سم زدایی آفلاتوکسین M1 با بیفیدوباکتریوم لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در شیر بدون چربی

مسعود آتشپنجه[۱]، سید امیرعلی انوار[۲*]، امیر اقبال خواجه رحیمی[۲]، مریم طلا[۳]، نکیسا سهرابی حقدوست[٤]

چکیده

آلودگی محصولات غذایی به ویژه لبنیات به آفلاتوکسین یکی از مشکلات اساسی در صنعت غذایی می باشد. تحقیق حاضر با هدف امکان حذف آفلاتوکسین M۱ به وسیله دو پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس به تنهایی و یا در ترکیب با هم در شیر بدون چربی حاوی این توکسین صورت گرفت. اثر عوامل زمان نگهداری، سویه میکروبی، غلظت باکتری، غلظت توکسین و درجه حرارت در حذف آفلاتوکسین مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت و دو باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در رقت های ۱۰۸ و ۱۰۱۰ CFU/ml به شیر بدون چربی آلوده به غلظت های مختلف آفلاتوکسین M1 (1/0) ، ۰/۲۵ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به تنهایی و به صورت ترکیبی تلقیح و در زمان های ۰/۵، ۱، ۲ و ۲٤ ساعت در ٤ و ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند. با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) درصد سم زدایی آفلاتوکسین M۱ سنجیده شد. نتایج افزایش حذف آفلاتوکسین M۱ از تیمارها با گذشت زمان را نشان داد. حذف آفلاتوکسین M۱ توسط این سویه‌ها بسته به غلظت باکتری، زمان نگهداری، غلظت توکسین و سویه باکتریایی به تنهایی یا ترکیبی، از ۱۲ تا ۸۷ درصد متغیر بود. نتایج این مطالعه می تواند روشی موثر در کاهش یا حذف غلظت آفلاتوکسین M۱ در صنایع لبنی با استفاده از پروبیوتیک ها باشد.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین M1، بیفیدوباکتریوم لاکتیس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، شیر، سم زدایی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/٦/۱ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۸/۱۲

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها ترکیبات شیمیایی سمی هستند که توسط قارچ‌های آفلاتوکسیژنیک تولید می‌شوند. این ترکیبات در مواد غذایی مختلف از جمله غلات، ماهی، گوشت، شیر و محصولات لبنی، بیشتر یافت می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها برای انسان و حیوانات خطرناک هستند و می‌توانند به بیماری‌هایی مانند سرطان، کبد چربی، آسم و آلرژی منجر شوند. (۱, ۲) یکی از انواع آفلاتوکسین‌ها، آفلاتوکسین M1 (AFM1) است که به علت مصرف شیر و محصولات لبنی آلوده به این ترکیب در انسان و حیوانات خطرناک است. آفلاتوکسین M1 به عنوان متابولیت اصلی آفلاتوکسین B1 (AFB1)، که یکی از پراستفاده‌ترین آفلاتوکسین‌ها در تولید مواد غذایی است، در شیر و محصولات لبنی موجود است. (۱, ۳) برای حذف آفلاتوکسین M1 از شیر و محصولات لبنی، از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی برای حذف آفلاتوکسین M1 بکار گرفته می‌شوند. روش‌های شیمیایی شامل استفاده از جاذب‌های شیمیایی مانند کربن فعال و کیتوسان و همچنین مواد اکسید کننده مانند پراکسید هیدروژن، کلر، ازون و اسید پرکلریک (perchloric acid) می‌شوند. روش‌های فیزیکی شامل فرآیندهای حرارتی مانند پاستوریزاسیون، اتوکلاو و یخ‌زدایی و همچنین فیلتراسیون مانند میکروفیلتراسیون و نانوفیلتراسیون می‌باشند. علاوه بر این، روش‌های بیولوژیکی نیز برای حذف آفلاتوکسین M1 از شیر و محصولات لبنی استفاده می‌شوند. این روش‌ها شامل استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلوس و

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد قشم، دانشگاه آزاد اسلامی، قشم، ایران.
*۲-گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
amiralianvar@gmail.com.
۳-گروه شیلات، واحد قشم، دانشگاه آزاد اسلامی، قشم، ایران.
٤-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم و تحقیقات دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

