotoxic studies on some Egyption foodstuffs. Part 1. Effect of some storage factors on the occurrence of aflatoxins in some Egyptian onion bulbs. Grasas Aceites Selvilla, 41:149-153.
15. Jones, B.D. (1992): Methods of aflatoxin analysis, Tropi Prod, Institute, London.
16. Mitrofanov, A.V. (1989): Experimental aflatoxicosis in calves: Changes in the morphology of peripheral blood and bone marrow biopsy samples. Vet. Kiev, 64: 67-72.
17. Nikov, P.S., Bukharbaeva, A.S., Baimbetova, A.M. and Amireceva, N.T. (1991): Contamination with aflatoxins of milk and products in the southeast of Ka Zakhstan. Vo Prosy Pitaniya, 5: 72-74.
18. Oliveira, C.A., Germano, P.M., Bird, C. and Pinto, C. A. (1997): Immunological assessment of aflatotxin M1 in milk powder consumed by Infants in Sao Paulo, Brazil, Food Additives and Contaminants, 4: 7-10.
19. Padmanaban, V.D. (1989): Role of aflatoxins as immunomodulators. J. Toxicol, Toxin Reviews, 8: 239-245.
20. Pettersson, H., Holmberg, T., Larsson, K. and Kaspersson, A. (1989): Aflatoxins in acid- treated grain in Sweden and occurrence of aflatoxin M1 in milk. J. Sci. Food and Agriculture. 48: 411-420.
21. Pawaiya, R.V.S., Kali, C. and Charan, K. (1995): Experimental pulmonary aspergillosis in calves. Haematological and biochemical evaluation. Ind. Vet. J. 72: 131-134.
22. Prasad, B.N., Sinha, B.K., Quasim, A. and Sinha, A.K. (1989): Isolation and characterization of aflatoxigenic fungi from different foods. Cherion. 18: 63-66.
23. Rajendran, M.P., Sundararajan, S., Chennakesavalu, M., Charless, Y.S. and Sundararaj, A. (1992): Clinic-pathology of aflatoxin toxicity in cattle. Ind. Vet. J. 69: 115-117.
24. Rameshkumar, B., Rajassundaram, R.C. and Subramanian, A.C. (1988): Incidence of mycotoxin abortions in a dairy herd. Ind. J. Anim. Reprod. 9: 141-142.
25. Reddy, I.S. and Khan, M.M.H. (1994): Incidence of mycotic mastitis in crossbred cows. Cherion, 23: 82-84.
26. Saad, N.M. and Zaky, Z.M. (1995): Incidence of aflatoxicogenic molds and aflatoxins in infant's milk powder. Assiut Vet. Med. J. 32:157-163.
27. Sabino, M., Purchio, A. and Milanez, T.V. (1995): Aflatoxins B1, M1 and aflatoxicol in tissues and urine of calves receiving aflatoxin. Food Additives & Contaminants. 12: 467-472.
28. Sarfati, J., Jensen, H.E. and Latge, J.P. (1996): Route of infections in bovine aspergillosis, J. Med. Vet. Mycol. 34: 379-383.
29. Shehata, N.A., Sadek, M.A., Darwish, N., Abou-Gabal, M. and Hassanien, N.Y. (1991): Studies on the chmical nature of the metabolites of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* contaminated. The Egyptian Corn, 29: 847-859.
30. Shoukry, Y.M.R., Zaki, N., Kheader, E.E. and El-Deeb, S.A. (1992): Effect of some amino acids on the growth rate and aflatoxins production by aspergilli. Egyptian J. Dairy Sci. 20:101-110.
31. Simpson, V.R., Cramvel, M.P., Johnson, C., Dyson, D. and Gibbens, J.C. (1994): Necrotic enteritis of unknown aetiology in suckler calves, Vet. Rec. 134:479.
32. Singh, G., Sidhu, S.S., Jand, S.K., Singla, V.K. and Gurcharan, S. (1993): Mycoflora in uterine swabs of repeat breeder cows and buffaloes, Ind. J. Anim. Sci. 63: 528-529.
33. Sinha, A.K., Gajendra, P. and Prasad, G. (1994): Monitoring and identification of mycotoxins in marketed bakery bread during monsoon. Ind. Phyto-pathol. 47: 164-167.
34. Skrinjar, M., Stubblefield, R.D., Vujicie, I.F. and Stojanovic, E. (1992): Distribution of aflatoxin producing moulds and aflatoxins in dairy cattle feed and raw milk. Acta Microbiologica Hungarica. 39: 175-179.
35. Stapelfeldt, H. (1994): No reason for an aflatoxin panic. Maelkeritidende, 107: 316-317.
36. Stubblefield, R.D., Greer, J.I., Shotwell, O.L. and Aikens, A.M. (1991): Rapid immunochemical screening method for aflatoxin in human and animal urine. J. Association of Official Analytical Chemists. 74: 530-532.
37. Viljoen, C.R., Holy, A.V., Von-Holy, A. (1997): Microbial population associated with commercial bread production. J. Basic Microbiol. 37: 439-444.