Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Assessment of *Lactobacillus Delbruekii* and *Bifidobacterium Animalis* Abilities to Absorb Aflatoxin M_1 from Milk

Maryam Namvar Rad[1], Vadood Razavilar[1]*, Seyed Amir Ali Anvar[1], Behrouz Akbari-Adergani[2]

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

Article Information

Article Subject:
Food Microbiology

DOI:

Corresponding author:
Vadood Razavilar
Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email:
vazneh2245@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Microbial detoxification is one of the methods for eliminating of aflatoxins, including aflatoxin M_1. Reports indicate that some strains of lactic acid bacteria family through surface adsorption of aflatoxin in their cellwall can be effective in removing them and as a primer culture. In this study, the ability of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus delbrueckii* in the adsorption of aflatoxin M_1 in skim milk was assessed.

Materials and Methods: For this purpose, about 10^8 and 10^9 cfu/ ml of *B. animalis* (Lactis) and *L. delbrueckii* (Blegaricus) were inoculated into skim milk without aflatoxin M_1. Then, the samples were spiked by aflatoxin M_1 in concentrations of 0.25, 0.5 and 0.75 ng/ ml. The concentration of the aflatoxin reside in supernatant of milk samples after different storage times (0.5, 1, 2 and 24 h) and temperatures of 4 and 37°C was measured by ELISA method, and the results were confirmed by HPLC.

Results: The results showed that the highest amount of aflatoxin M_1 removal was respectively related to *B. animalis* (60 ± 2.5%) with a concentration of 10^8 cells/ ml and *L. delbrueckii* (58.5 ± 2.5%) with a concentration of 10^9 cells/ ml and a concentration of 0.5 ng/ml poison at 37°C for 30 minutes. By comparing the concentration of both bacteria, it also appeared that the *B. animalis* concentration at 37°C and *L. delbrueckii* concentration at 4°C were more effective. Also, the results indicate that the ability of bacteria to reduce the amount of poison in half an hour in milk samples with values of 0.75 ng/ml poison at 4°C and 0.5 ng/ml poison at 37°C is higher; but over time, contaminated milk at a concentration of 0.75 ng/ml poison compared to 0.5 ng/ml poison showed an increased amount of aflatoxin removal.

Calclusion: *B. animalis* and *L. delbrueckii* can act as two useful probiotics to reduce the harmful effects of aflatoxin M_1.

Keywords: Aflatoxin M_1, Probiotic, Detoxification, *B. animalis*, *L. delberueckii*, Skim milk

Received: 2018/11/16 Accepted: 2019/04/10 Available online: 2019/06/20

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Namvarrad M, Razavilar V, Anvar S A A, Akbari Adargani B. Assessment of Lactobacillus Delbruekii and Bifidobacterium Animalis Abilities to Absorb Aflatoxin M1 from Milk. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (1) :44-55

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ - شماره ۱ - فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی قابلیت باکتری‌های *Lactobacillus Delbrueckii* و *Bifidobacterium Animalis* در جذب آفلاتوکسین M_1 از شیر تلقیح دو نوع پروبیوتیک برای کاهش سمیت‌زدایی از شیر

مریم نامور راد[۱]، ودود رضویلر[۱*]، سید امیرعلی انوار[۱]، بهروز اکبری آدرگانی[۲]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۵

پذیرش:۱۳۹۸/۰۱/۲۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۳/۳۰

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM1398;13(1): 44-55

نویسندهٔ مسئول:

ودود رضویلر

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک:

vazneh2245@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: توکسین‌زدایی میکروبی یکی از روش‌های حذف آفلاتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین M_1 محسوب می‌شود. گزارش‌ها نشان می‌دهد برخی از سویه‌های خانواده اسید لاکتیک از طریق جذب سطحی آفلاتوکسین‌ها به دیواره سلولی خود، می توانند در حذف آنها و به عنوان یک نوع کشت آغازگر مؤثر باشند. در این تحقیق، توانایی باکتری‌های *B. animalis* و *L. delbrueckii* در میزان جذب آفلاتوکسین M_1 از شیر بررسی شد.

مواد و روش کار: بدین منظور، حدود 10^8 و 10^9 سلول باکتری بر میلی‌لیتر از باکتری‌های *B. animalis* زیرگونه لاکتیس و *L. delbrueckii* زیرگونه بلگاریکوس به شیر بدون چربی فاقد آفلاتوکسین M_1 تلقیح شد. سپس نمونه‌ها با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر آفلاتوکسین M_1 آلوده شدند. غلظت آفلاتوکسین باقی‌مانده در سوپرناتانت نمونه‌های شیر در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۲۴ ساعت و دماهای ۴ و ۳۷ درجه سلسیوس توسط روش الایزای رقابتی تعیین و نتایج توسط HPLC تأیید شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بیشترین میزان حذف آفلاتوکسین M_1 به ترتیب مربوط به *B. animalis* (۵/۲ ± ۶۰ درصد) با غلظت 10^8 سلول باکتری بر میلی‌لیتر و *L. delbrueckii* (۵/۲ ± ۵۸ درصد) با غلظت 10^9 سلول باکتری بر میلی‌لیتر و غلظت ۰/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر سم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه بود. با مقایسه غلظت هر دو باکتری نیز چنین به نظر رسید که غلظت باکتری *B. animalis* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و غلظت باکتری *L. delbrueckii* در دمای ۴ درجه سلسیوس مؤثرتر عمل کرده‌اند. همچنین، نتایج حاکی از این است که قابلیت باکتری‌ها در کاهش میزان سم طی نیم ساعت در نمونه های شیر با مقادیر ۰/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر سم در دمای ۴ درجه سلسیوس و مقادیر ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر سم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بیشتر است؛ اما با گذشت زمان، شیر آلوده به غلظت ۰/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر سم نسبت به ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، مقدار حذف آفلاتوکسین بیشتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: *B. animalis* و *L. delbrueckii* می‌توانند به عنوان دو پروبیوتیک سودمند در کاهش اثرات مخرب آفلاتوکسین M_1 عمل کنند.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین M_1، پروبیوتیک، سمیت‌زدایی، *B. animalis*، *L. delbrueckii*، شیر بدون چربی

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها، متابولیت‌های سمی تولید شده توسط قارچ ها هستند که به طور عمده توسط قارچ‌های ساپروفیت در حال رشد روی برخی از مواد غذایی و خوراک دام تولید می‌شوند. آلودگی مایکوتوکسین در مواد غذایی، تهدید بزرگی برای سلامت انسان، حیوانات و تجارت بین‌المللی محسوب می‌شود (۱). آفلاتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها هستند و عمدتاً توسط برخی از گونه‌های جنس آسپرژیلوس مانند *Aspergillus flavus parasiicus* و *Aspergillus nomius* تولید می‌شوند (۲). آفلاتوکسین‌ها ممکن است به طور مستقیم از طریق بلعیدن محصولات آلوده یا به طور غیرمستقیم توسط مصرف مواد

www.SID.ir

Archive of SID

غذایی مشتق‌شده از مواد اولیه آلوده، مانند شیر و فرآورده‌های لبنی حاصل از دام آلوده وارد بدن انسان شوند (۳).