باکتری بیفیدوباکتریوم می‌شوند. باکتری‌های پروبیوتیک با تولید اسید لاکتیک، پروتئاز، لاکتوپروکسیداز و فراسنج‌های دیگر می‌توانند آفلاتوکسین M1 را از شیر و محصولات لبنی حذف کنند. (٤-٦) با توجه به اهمیت آفلاتوکسین ها در سلامت غذایی، اندازه گیری اغین توکسین ها در محصولات غذایی حائز اهمیت است. اندازه‌گیری غلظت آفلاتوکسین در مواد غذایی به منظور بررسی میزان آلودگی، ارزیابی خطرات سلامتی و بررسی تأثیرات روش‌های کنترلی استفاده می‌شود. برای محافظت از سلامت عمومی، مقررات و استانداردهای مختلفی برای محدود کردن حداکثر مجاز آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی وجود دارد. (١, ٧) برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها مانند آفلاتوکسین M1 در مواد غذایی، روش‌های مختلفی مانند کروماتوگرافی مایع، کروماتوگرافی گازی، روش‌های ایمونوشیمیایی و روش‌های بیوسنسوری استفاده می‌شود. روش کروماتوگرافی مایع (HPLC) به عنوان روش استاندارد برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 در مواد غذایی شناخته شده است. (٢, ٨) بیفیدوباکترها و استرپتوکوکوس ترموفیلوس به عنوان دو گونه باکتری پروبیوتیک شناخته شده اند که در مطالعات مختلفی برای کاهش آلودگی به آفلاتوکسین‌ها به کار گرفته شده‌اند. پروبیوتیک ها، می‌توانند در سم زدایی از آفلاتوکسین‌ها نقش مؤثری داشته باشند. در یک مطالعه، اثر دو گونه باکتریایی بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس روی سم زدایی از آفلاتوکسین B آزمایش شده است. نتایج نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند به طور موثری میزان از آفلاتوکسین B را در محیط واقعی کاهش دهند و این کاهش، تا ٦٢ درصد نسبت به گروه کنترل بود. در یک مطالعه دیگر، استفاده از استرپتوکوکوس ترموفیلوس به‌عنوان پروبیوتیک برای سم زدایی از از آفلاتوکسین B در روده‌های موش‌های آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مصرف استرپتوکوکوس ترموفیلوس به‌طور موثری میزان از آفلاتوکسین B را در روده‌های موش‌های آزمایشی کاهش داد. (٩, ١٠) بنابراین، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک مانند بیفیدوباکترها و استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌تواند یک راهکار مؤثر برای سم زدایی از آفلاتوکسین ها در محیط‌های مختلف از جمله مواد غذایی باشد و استفاده از آن ها برای کاهش آلودگی به آفلاتوکسین ها در محصولات کشاورزی و دامی مطرح شده است. (١١) اگرچه، برخی گزارش‌ها در مورد سم‌زدایی آفلاتوکسین‌ها توسط میکروارگانیسم‌های مختلف وجود دارد، اما اثرات ترکیبی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس گزارش نشده است. در مطالعه مذکور، اثرات ترکیب استرپتوکوکوس ترموفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر روی سم زدایی آفلاتوکسین M1 در شیر بدون چربی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه، انتخاب بهترین روش مبتنی بر پروبیوتیک ها برای کاهش آلودگی آفلاتوکسین M1 در شیر بود. به دلیل تأثیر پارامترهای مختلف مانند دما، غلظت AFM1 و پروبیوتیک‌ها بر سم‌زدایی، در ابتدا اثر سم‌زدایی باکتری‌ها با دو سطح غلظت باکتریایی 10^{8} و 10^{10} CFU/ml و دمای انکوباسیون (٤ و ٣٧ درجه سانتیگراد) و همچنین سه سطح غلظت AFM1 شامل ٠/١ ، ٠/٢٥ و ٠/٥ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان نگهداری در زمان‌های مختلف (٣٠، ٦٠، ١٢٠ دقیقه و ٢٤ ساعت) با استفاده از HPLC بررسی شد. سپس، بهترین نتایج برای هر باکتری انتخاب شد و ترکیب پروبیوتیک‌ها برای مقایسه موثرترین شرایط برای سم‌زدایی آفلاتوکسین M1 مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌کار

آماده سازی سوسپانسیون میکروبی

سوش لیوفیلیزه *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* *Bb12* از هانسن دانمارک و *Streptococcus thermophilus*

PTCC7788 از زیست کاش ایرانیان تهیه شدند. ۱ گرم باکتری لیوفیلیزه در ۱۰۰ میلی لیتر براث MRS و براث ۱۷M کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. سپس سلول ها از طریق سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ g در مدت زمان ۱۵ دقیقه از محیط کشت جدا شدند و سوسپانسیون میکروبی با دو غلظت نهایی CFU/ml 10^8 و 10^{10} تهیه شد. (۱۲)

تهیه محلول استاندارد آفلاتوکسین M1

پودر آفلاتوکسین M1 از برند Aokin آلمان (6795-23-9) خریداری شد. محلول استاندارد با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تهیه شد. برای تهیه این محلول، پودر مربوطه با وزن ۱۰ میکروگرم در حجم ۱ میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. سپس، این محلول با افزودن مقدار بیشتری استونیتریل به غلظت ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر رقیق شد. در نهایت، این محلول در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. (۱۲)

آماده سازی شیر بدون چربی حاوی آفلاتوکسین M1

شیر بدون چربی با مخلوط کردن پودر شیر بدون چربی (115363، Merck، آلمان) با آب مقطر (10:1 V/W) تهیه شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه به هم زده و سپس در سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ g در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، لایه بالایی کرم رنگ به طور کامل برداشته شد. نمونه‌ها با سه غلظت مختلف از محلول های آفلاتوکسین M1 (۰/۱ ، ۰/۲۵ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) آماده شد. (۱۲)

تلقیح پروبیوتیک ها به نمونه های شیر بدون چربی

در نمونه های ۹ میلی‌لیتر شیر بدون چربی حاوی آفلاتوکسین M1، دو غلظت نهایی CFU/ml 10^8 و 10^{10} سویه‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس به تنهایی و به صورت ترکیبی از دو باکتری تلقیح صورت گرفت و نمونه ها در دو دمای ٤ و ۳۷ درجهٔ سانتیگراد برای مدت ۳۰، ٦۰، ۱۲۰ دقیقه و ۲٤ ساعت انکوبه شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها برای ۵ دقیقه در دور ۲۷۵۰ سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت حاصل از لحاظ میزان آفلاتوکسین بررسی شد.

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M1 به روش HPLC

جهت تعیین میزان آفلاتوکسین جذب نشده توسط میکروب‌های نمونه، اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M1 باقیمانده در سوپرناتانت در زمان‌های (۳۰ دقیقه، ۱ ساعت، ۲ ساعت و ۲٤ ساعت) و درجه دماهای (٤ و ۳۷ درجه سلسیوس) انجام شد. نمونه های ۱۵۰ میکرولیتری به دستگاه (Waters Alliance 2695 Separations Module) HPLC با ستون (*Grom Sil* C18 *ODS-5ST*, 5µm×250×4.6mm) تزریق شد، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و فاز حامل آب/ استونیتریل/ متانول (۲۰:۲۰:٦۰) حجمی بود. تشخیص توسط یک آشکارساز فلورسانس در طول موج های تحریک و انتشار به ترتیب ۳٦۵ و ٤٦۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت درصد آفلاتوکسین M1 حذف شده به صورت زیر محاسبه شد:

%AFM1=100 * [1 - (peak area of sample)/area of positive control chromatographic peak)]

تجزیه و تحلیل نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش حاضر با حداقل سه تکرار مستقل و با استفاده از تحلیل واریانس اندازه گیری مکرر (ANOVA) و آزمون کرویت موچلی (Mauchly's sphericity test) ضورت گرفت، در صورت معنی‌دار بودن مقادیر، تصحیح گلخانه-گیسر یا Huynh-Feldt به‌کار

گرفته شد. از نظر آماری برای همه آزمایش‌ها معنی‌داری در نظر گرفته شد. آزمون تعقیبی برای مقایسه میانگین‌های حاشیهٔ برآورد شده با استفاده از بونفرونی مورد استفاده قرار گرفت ($P < ۰/۰۵$).