سویه‌های مسمومیت‌زای آسپرژیلوس به طور معمول دو یا سه نوع آفلاتوکسین را سنتز می‌کنند که یکی از آن‌ها به طور ثابت آفلاتوکسین B_1 است. آفلاتوکسین B_1 سمی قوی است و در گروه ترکیبات سرطان‌زا قرار دارد (۴). هنگامی که گاو شیری، غذای آلوده به آفلاتوکسین دریافت می‌کند، این توکسین در کبد متابولیزه می‌شود. آفلاتوکسین B_1 و B_2 به مشتقات ۴- هیدروکسی به نام‌های M_1 و M_2 تبدیل و از شیر دفع می‌شوند. غلظت آفلاتوکسین M_1 تولیدی در شیر گاو نسبت به آفلاتوکسین M_2 بیشتر و سمیت آن نیز به مراتب بیشتر است (۵). همچنین، ۱ تا ۳ درصد از آفلاتوکسین B_1 اولیه موجود در خوراک دام به صورت آفلاتوکسین M_1 در شیر تبدیل می شود. اگر مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین B_1 مصرف شوند، ۲ تا ۳ روز پس از هضم، آفلاتوکسین M_1 در شیر ظاهر می شود و می‌تواند باعث به خطر افتادن سلامت دام‌ها و انسان و بروز انواع بیماری‌ها نظیر سرطان، نقص در سیستم ایمنی بدن و ایجاد ناهنجاری‌های جنینی شود (۶-۹). با توجه به اینکه شیر و فرآورده‌های لبنی مورد مصرف روزانه اکثریت قریب به اتفاق مردم است، توجه به ایمنی و سلامت این فرآورده‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. حضور آفلاتوکسین M_1 در این فرآورده‌ها در مقادیر بیشتر از حد استاندارد، برای مصرف‌کننده مخاطره‌آمیز است.

نتایج تحقیقات مختلف در زمینهٔ اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر مناطق مختلف ایران نشان‌دهندهٔ آن است که شیر کمابیش به این سم آلوده است (۱۰، ۱۱). در اغلب کشورها قوانین سختی به منظور محدودکردن حضور سم آفلاتوکسین در مواد غذایی و محصولات تجاری وضع شده است؛ با این وجود حضور چنین سمومی در مواد غذایی اجتناب‌ناپذیر است. بر اساس قوانین وضع شده توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا، حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر ۰/۵ قسمت در بیلیون تعیین شده است (۱۲). این مقدار در کشورهای اروپایی کمتر است؛ به طوری که حداکثر سطح قابل قبول آفلاتوکسین M_1 در شیر، ۰/۰۵ قسمت در بیلیون است (۱۳). در حال حاضر، حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر خام، انواع شیر حرارت‌دیده و طعم دار در ایران، ۰/۱ قسمت در بیلیون تعیین شده است (۱۴). اهمیت شیر و فراورده‌های لبنی در تغذیه انسان از یک سو و خطرات بالقوه ناشی از وجود سم آفلاتوکسین M_1 در این مواد غذایی از سوی دیگر، نیاز به روشی مناسب برای غیرفعال کردن توکسین را آشکار می‌سازد. با افزایش دانش و آگاهی از این موضوع که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند به طور بالقوه برای سلامت انسان و دام خطرآفرین باشند، تلاش برای حذف کامل یا کاهش میزان آفلاتوکسین در مواد غذایی مضاف شده است (۹).

استفاده از بسیاری از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای حذف مایکوتوکسین‌ها از مواد غذایی آلوده به دلیل مشکلات مربوط به مباحث ایمنی و امکان از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای محصول، کارایی کم و هزینه زیاد آن‌ها محدود شده است. این دلایل سبب انجام تحقیقاتی گسترده به منظور جایگزینی روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای حصول به روش‌های ایمن، کارا و مطلوب شده است. در این راستا، استفاده از روش‌های بیولوژیکی یکی از گزینه‌های مناسب است (۱۵). نتایج تحقیقات نشان داده است یکی از مهم‌ترین شیوه‌ها در کاهش بروز اختلالات مربوط به سم یا جلوگیری از ورود آن، استفاده از باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک است (۱۶)؛ چرا که برخی از سویه‌های باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک از طریق جذب سطحی آفلاتوکسین‌ها به دیواره سلولی (عمدتاً پروتئین و پپتیدوگلیکان)، می‌توانند در حذف آنها مؤثر باشند. از سویی دیگر برخی از این میکروارگانیسم‌ها به عنوان پروبیوتیک شناخته شده‌اند و سبب افزایش ارزش غذایی محصول می‌شوند (۱۷، ۱۸).

در بین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک شناخته‌شده، دو سویه *Lactobacillus* و *Bifidobacterium*، معمول‌ترین گونه‌های باکتریایی در زمینه تولید محصولات پروبیوتیک هستند و انتخاب بسیار خوبی برای کاهش آفلاتوکسین‌های موجود در مواد غذایی به خصوص شیر به شمار می‌آیند (۱۹). باکتری *B. animalis* زیرگونه لاکتیس، یک باکتری گرم مثبت، غیربیماری‌زا و دارای ویژگی‌هایی چون تأثیرنگذاشتن در ظاهر، طعم و مزه غذا است. از طرفی این باکتری می‌تواند تا زمان مصرف محصول نهایی، در فرآورده زنده و باقی بماند (۲۰). باکتری *L. delbrueckii* زیرگونه بلگاریکوس، یک باکتری گرم مثبت و غیر بیماری‌زا است که به علت ویژگی‌های سمیت‌زدایی و بهبود کارکرد سیستم ایمنی کاربرد دارد (۲۱). مهم ترین مکانیسم‌هایی که این باکتری‌ها به وسیله آن می‌توانند موجب ارتقای سلامت انسان شوند، تولید اسیدهای آلی، پراکسیدها و باکتریوسیدها و رقابت با باکتری‌های مضر و بیماری‌زای روده‌ای برای تصاحب جایگاه‌های اتصال روی موکوس است (۲۲).

در این پژوهش، با توجه به مطالب ذکرشده، سعی بر آن شد که اثر دو سویهٔ *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* بر کاهش میزان سم آفلاتوکسین M_1 از شیر در شرایط *in vitro* متأثر از میزان غلظت باکتری و سم، دما و زمان ارزیابی شود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

تهیه میکروارگانیسم‌ها و آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی

میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده شامل *B. animalis* زیرگونه لاکتیس (PTCC 1736) و *L. delbrueckii* زیرگونه بلگاریکوس (PTCC 1737) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری شدند. برای آماده سازی سوسپانسیون میکروبی، ابتدا میکروارگانیسم‌های لیوفیلی شده در محیط کشت MRS broth(Sigma Aldrich) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی فعال و تکثیر شدند تا زمانی که فاز لگاریتمی (۸ و ۹ cfu log/ml) به دست آمد. کشت‌های مذکور توسط سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، با استفاده از محلول بافر فسفات (Sinagene, Iran) شستو شو شدند و رسوب میکروبی جداسازی شد. غلظت باکتری‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech Inc) در طول موج ۶۰۰ نانومتر مطابق محلول استاندارد مک فارلند ۳ (در این کدورت تعداد باکتری‌های زنده 10^9 cfu/ml بود) تنظیم شد (۲۳). سلول‌های مرده نیز با استفاده از بخار ۱۰۰ درجه به مدت ۱ ساعت تهیه شدند. برای تهیه رقت 10^8 نیز از رقت 10^9 استفاده شد و به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی صورت گرفت (۲۴).

آماده‌سازی شیر

برای تهیه رقت‌های 10^8 و 10^9 از سلول *B. animalis* و *L. delbrueckii* در میلی‌لیتر شیر بدون چربی، از آزمون‌هایHPLC و ELISA استفاده شد. برای هر تکرار در مجموع حدود ۵۰ گرم از پودر شیر بدون چربی (Merck, Germany) با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسید، سپس به مدت ۵ دقیقه کاملاً مخلوط و حل شد. در مرحله بعد برای ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای هر غلظت سم در آزمون HPLC و ELISA، به ترتیب حدود ۱۷۶ میلی‌لیتر و ۲۰ میلی‌لیتر از شیر تلقیح‌شده استفاده شد (۲۵).