نتایج

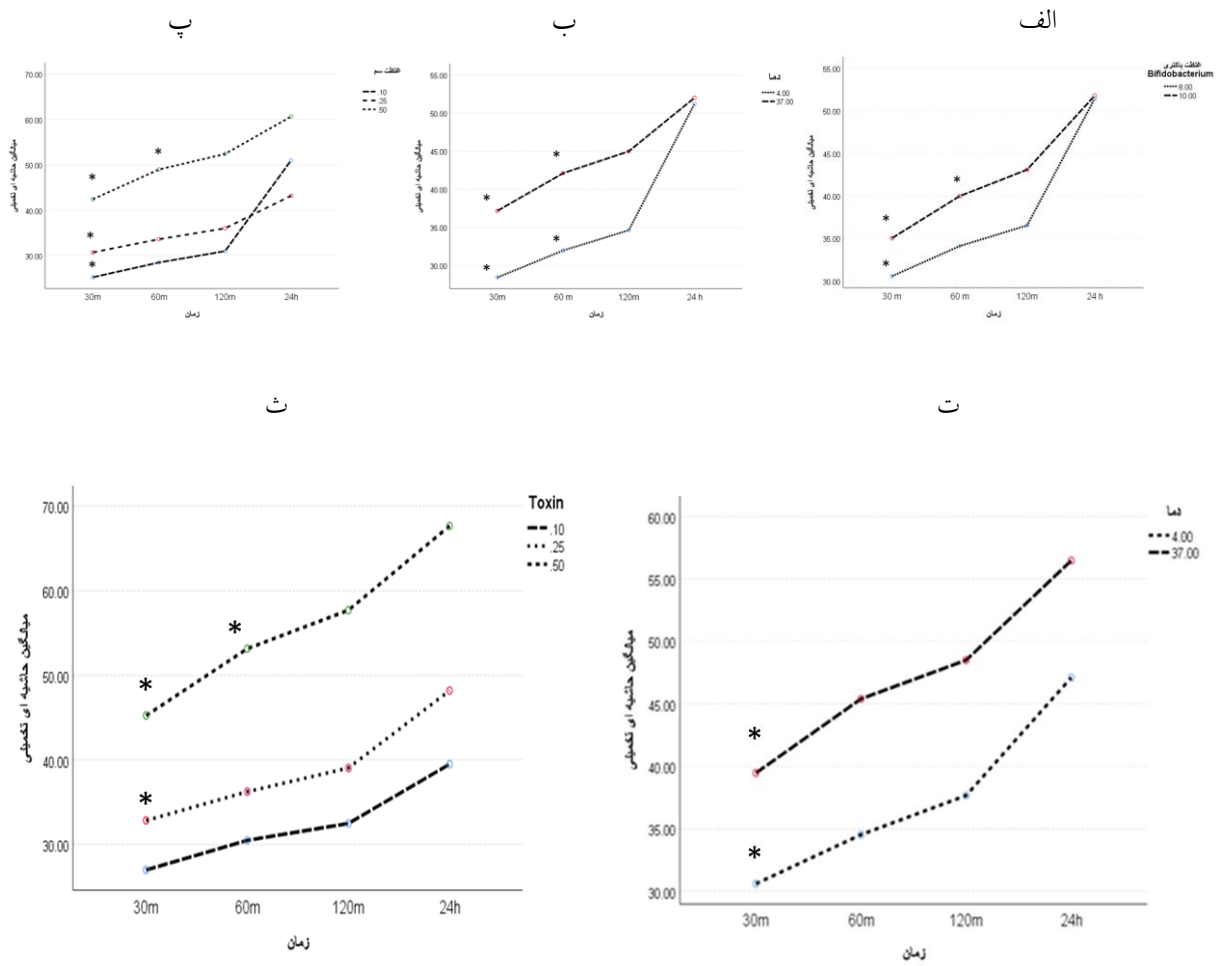
نتایج حاصل حاکی از اثر گذاری تمام عوامل مورد بررسی شامل زمان نگهداری، نوع باکتری، غلظت باکتری، دما، غلظت آفلاتوکسین M1 و ترکیب باکتری ها بر سم زدایی غلظت آفلاتوکسین M1 بود، که مدت زمان تأثیر قابل توجهی بر حذف توکسین مورد آزمون داشت.

اثر بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر سم زدایی آفلاتوکسین M1 در شرایط مختلف

در نمودار ۱ تاثیر غلظت باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس، دما، زمان نگهداری و غلظت توکسین و همچنین اثر متقابل آن ها بر سم زدایی آفلاتوکسین M1 نشان داده شده است.

نمودار ۱الف اثر متقابل زمان نگهداری و غلظت باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس را در سم زدایی آفلاتوکسین M1 (محدوده ۳۰/۵۶–۵۱/۷۸٪، $p<۰/۵۹$) نشان می دهد. بیشترین سم زدایی آفلاتوکسین M1 در غلظت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml بیفیدوباکتریوم لاکتیس در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه معادل ٤٣ درصد رخ داد، که در نتیجه آن تیمار غلظت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml بیفیدوباکتریوم لاکتیس به عنوان بهترین گروه در حذف آفلاتوکسین M1 انتخاب شد. کاهش توکسین توسط بیفیدوباکتریوم لاکتیس با افزایش دمای تلقیح شده در طول زمان در محدوده (۲۸/٤۳–۵۱/۲۱٪) و (۱۱٪/۵۲–۳۷) به ترتیب در ٤ و ۳۷ درجه سانتیگراد افزایش یافت (نمودار ۱ب). کاهش آفلاتوکسین M1 در ۱۲۰ دقیقه به طور قابل توجهی در مقایسه با ٦۰ دقیقه در هر دو دما بیشتر بود. نمودار ۱پ بیان می کند که اثر زمان در غلظت توکسین بر درصد سم زدایی بیفیدوباکتریوم لاکتیس ۲۵/۲۵ تا ٦۰/٦۲ درصد بوده است ($p<۰/٤۹$). همچنین سم زدایی با افزایش غلظت توکسین افزایش یافت. افزایش در توکسین زدایی در ۱۲۰ دقیقه نسبت به ٦۰ دقیقه در بالاترین غلظت (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) ($p<۰/۰۳٦$) مشاهده شد. نتایج نمودار ۱ت نشان می‌دهد به طور کلی درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در غلظت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml این پروبیوتیک در دمای ٤ درجه سلسیوس، در زمان ۳۰ دقیقه نسبت به ۱۲۰ دقیقه در سطح آماری ۵ درصد معنی دار بوده است. اثر متقابل میانگین حاشیه ای حذف آفلاتوکسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در زمان ۳۰ دقیقه نسبت به ٦۰ دقیقه و ۱۲۰ دقیقه دارای اختلاف معنی دار بوده است. کاهش توکسین توسط بیفیدوباکتریوم لاکتیس با افزایش دمای تلقیح باکتری در ۳۷ درجه سانتیگراد افزایش یافت. کاهش توکسین در ۱۲۰ دقیقه به طور قابل توجهی در مقایسه با ٦۰ دقیقه در هر دو دما بیشتر بود. بیشترین درصد سم زدایی در رقت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml بیفیدوباکتریوم لاکتیس در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه (٤۳ درصد) رخ داد. نمودار ۱ت اثر متقابل غلظت باکتری در دما در زمان نگهداری را در رقت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml بیفیدوباکتریوم لاکتیس نشان می دهد، زمانی که دما مطابق مرحله اول به اثر متقابل زمان در غلظت باکتری اضافه شد. نتایج نشان داد که انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نسبت به دمای ٤ درجه سانتیگراد توانایی بالاتری در توکسین زدایی داشت و پس از ۱۲۰ دقیقه و ۲٤ ساعت به ترتیب به ٤۸/۵ و ۵٦/٦ درصد رسید (نمودار ۱ت). همچنین به این نتیجه رسیدیم که $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml بیفیدوباکتریوم لاکتیس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (۵٦/٤٦٪) نسبت به زمانی که اثر دما در نظر گرفته نشده بود (۵۱/۷۸ ٪) پس از ۲٤ ساعت افزایش قابل توجهی نشان داد. بنابراین، در نهایت رقت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml

بیفیدوباکتریوم لاکتیس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به عنوان بهترین تیمار انتخاب شد. در نمودار ۱ث، همچنین بررسی اثر غلظت سم در زمان نگهداری در غلظت باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در ۳۷ درجه سانتیگراد، نشان داد که افزایش غلظت توکسین باعث افزایش سم زدایی می شود. غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر بالاترین درصد سم زدایی را نشان داد و در طول مدت در ۱۲۰ دقیقه ۵۷/۷ ٪ در مقایسه با ٦۰ دقیقه ۵۳٪، (p<۰/۰٤۹) به طور قابل توجهی بالاتر بود، در حالی که تفاوت معنی داری در مقایسه با ۲٤ ساعت نداشت.