تهیه محلول آفلاتوکسین M_1

آفلاتوکسین M_1 تولیدشده از *Aspergillus flavus* (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول استاندارد در استونیتریل) از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich) خریداری شد. پس از تعیین مقدار به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتری (Ultrospec 2000)، غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آن در آب و استونیتریل به نسبت ۷۵:۲۵ آماده شد. به منظور آلوده‌کردن نمونه‌های شیر نیز، محلول آفلاتوکسین M_1 با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

در آزمون ELISA، ۱۹۲ لوله اپندروف برای سه غلظت سم (غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۲۴ ساعت و در آزمون HPLC، ۹۶ لوله اپندروف برای دو غلظت سم (۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در زمان‌های ۰/۵، ۱ و ۲ ساعت استفاده شد (۲۵).

آلودگی شیر به آفلاتوکسین M_1 و تلقیح باکتری

ابتدا ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی در شیر با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته و رسوب مانده در ته لوله دو بار با آب مقطر استریل شسته شد. در مرحله بعد، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به رسوب ها اضافه شد و درنهایت به ۹ میلی‌لیتر شیر آلوده به آفلاتوکسین اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. پس از آن در دماهای ٤ و ۳۷ درجه سلسیوس و زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۲۴ ساعت انکوبه شد. لوله ها مجدداً با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن برای آنالیز آفلاتوکسین استفاده شد (۲۶).

آلوده‌کردن نمونه (Spike)

به ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه شیر، به ترتیب مقادیر ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ ppt از استاندارد ذخیره (stock) اضافه شد و پس از مشتق سازی، نمونه‌های آلوده (Spike) با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. از نمونه های آلوده در معتبرسازی روش، تعیین صحت و دقت استفاده شد.

روش الایزا

کیت خریداری‌شده در این آزمون، ساخت شرکت یوروپروکسیما (Euro Proxima, Netherlands) و روش به‌کاررفته بر پایه آزمون رقابتی مستقیم بود (۲۷). در این تحقیق از میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد که به ترتیب در ردیف اول از چاهک A نمونه کنترل منفی و از چاهک B تا H غلظت‌های مختلف از نمونه کنترل مثبت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر منتقل شد. در ردیف دوم از چاهک‌های میکروپلیت، نمونه‌های مورد آزمایش به میزان ۱۰۰ میکرولیتر منتقل شدند. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول داخل میکروپلیت تخلیه و سه بار با مایع شست‌وشوی کیت، شسته شد. میکروپلیت به‌شدت تکان داده شد تا مایعی در آن نمانده باشد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مجدداً مایع داخل میکروپلیت تخلیه و سه بار شست‌وشو داده شد. سپس به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا اضافه شد و به مدت نیم ساعت در یک اتاق تاریک قرار گرفت و به همه چاهک‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

بعد از این زمان، ۱۰۰ میکرولیتر محلول بازدارنده اضافه شد. درنهایت عدد جذب آن‌ها با فیلتر ۴۵۰ نانومتری دستگاه الایزا (Model EL × 808; Bio Tek USA) خوانده شد (۲۸، ۲۹).

روش HPLC

از دستگاه HPLC (Breeze Seprations Module; Waters, USA) که مجهز به پمپ‌های دوتایی حلال و یک دریچه سوئیچی متصل به ستون‌های فاز معکوس بود، استفاده شد. برای اندازه گیری میزان آفلاتوکسین M_1 باقی‌مانده در مایع رویی، از ستون های ایمونوافینیتی (با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) استفاده شد که به شناساگر فلور سنس خودکار (Breeze 417) با طول موج‌های برانگیختگی و نشر ۳۶۵ و ۴۶۵ نانومتر با فاز معکوس (Performance RP-18Cmade of monolithicsilica) و حفاظ ستون (Preformance RP-18C 102129,Merck endcapped guardcolumn)، مجهز بود. غلظت مربوطه با نرم افزار Empower محاسبه شد. فاز متحرک شامل سه بخش آب/ استونیتریل/ متانول (۶۰:۲۰:۲۰V/ V/ V) با سرعت جریانی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق ۱۵۰ میلی‌لیتری بود.

کروماتوگرام‌ها در یک گراف با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و عرض پیک ۰/۴ ذخیره شد. درنهایت درصد نهایی حذف آفلاتوکسین سنجیده شد (۳۰). درصد آفلاتوکسینی که به باکتری باند شد از طریق معادله زیر (۳۱، ۳۲) محاسبه شد:

$$\text{AFM}_{\text{(درصد)}} = 1 - \frac{AFM1 \text{ پیک نمونه}}{AFM1 \text{ پیک کنترل سم}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی فرض برابری اختلاف واریانس‌های گروه از آزمون کرویت ماچلی استفاده شد. همچنین، به دلیل معنی‌دارنشدن آزمون ماچلی، از آزمون فرض کرویت در بخش آزمون های درون‌گروهی به عنوان آزمون های اصلاحی آزمون ماچلی استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، محدوده بازیافت به‌دست‌آمده بین ۸۳/۶ تا ۸۷/۸ درصد و انحراف معیار نسبی بین ۰/۹ تا ۲/۸ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج ارزیابی صحت روش بر اساس بازیافت (Recovery)

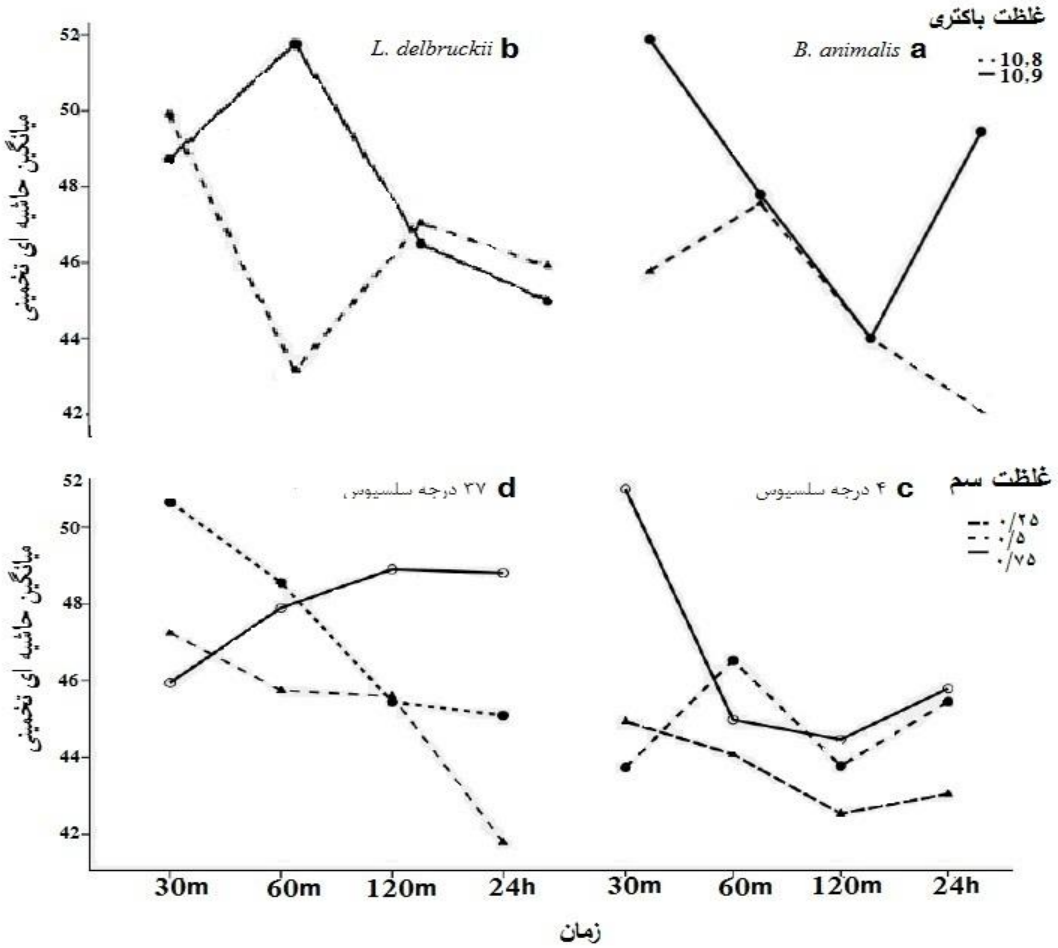
درصد انحراف معیار نسبی بازیافت	میانگین درصد بازیافت ± انحراف معیار	نمونه‌های آلوده به‌دست‌آمده (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	نمونه‌های آلوده (Spike) /(ppt
۱/۱	۸۳/۷±۰/۹	۰/۲۵	۵۰۰
۲/۸	۸۷/۸±۲/۴	۰/۵	۷۰۰
۰/۹	۸۵/۶±۰/۸	۰/۷۵	۱۰۰۰