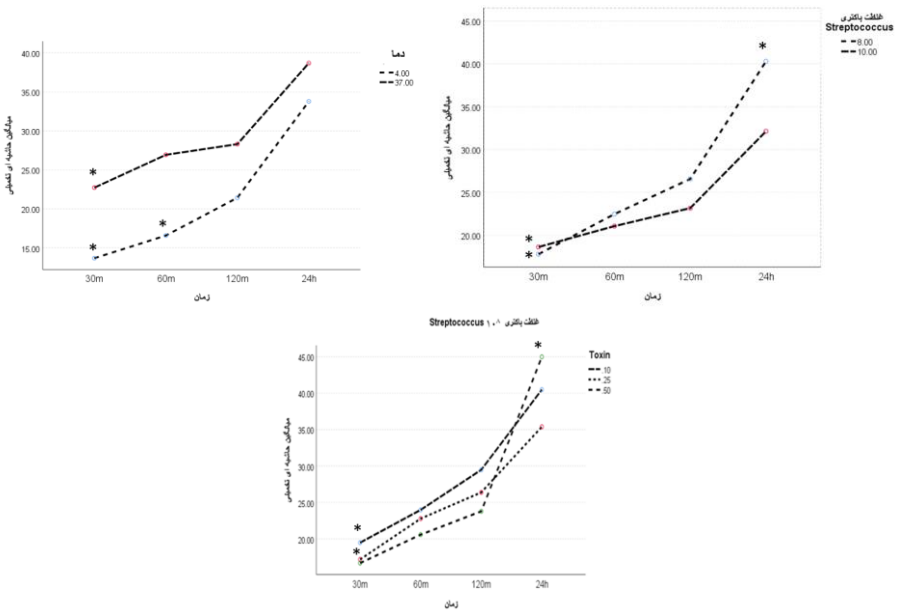
نمودار ۱: اثر فاکتور های مختلف در سم زدایی آفلاتوکسین M1 توسط بیفیدوباکتریوم لاکتیس. الف: اثر مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین غلظت باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در دو رقت 10^{8} و 10^{10} در زمان‌های مختلف. ب: مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در دمای ٤ و ۳۷ درجه سلسیوس و در زمان مختلف. پ: اثر متقابل مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در سه غلظت سم ۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۵ در زمان مختلف. ت: اثر متقابل مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در رقت 10^{10} و در دمای ٤ و ۳۷ درجه سلسیوس و در زمان‌های مختلف. ث: اثرات متقابل میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در رقت 10^{10} و در سه غلظت سم ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ در زمان‌های مختلف.

اثر استرپتوکوکوس ترموفیلوس بر سم زدایی آفلاتوکسین M1 در شرایط مختلف

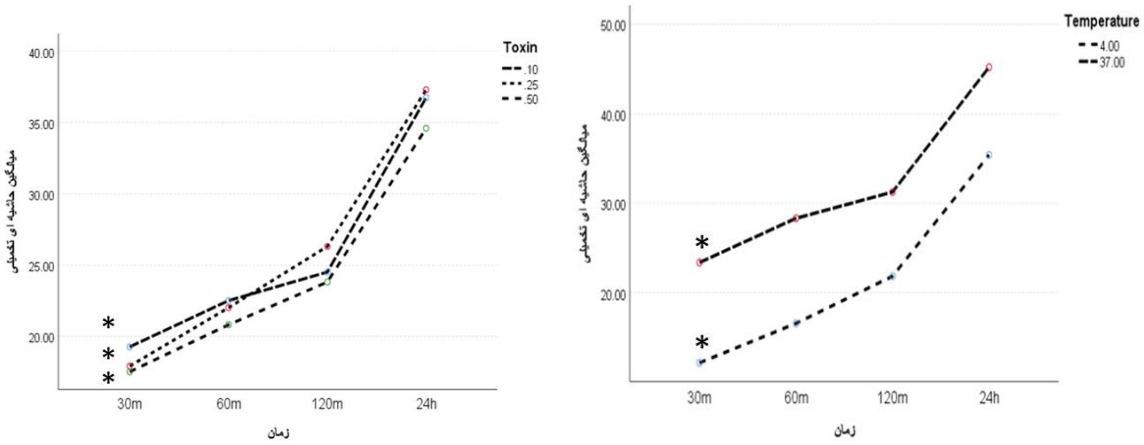
اثر غلظت باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس، دما، زمان نگهداری و غلظت توکسین و همچنین اثر متقابل آن ها بر حذف توکسین آفلاتوکسین M1 در نمودار ۲ مشاهده می شود.

اثر متقابل زمان نگهداری و غلظت باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در سم زدایی آفلاتوکسین M1، در محدوده ۳/۸۰-۱۷/۰٪، ۴۰ (p<۰/۱۷) بود که با گذشت زمان کاهش آفلاتوکسین M1 را نشان می دهد (نمودار ۲الف). اثر سم زدایی آفلاتوکسین M1 در غلظت $۱۰^{۸}$ CFU/ml در طول زمان نگهداری ۳/۲±۴۰/۳ درصد بود که در مقایسه با غلظت $۱۰^{۱۰}$ CFU/ml بیشتر است. سم زدایی آفلاتوکسین M1 در ۶۰ دقیقه نسبت به ۳۰ دقیقه به طور قابل توجهی بیشتر بود. اثر سم زدایی آفلاتوکسین M1 در غلظت $۱۰^{۸}$ CFU/ml در ۲۴ ساعت در مقایسه با سایر زمان‌ها در این غلظت از باکتری افزایش معنی‌داری نشان داد. در نتیجه تیمار غلظت $۱۰^{۸}$ CFU/ml استرپتوکوکوس ترموفیلوس به عنوان بهترین تیمار در حذف آفلاتوکسین M1 انتخاب شد. نمودار ۲ب نتایج اثر متقابل زمان نگهداری و دما در استرپتوکوکوس ترموفیلوس را در سم زدایی آفلاتوکسین M1 بیان می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان، درصد حذف آفلاتوکسین M1 در هر دو دما ۴ و ۳۷ درجه افزایش یافته است. با افزایش دما در طول زمان در دمای ۴ درجه سانتی گراد از ۱۳ به ۳۳ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد از ۲۲ به ۳۸ درصد افزایش یافت. افزایش معنی داری در حذف توکسین مورد نظر در ۶۰ دقیقه نسبت به ۳۰ مشاهده شد (p<۰/۰۰)، در حالی که تفاوت معنی داری بین ۱۲۰ دقیقه و ۲۴ ساعت (p<۰/۱) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد وجود نداشت. نمودار ۲پ نشان داد، اثر زمان و غلظت توکسین، کاهش آفلاتوکسین M1 به وسیله استرپتوکوکوس ترموفیلوس در طول زمان افزایش یافته است. سم زدایی بالایی (۲۲٪) در غلظت های ۰/۱ و ۰/۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر در ۶۰ دقیقه مشاهده شد. بیشترین سم زدایی به ترتیب ۳۶/۷۵ و ۳۷/۳ درصد در ۰/۱ و ۰/۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر پس از گذشت ۲۴ ساعت بود. هنگامی که اثر دما در رقت $۱۰^{۸}$ CFU/ml استرپتوکوکوس ترموفیلوس در زمان نگهداری اضافه شد، براساس نتایج اولیه، حذف توکسین در ۳۷ درجه سانتیگراد (۴۵-۲۳٪) در مقایسه با ۴ درجه سانتیگراد (۱۲-۳۵,۴۰٪) در طول ذخیره سازی بیشتر بود (نمودار ۲ت). سم زدایی ۶۰ دقیقه نسبت به ۳۰ دقیقه افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۲) در حالی که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با ۱۲۰ دقیقه مشاهده نشد (p<۰/۸). بنابراین، $۱۰^{۸}$ CFU/ml استرپتوکوکوس ترموفیلوس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد عملکرد بهتری برای سم زدایی آفلاتوکسین M1 در زمان ۶۰ دقیقه نشان داد. در نهایت رقت $۱۰^{۸}$ CFU/ml استرپتوکوکوس ترموفیلوس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به عنوان بهترین گروه انتخاب شد. نتایج نمودار ۲ث اثر متقابل دما در غلظت توکسین در رقت $۱۰^{۸}$ CFU/ml استرپتوکوکوس ترموفیلوس را نشان می‌دهد که کاهش قابل توجهی در حذف توکسین در ۶۰ دقیقه برای همه غلظت ها نسبت به ۳۰ دقیقه مشاهده شد و بیشترین میزان سم زدایی (۵/۳±۲۴ ٪) مربوط به ۰/۱ میکروگرم بر گرم بود. در طی مدت ۲۴ ساعت، بالاترین سم زدایی در ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر (۵±۴۵/۲ ٪) مشاهده شد که در مقایسه با زمان نگهداری ۶۰ دقیقه (۵/۳±۲۰/۶٪) تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۳۵).

الف ب پ



ت ث



نمودار ۲: اثر فاکتور های مختلف در سم زدایی آفلاتوکسین M1 توسط استرپتوکوکوس ترموفیلوس. الف: اثر مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین غلظت باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در دو رقت 10^8 و 10^{10} در زمان‌های مختلف. ب: مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در دمای ٤ و ۳۷ درجه سلسیوس و در زمان مختلف. پ: اثر متقابل مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در سه غلظت سم ۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۵ در زمان مختلف. ت: اثر متقابل مقادیر میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در رقت 10^8 و در دمای ٤ و ۳۷ درجه سلسیوس و در زمان‌های مختلف. ث: اثرات متقابل میانگین حاشیه‌ای درصد حذف آفلاتوکسین M1 توسط باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در رقت 10^8 و در سه غلظت سم ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ در زمان‌های مختلف.