نتایج به‌دست‌آمده از روش الایزا در نمودار ۱ با مطالعه برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای نشان داد رقت 10^9 باکتری *B. animalis* در دقیقه ۳۰، بیشترین میزان حذف سم آفلاتوکسین (۵۲±۲/۰۰) را نشان داد و اثر آن پس از ۲۴ ساعت، در میزان ۵۰±۲/۰۰ تثبیت شد. در صورتی که باکتری *L. delbruckii* در رقت 10^9 در دقیقه ۶۰ بیشترین میزان حذف سم آفلاتوکسین (۵۲±۲/۰۰) را نشان داد و اثر آن پس از گذشت ۲۴ ساعت در میزان ۴۵±۲/۰۰ تثبیت شد.

با مطالعه برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثرات متقابل غلظت سم، دما، زمان (نمودار ۱) مشخص شد شیر آلوده با غلظت سم ۰/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر در دقیقه ۳۰ با دمای ٤ درجه سلسیوس، بیشترین میزان حذف سم آفلاتوکسین (۵۶±۳/۰۰) را نشان داد. در صورتی که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با همین غلظت سم، بیشترین درصد حذف سم آفلاتوکسین در مقدار ۵۱±۳/۰۰ طی گذشت ۲۴ ساعت دیده شد. همچنین، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بیشترین میزان افزایش حذف آفلاتوکسین در شیر آلوده به سم با غلظت ۰/۵ نانو گرم در میلی‌لیتر در دقیقه ۳۰ مشاهده شد؛ اما طی ۲۴ ساعت، شیر آلوده به سم با غلظت ۰/۷۵ نانوگرم نسبت به ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، میزان حذف آفلاتوکسین بیشتری را نشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID

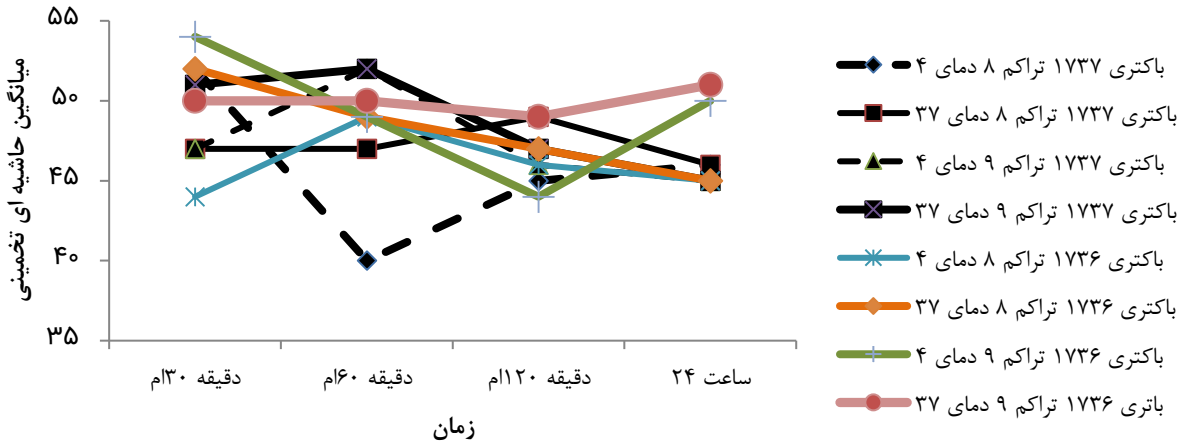


نمودار ۱. برآورد میانگین حاشیه‌ای اثر متقابل نوع×تعداد×زمان باکتری‌های *B. animalis* و *L. delbruckii* و برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثر متقابل غلظت سم×دما×زمان در دماهای ۴ و ۳۷ درجه سلسیوس

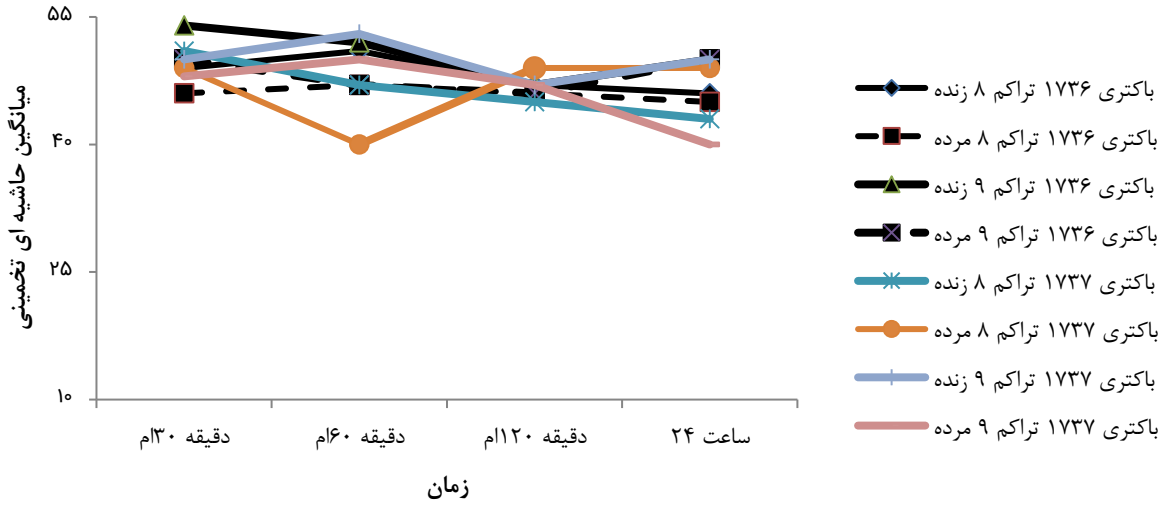
از سویی دیگر، با مطالعه برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثرات متقابل نوع باکتری، تعداد باکتری، دما، زمان (نمودار ۲) و مقایسه آن با نمودار ۱ (نوع باکتری ،تعداد باکتری، زمان) مشاهده شد که باکتری *B. animalis* در دقیقه ۳۰ با رقت 10^9 و دمای ٤ درجه سلسیوس، بیشترین درصد حذف سم آفلاتوکسین (۵۴±۳/۰۰) را نشان می دهد که این میزان حذف سم، ۲ درصد بیشتر از حالت دخالت‌نکردن دما در سنجش داده‌ها در زمان مشابه بود، سپس با کاهشی ملایم در دقیقه ۶۰ و ۱۲۰ به ترتیب به ۴۹±۳/۰۰ و ۴۴±۳/۰۰ درصد رسید. با گذشت ۲۴ ساعت، درصد حذف سم آفلاتوکسین با ۶ درصد افزایش، در میزان ۵۰±۳/۰۰ تثبیت شد. برای باکتری *L. delbruckii* در شرایط مشابه، بیشترین میزان کاهش درصد سم آفلاتوکسین به ترتیب در مقادیر ۵۱±۳/۰۰ درصد در دقیقه ۳۰، ۵۲±۳/۰۰ درصد در دقیقه ۶۰، ۴۷±۳/۰۰ درصد در دقیقه ۱۲۰و ۴۵±۳/۰۰ درصد طی گذشت ۲۴ ساعت ثبت شد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲. برآورد میانگین حاشیه‌ای اثر متقابل نوع باکتری×غلظت باکتری×دما×زمان *B. animalis* و *L. delbruckii*



نمودار ۳. برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثر متقابل نوع باکتری×تعداد باکتری×حیات باکتری×زمان *B. animalis* و *L. delbruckii*

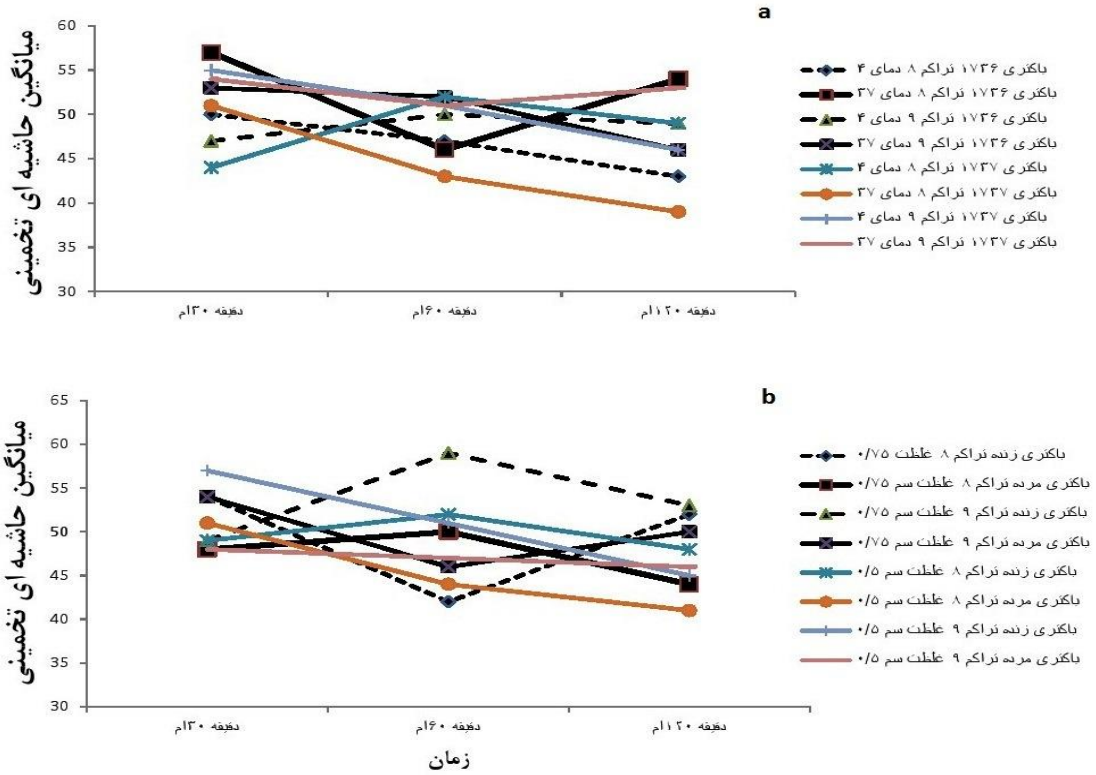
در بررسی اثرات متقابل نوع باکتری، تعداد باکتری، حیات باکتری و زمان (نمودار ۳) مشاهده شد که بیشترین میزان حذف سم آفلاتوکسین مربوط به رقت 10^9 باکتری زنده *B. animalis* در دقیقه ۳۰ و در باکتری زنده *L. delbruckii* در دقیقه ۶۰ است.

در آزمون HPLC، با مطالعه برآورد میانگین حاشیه‌ای اثر متقابل نوع باکتری، تعداد باکتری، دما و زمان (نمودار ۴-a) مشخص شد باکتری *B. animalis* در دقیقه ۳۰ با رقت 10^8 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بیشترین میزان حذف سم آفلاتوکسین را نشان داد (۵۷±۳/۶) و این میزان با کاهش شدید ۱۱ درصدی در دقیقه ۶۰ به ۴۶±۳/۵ رسید؛ اما با گذشت زمان در دقیقه ۱۲۰ با یک افزایش ۸ درصدی در ۵۴±۳/۶ تثبیت شد. همچنین، باکتری *L. delbruckii* در رقت 10^9 و دمای ۴ درجه سلسیوس، بیشترین میزان حذف سم را نشان داد که در زمان ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه مقدار آن به ترتیب در حدود ۵۵±۳/۶، ۵۱±۳/۵ و ۴۶±۳/۶ درصد ثبت شد.

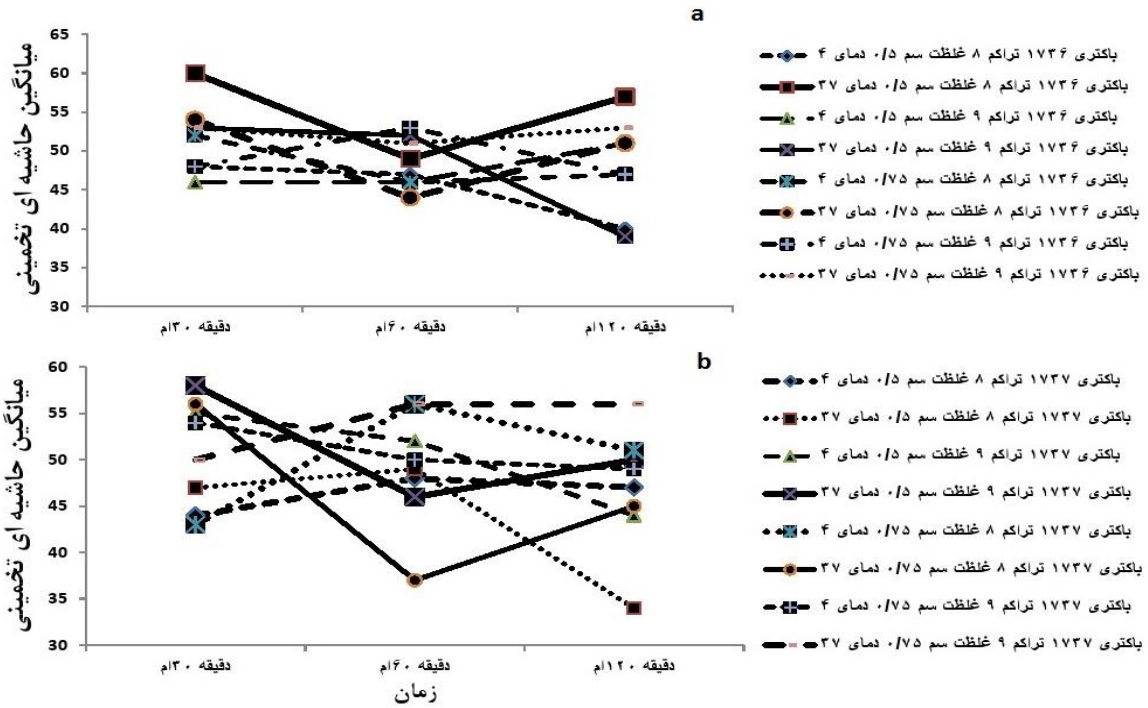
برآورد میانگین حاشیه‌ای اثر متقابل غلظت سم، تعداد باکتری، حیات باکتری و زمان (نمودار ۴-b) نیز نشان داد بیشترین درصد حذف سم آفلاتوکسین در دقیقه ۶۰ توسط رقت 10^9 باکتری زنده و غلظت سم ۰/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر است (۵۹±۳/۵)؛ که این میزان در دقیقه ۱۲۰ با کاهش ۶ درصدی به ۵۳±۳/۵ رسید. بنابراین، بدون در نظر گرفتن هریک از دو گونهٔ باکتری بررسی‌شده، چنین به نظر می‌رسد که در بین باکتری‌های مرده و زنده، بیشترین میزان حذف سم در غلظت ۰/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و در رقت 10^9 باکتری در ۳۰ دقیقه اول (برای باکتری‌های مرده) و طی ۶۰ دقیقه (برای باکتری‌های زنده) صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۴. برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثر متقابل نوع باکتری×تعداد باکتری×دما×زمان *B. animalis* و *L. delbruckii* (a)؛ برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثر متقابل غلظت سم×تعداد باکتری×حیات باکتری×زمان (b)



نمودار ۵. برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثر متقابل نوع باکتری×تعداد باکتری×غلظت سم×دما×زمان *B. animalis* (a)؛ *L. delbruckii* (b)

نتایج حاصل از نمودار ۵ نشان داد باکتری *B. animalis* با رقت 10^8 و محیط سم با غلظت ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، در دقیقه ۳۰ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بیشترین میزان حذف سم آفلاتوکسین را دارد (۵/۲±۶۰)، که در دقیقه ۶۰ با کاهش شدید

www.SID.ir

Archive of SID

۱۱ درصدی به ۴/۹±۴۹ رسید. سپس در دقیقه ۱۲۰ با افزایش قابل توجه ۸ درصدی در میزان ۵/۱±۵۷ درصد تثبیت شد. میانگین درصد حذف طی دوره تحقیق معادل ۵/۶±۵۵/۳ بود (نمودار a-۵). بر اساس نمودار b-۵ نیز بیشترین کاهش حذف سم آفلاتوکسین M_1 توسط باکتری *L. delbruckii* با رقت 10^9 و غلظت سم ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر در دقیقه ۳۰ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده شد (۵/۲±۵۸ درصد).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر به روش الایزا نشان داد باکتری *L. delbruecii* قادر است سم آفلاتوکسین M_1 موجود در محیط شیر را بدون در نظر گرفتن دو عامل دمای ۴ و ۳۷ درجه سلسیوس و در روش HPLC بدون در نظر گرفتن دو رقت 10^9 و 10^8 باکتری و یا دماهای مذکور، به طور قابل توجهی حذف کند. با توجه به اینکه استفاده از دمای ۴ درجه سلسیوس در نگهداری و توزیع شیر کاربرد فراوانی دارد، بررسی حذف آفلاتوکسین M_1 به روش HPLC نشان داد باکتری *L. delbruecii* تحت تأثیر غلظت سم و در دمای ۴ درجه سلسیوس توانمندی بیشتری نسبت به باکتری *B. animalis* برای حذف آفلاتوکسین M_1 در روش الایزا دارد. Bovo و همکاران (۲۰۱۳) (۳۲) نشان دادند در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، تفاوتی بین باکتری‌های *L. delbruecii* (۹/۷±۳۳/۵۴) و *B. animalis* (۴/۰۱±۳۲/۵) در اتصال به سم آفلاتوکسین M_1 در شیر وجود ندارد و صرفاً *B.animalis* (۳/۳۱±۳۵/۷۵) قادر است در دمای ۴ درجه سلسیوس بیش از باکتری *L. delbruecii* (۵/۲۶±۱۳/۵۱)، منجر به حذف آفلاتوکسین M_1 شود.

Corassin و همکاران (۲۰۱۳) (۲) نیز گزارش دادند قدرت حذف آفلاتوکسین M_1 به کمک *B.animalis* و *L.delbruecii* در زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه از شیر به ترتیب ۲/۳±۱۱/۵ و ۴/۴±۱۱/۷ درصد است که البته این میزان حذف با کمک مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و در زمان‌های مشابه به ۰/۳±۹۰/۳ و ۰/۷±۹۲/۷ درصد می تواند افزایش یابد. در واقع نتایج آن‌ها نشان داد عوامل محیطی نظیر دما، غلظت سم و تعداد باکتری به مراتب تأثیر بیشتری دارند. از طرفی دیگر، روش اندازه‌گیری HPLC، درصد حجم بیشتری از کاهش سم را نسبت به روش الایزا نشان داد. در واقع اثر گذاری باکتری *B. animalis* در کاهش سم آفلاتوکسین از محیط کشت آلوده نه‌تنها طی ۳۰ دقیقه اول، بلکه در زمان ۱۲۰ دقیقه نیز نسبت به باکتری *L. delbruecii*، کارایی بیشتری داشته است. با کاهش رقت باکتری *B. animalis* از 10^9 به 10^8 cfu/ml، توانمندی باکتری *B. animalis* در کاهش سم آفلاتوکسین از محیط کشت آلوده افزایش یافت. همچنین، با افزایش دما از ۴ به ۳۷ درجه سلسیوس، توانمندی باکتری در کاهش سم آفلاتوکسین از محیط کشت آلوده نیز افزایش یافت.

با کاهش غلظت سم آفلاتوکسین از ۰/۷۵ به ۰/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر در شیر، توانمندی باکتری *B. animalis* در کاهش سم آفلاتوکسین M_1 افزایش می‌یابد. Haskard و همکاران (۲۰۰۱) (۳۳) گزارش کردند حذف آفلاتوکسین شدیداً به نوع باکتری (دیواره سلولی و پاکت سلولی) و تعداد آن بستگی دارد و گونه‌های مختلف می‌توانند به صورت زنده و مرده، ویژگی‌های مختلفی را نشان دهند؛ به طوری که باکتری‌های مرده در اغلب گونه‌ها، توانمندی بیشتری در حذف آفلاتوکسین دارند که این ویژگی بر خلاف نتایج ما در روش HPLC بود. El-Nezami و همکاران (۱۹۹۸) (۳۴) نیز گزارش دادند باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی اثر بیشتری در حذف آفلاتوکسین دارند. همچنین آنها دریافتند بر روی مولکول آفلاتوکسین M_1 یک گروه هیدروکسیل اضافه وجود دارد که باعث افزایش قطبیت و حلالیت بیشتر در محلول می‌شود و گاهی می‌تواند در روش‌هایی با دقت کمتر، مشکل ایجاد کند. شاید یکی از دلایل کمتربودن مقادیر اندازه‌گیری با روش الایزا نسبت به روش HPLC همین موضوع باشد.

در این مطالعه، میزان دقت شمارش حذف آفلاتوکسین در روش الایزا نسبت به روش HPLC کمتر بود. این موضوع می‌تواند ناشی از اتصال آفلاتوکسین در سطحی از دیواره سلول باکتری باشد یا اینکه مقدار کمی از آن به دیواره سلولی باکتری نفوذ کرده باشد که قابل شناسایی توسط آنتی‌بادی نبوده است (۳۵). Serrano-Nino و همکاران (۲۰۱۳) (۳۶) نیز میزان حذف آفلاتوکسین M_1 از شیر را توسط باکتری *B. bifidum* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۲/۶±۴۵/۱۷ درصد گزارش کردند که در مقایسه با تحقیق حاضر به مراتب کمتر از میزان حذف سم توسط باکتری *B. animalis* به روش HPLC (۵/۲±۶۰ درصد) بود، اما از حذف توسط باکتری *L. delbruecii* (۵/۲±۵۵ درصد) بیشتر بود. در مطالعه حیات باکتری، Elsanhoty و همکاران (۲۰۱۴) (۲۶) دریافتند درصد تأثیر سم آفلاتوکسین M_1 توسط باکتری مرده *L. delbruecii* (۰/۲۷±۴۱/۹ درصد) به مراتب بیشتر از باکتری زنده (۰/۸۹±۱۵/۴ درصد) است. Bovo و همکاران (۲۰۱۳) (۳۲) نیز گزارش دادند بیشترین درصد حذف آفلاتوکسین M_1 از شیر پس از ۲۴ ساعت از مواجهه است، اما اختلاف معنی‌داری ($P\text{-}Value>0.05$) بین باکتری زنده و مردهٔ *L. delbruecii* وجود نداشت. در مطالعه آنها باکتری مردهٔ *B.*

www.SID.ir

Archive of SID

animalis در میزان حذف آفلاتوکسین M_1 (۳/۸۵±۳۵/۸۴ درصد) به مراتب تأثیر بیشتری نسبت به حالت زنده (۴/۱۳±۲۳/۶۲ درصد) داشت که مقادیر آن نسبت به مقادیر حذف آفلاتوکسین M_1 در تحقیق حاضر کمتر بود. در مطالعه‌ای دیگر توسط Sarimehmetoğlu و Küplülü (۲۰۰۴) (۳۷) و Kabak و Var (۲۰۰۸) (۳۸) مشاهده شد که به ترتیب مقدار درصد حذف آفلاتوکسین M_1 از شیر توسط باکتری زنده *L. delbruecii* بعد از ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۲۹/۴۲ درصد و ۱۰/۲۲ درصد است که تفاوت آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر به روش الایزا پس از گذشت ۲۴ ساعت در رقت 10^9 باکتری *L. delbruecii* بر میلی‌لیتر، قابل تامل بود.

در رابطه با مقدار حذف سم، بدون درنظرگرفتن نوع باکتری با روش HPLC، می‌توان مشاهده کرد که کمترین (۳/۶±۴۹ درصد) و بیشترین (۳/۵±۵۹ درصد) مقدار مهار سم در غلظت ۰/۷۵ نانوگرم سم بر میلی‌لیتر توسط رقت 10^9 باکتری زنده طی زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه اتفاق افتاده است. این مقادیر در شرایط مشابه برای باکتری مرده به ترتیب ۳/۵±۴۶ و ۳/۶±۵۴ درصد ثبت شد. این نتایج در حقیقت نشان داد توانایی باکتری‌های زنده در کاهش سم آفلاتوکسین M_1 با افزایش زمان بیشتر شده است، ولی این توانایی در باکتری‌های مرده، با گذشت زمان کاهش خواهد یافت. Bueno و همکاران (۲۰۰۷) (۳۹) نیز گزارش کردند حداقل غلظت باکتری زنده *L.acidophilus* برای حذف ۵۰ درصد از آفلاتوکسین در محیط مایع، 2×10^9 سلول باکتری بر میلی‌لیتر است که این مقدار برای حذف آفلاتوکسین، ۲≥ تعداد باکتری *B.animalis* و باکتری *L.delbruecii* در این تحقیق است. بنابراین باکتری *B. animalis* در روش HPLC قادر است در رقت 1×10^8 باکتری، بیش از ۵۰ درصد از سم آفلاتوکسین M_1 را در شیر طی ۳۰ دقیقه اول حذف (۵/۲±۶۰ درصد) و طی ۱۲۰ دقیقه، این مقدار را به ۵/۱±۵۷ درصد کاهش دهد. رقت‌های 1×10^9 و 1×10^8 باکتری *L. delbruecii* نیز برای حذف بیش از ۵۰ درصد از سم آفلاتوکسین M_1 به ترتیب در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه لازم است. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Sarimehmetoğlu و Küplülü (۲۰۰۴) (۳۷) مطابقت داشت، اما با نتایج Serrano-Nino و همکاران (۲۰۱۳) (۳۶) مطابقت نداشت. از سویی دیگر، در روش الایزا مشخص شد بیشترین مقدار کاهش سم در دمای ۴ درجه سلسیوس و در غلظت ۰/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر طی ۳۰ دقیقه اول و بدون در نظر گرفتن نوع باکتری است (۳± ۵۶ درصد). Adibpour و همکاران (۲۰۱۶) (۴۰) مشخص کردند *acidophilus* *L.* طی ۲۴ ساعت اول تولید ماست، قادر است بیش از ۹۰ درصد آفلاتوکسین M_1 را در دمای ۴ درجه سلسیوس کاهش دهد، که با نتیجه تحقیق حاضر مبنی بر اینکه بیشترین حذف آفلاتوکسین M_1 به روش ELISA در دمای ۴ درجه سلسیوس اتفاق می افتد، مشابهت دارد. از مقایسه هر دو باکتری نیز به نظر می‌رسد عملکرد باکتری *B. animalis* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و باکتری *L. delbruecii* در دمای ۴ درجه سلسیوس، بهتر بوده است. El-Nezami و همکاران (۱۹۹۸) (۳۴) نیز دمای اپتیمم برای حذف آفلاتوکسین را ۳۷ درجه سلسیوس گزارش کردند. همچنین، Elgerbi و همکاران (۲۰۰۶) (۴۱) با بررسی تأثیر باکتری‌های اسید لاکتیک در حذف آفلاتوکسین M_1، دمای ۳۷ درجه سلسیوس را به عنوان دمای بهتر معرفی کردند.

با توجه به خطرات بالقوه ناشی از آلودگی با آفلاتوکسین M_1 در ایران و سایر کشورهای جهان، مطالعات مختلفی در زمینه چگونگی حذف و یا کاهش مقدار آفلاتوکسین انجام شده است، اما پژوهش‌های کمی در رابطه با تأثیر روش‌های بیولوژیکی حذف آفلاتوکسین M_1 وجود دارد. بنابراین در مطالعه حاضر با بررسی دو روش اندازه‌گیری HPLC و الایزا چنین استنباط می‌شود که رقت 10^8 باکتری *B. animalis* و رقت 10^9 باکتری *L. delbruecii* در شیر آغشته به سم با غلظت ۰/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر، در دقیقه ۳۰ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بیشترین توانایی را در میزان حذف سم آفلاتوکسین دارند. با افزایش زمان از ۳۰ دقیقه به ۱۲۰ دقیقه، از توانایی باکتری‌ها در کاهش سم آفلاتوکسین کاسته می شود. از این‌رو مشاهده شد که دمای ۳۷ درجه سلسیوس در حذف آفلاتوکسین M_1 موجود در شیر نسبت به دمای ۴ درجه سلسیوس مؤثرتر است، اما در روش HPLC، مقدار حذف سم آفلاتوکسین M_1 موجود در شیر توسط رقت 10^9 باکتری *L. delbruecii* در دمای ۴ درجه سلسیوس بیشتر بود. در روش الایزا، رقت 10^9 هر دو باکتری مؤثر بود. در واقع می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک *L. delbrueckii* و *B. animalis* در جذب بیولوژیکی آفلاتوکسین M_1 از شیر بسیار مؤثر خواهد بود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از همکاران گرامی آزمایشگاه‌های سازمان غذا و داروی کشور و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران کمال تشکر را داشته باشند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide Occurrences of Mycotoxins in Commodities, Feeds and Feed Ingredients. Animal Feed Sci Tech. 2007; 137: 265-282.
2. Corassin CH, Bovo F, Rosim RE, Oliveira CAF. Efficiency of *Saccharomyces Cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria Strains to Bind Aflatoxin M_1 in UHT Skim Milk. Food Control. 2013; 31(1):80-83.
3. Caloni F, Stammati A, Frigge G, De-Angelis I. Aflatoxin M_1 Absorption and Cytotoxicity on Human Intestinal In Vitro Model. Toxicon. 2006; 47:409-415.
4. International Agency for Research on Cancer. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Vol 82. International Agency for Research on Cancer-World Health Organization, Lyon; 2002.
5. Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of Aflatoxin M_1 in Raw Milk of Five Dairy Species in Ahvaz, Iran. Food and Chemical Toxicology. 2010; 48: 129-131.
6. Mirdamadi S, Rajabi A, Aziz Mohseni F, Momen B. Lactic Acid Production by Lactobacillus Strains. Iranian J Nut Sci Food Tech. 2007; 2(3):57-64.
7. Ardic M, Karakaya Y, Atasever M, Durmaz H. Determination of Aflatoxin B1 Levels in Deep-Red Ground Pepper (isot) Using Immune Affinity Column Combined With ELISA. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46:1596-1599.
8. Masoero F, Gallo A, Diaz D, Piva G, Moschini M. Effects of the Procedure of Inclusion of a Sequestering Agent in the Total Mixed Ration on Proportional Aflatoxin M_1 Excretion Into Milk of Lactating Dairy Cows. Animal Feed Sci Tech. 2009; 150: 34-45.
9. Womack ED, Sparks DL, Brown AE. Aflatoxin M_1 in Milk and Milk Products: A Short Review. World Mycotoxin J. 2016; 9(2):305-315.
10. Ersali A, Baho-Aldini Baigi F, Ghasemi R. Transmission of Aflatoxins from Animal Feeds to Raw and Pasteurized Milk in Shiraz City and its Suburbs. JSSU. 2009; 17(3):175-183.
11. Jafari R. Evaluation of Aflatoxin M_1 Contamination in Delivery Milk and Pasteurized Milk Produced by Regional Milk Factory of East Azarbaijan. Master's Degree in Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences; 2009.
12. Nakhaei A, Afzali N, Hosseini Vashan S J, Karimi Torshizi M A. Protective Effect of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Aflatoxin on Blood Parameters, Ileum Morphometry and Hepatocytes' Histopathology of Broiler Chickens Fed Aflatoxin B1. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :199-207
13. Mishra HN, Das C. A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. Critical Reviews in Food Sci Nut. 2003; 43(3):245-264.
14. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Human Feed-Animal Maximum Tolerance of Mycotoxins (Amendment No. 1), Standard No. 92. 2nd ed. Tehran; 2010.
15. Kabak B, Dobson ADW, Var I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. Critical Reviews in Food Sci Nut. 2006; 46:593-619.
16. Karimi Ardestani S, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. Molecular detection of heat-killed probiotic bacteria and study of apoptosis induction on colon cancer HT-29 cell line. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :42-52
17. Sarimehmetoglu B, Kuplulu O. Binding Ability of Aflatoxin M_1 to Yoghurt Bacteria. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2004; 51:195-198.
18. Vinderola G, Itieni A. Role of Probiotics Against Mycotoxins and Their Deleterious Effects. J Food Res. 2015; 4:10-21.
19. Sanders ME. *Lactic Acid Bacteria* as Promoters of Human Health. In: Goldberg, L. (Ed.), Functional Foods. New York: Chapman and Hall Co; 1997. 294-322.
20. Möller C, De Vrese M. Probiotic Effects of Selected Acid Bacteria. Milchwissenschaft. 2004; 59(11):597-601.
21. Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. Phosphate Group Requirement for Mitogenic Activation of Lymphocytes by an Extracellular Phosphopolysaccharide From *Lactobacillus Delbrueckii ssp. Bulgaricus*. Int J Food Microbiology. 1998; 40(1):169-175.
22. Kabak B, Brandon EFA, Var I, Blokland M, Sips, AJAM. Effects of Probiotic Bacteria on Bioaccessibility of Aflatoxin B1 and Ochrtoxin A Using an In Vitro Digestion Model Under Fed Conditions. J Environmental Sci Health. 2009; 44: 472-480.
23. Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, Alaoul-Jamall MA, Piakash S. Design and Valldation of an Orally Administrated Active *L. Fermentum-L. Acidofillus* Probiotic Formulation Using Colorectal Cancer ApcMin/+ Mouse Model. Applied Microbiology Biotech. 2017; 101(1):1999-2019.
24. Kirkpatric W, Lopez-Ribot J, Mcatee R, Patterson T. Growth Competition Between *Candida Dublinlensis* and *Candida Albicans* Under Broth and Biofilm Growing Canditions. J Clin Microbiology. 2000; 38(1):902-904.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Namvar Rad M, Razavilar V, Anvar SAA, Akbari-Adergani. Selected Bio-Physical Factors Affecting the Efficiency of *Bifidobacterium Animalis Lactis* and *Lactobacillus Delbrueckii Bulgaricus* to Degrade Aflatoxin M_1 in Artificially Contaminated Milk. J Food Safety. 2018; 10;1-11.

26. Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF, Badr FH. Detoxification of Aflatoxin M_1 in Yoghurt Using Probiotics and *Lactic Acid Bacteria*. Food Control. 2014; 43(1):129-134.

27. Wang JJ, Liu BH, Hsu YT, Yu FY. Sensitive Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Detecting Aflatoxin M_1 in mMilk. Food Control. 2011; 22(1):964-969.

28. Riazipour M, Tavakkoli HR, Razzaghi AM, Rafati H, Sadr Momtaz, SM. Measuring the Amount of M_1 Aflatoxin in Pasteurized Milks. Kowsar Medical Journal. 2010; 15(2):89-93.

29. Jawaid S, Talpur, FN, Nizamani SM, Afridi HI. Contamination Profile of Aflatoxin M_1 Residues in Milk Supply Chain of Sindh, Pakistan. Toxicology Reports. 2015; 2:1418-1422.

30. Sadat Fakoor Janati S, Beheshti HR, Feizy J, Asadi M. Aflatoxin Determination in Saffron by High-Performance Liquid Chromatography and Immunoaffinity Column Clean-Up. Saffron Agronomy Tech. 2013; 1(2):102-111.

31. Lopez CE, Ramos LL, Ramadan SS, Bulacio LC. Presence of Aflatoxin M_1 in Milk for Human Consumption in Argentina. Food Control. 2003; 14:31-34.

32. Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, de Oliveira CA. Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M_1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk. Food and Bioprocess Tech. 2013; 6(8):2230-2234.

33. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface Binding of Aflatoxin B_1 by *Lactic Acid Bacteria*. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(7):3086-3091.

34. El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of Dairy Strains of *Lactic Acid Bacteria* to Bind a Common Food Carcinogen, Aflatoxin B_1. Food Chem Toxicol. 1998; 36(4):321-326.

35. Ismail A, Akhtar S, Levin RE Ismail T, Riaz M, Amir M. Aflatoxin M_1: Prevalence and Decontamination Strategies in Milk and Milk Products. Crit Rev Microbiol. 2016; 42(3):418-427.

36. Serrano-Niño JC, Cavazos-Garduño A, Hernandez-Mendoza A, Applegate B, Ferruzzi MG, San Martin-González MF, et al. Assessment of Probiotic Strains Ability to Reduce the Bioaccessibility of Aflatoxin M_1 in Artificially Contaminated Milk Using an In Vitro Digestive Model. Food Control. 2013; 31(1):202-207.

37. Sarimehmetoğlu B, Küplülü Ö. Binding Ability of Aflatoxin M_1 to Yoghurt Bacteria. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2004; 51(1):195-198.

38. Kabak B, Var I. Factors Affecting the Removal of Aflatoxin M_1 From Food Model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. J Environ Sci Health B. 2008; 43(7):617-624.

39. Bueno DJ, Casale CH, Pizzolitto RP, Salvano MA, Oliver G. Physical Adsorption of Aflatoxin B_1 by *Lactic Acid Bacteria* and *Saccharomyces Cerevisiae*: A Theoretical Model. J Food Prot. 2007; 70(9):2148-2154.

40. Adibpour N, Soleimanian-Zad S, Sarabi-Jamab M, Tajalli F. Effect of Storage Time and Concentration of Aflatoxin M_1 on Toxin Binding Capacity of *L. Acidophilus* in Fermented Milk Product. J Agr Sci Tech. 2016; 18(1):1209-1220.

41. Elgerbi AM, Aidoo K, Candlish AAG, Williams AG. Effects of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria on Levels of Aflatoxin M_1 in Milk and Phosphate Buffer. Milchwissenschaft. 2006; 61(2):197-199.

www.SID.ir