تاثیر ترکیب سویه های باکتریایی بر سم زدایی آفلاتوکسین M1

ترکیب بیفیدوباکتریوم لاکتیس (10^{10} CFU/ml) و استرپتوکوکوس ترموفیلوس (10^8CFU/ml) در بهترین حالت سم زدایی آفلاتوکسین M1 در هر گروه تیمار، انجام شد. شیر بدون چربی با آفلاتوکسین M1 در غلظت های ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر و در ترکیب با دو باکتری پروبیوتیک با غلظت های مذکور به نسبت ۱:۱ و در

دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت، که نشان داد درصد سم زدایی توکسین در غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر (۷۸ درصد) به طور قابل توجهی بالاتر از ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر (۵۹ درصد) بود.

بحث

آلودگی به آفلاتوکسین ها در شیر و محصولات لبنی آلوده به یکی از معضلات و نگرانی‌های اصلی ایمنی مواد غذایی در صنعت لبنیات می باشد. تلاش های بسیاری برای حذف یا کاهش این توکسین ها و نظارت بر حضور آن ها صورت گرفته است. مطالعه حاضر توانایی دو باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس را به عنوان باکتری های پروبیوتیک به تنهایی یا در ترکیب با هم برای حذف آفلاتوکسین M1 در شیر بدون چربی، با در نظر گرفتن فاکتورهای زمان، جمعیت باکتری، دمای انکوباسیون و غلظت توکسین مورد بررسی قرار داد. نتایج این تحقیق نشان داد، سم‌زدایی آفلاتوکسین M1 از شیر به زمان بیشترین وابستگی را دارد. مطالعات دیگر تأیید می کنند که سم زدایی آفلاتوکسین M1 یک فرآیند سریع است و به سویه باکتریایی هم بستگی دارد. ما به این نتیجه رسیدیم که دو باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس توانایی قابل توجهی در حذف آفلاتوکسین M1 به ترتیب در ۱۲۰ و ٦۰ دقیقه داشتند. (۱۳, ١٤)

سرلک و همکاران در بررسی حذف آفلاتوکسین M1 در نمونه های دوغ با استفاده از پروبیوتیک ها، نشان دادند با افزایش غلظت باکتری ها طی مدت ۲۸ روز، درصد سم زدایی هم افزایش می یابد، نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد رقت 10^{10} CFU/ml بیفیدوباکتریوم لاکتیس و رقت 10^{8} CFU/ml استرپتوکوکوس ترموفیلوس بیشترین میزان حذف طی ٢٤ ساعت را داشته اند. در حقیقت، غلظت باکتری یکی از عواملی بود که حذف آفلاتوکسین M1 در شیر تأثیر گذار است. به نظر می رسد ساختار دیواره سلولی بیشتر به نوع میکروارگانیسم های دخیل در دفع سموم مربوط می شود. احتمالا فعالیت آنزیمی و جذب توکسین توسط دیواره سلولی دو عامل اصلی در حذف توکسین ها توسط میکروارگانیسم ها باشند. در تحقیقی توسط پانوار و همکاران، آن ها نقش دیواره سلولی باکتریایی را به دلیل آزاد شدن آفلاتوکسین M1 پس از شستشو برجسته دانستند. (۱۵, ١٦) همچنین نتایج ما در بررسی فاکتور دمایی ٤ و ۳۷ درجه سانتی گراد در حذف آفلاتوکسین M1، بیشترین درصد سم زدایی را در هر دو نوع باکتری در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد نشان داد. احتمالا دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دما موثر و بهینه بر اجزای دیواره سلولی مانند پلی ساکاریدها و پپتیدوگلیکان ها باشد که به آفلاتوکسین اجازه می دهد تا به اجزای دیواره سلولی و غشای پلاسمایی متصل شود،(۱۷, ۱۸) در سوی دیگر، افزایش غلظت توکسین، افزایش توکسین زدایی را نشان داد که با تحقیقات دقیق در این مورد توسط دیگران نتایج مشابهی را داشت. (۱۹, ۲۰) ممکن است، با افزایش غلظت توکسین، پروبیوتیک‌ها بیشتر به آنزیم‌ها و متابولیت‌های مورد نیاز برای تجزیه آفلاتوکسین‌ها دسترسی داشته و بنابراین توانایی حذف آفلاتوکسین‌ها را افزایش یابد. (۲۱) باروکچیچ و همکاران پتانسیل پروبیوتیک‌های ترکیبی (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را برای کاهش AFM1 در شیر آلوده به ٥٤ نانوگرم در لیتر AFM1 به مدت ۲۱ روز بررسی کردند، که نتایج اثر بخشی بیشتر حذف توکسین در افزایی باکتریایی را نشان داد، نتایج تحقیق حاضر نیز، بیشترین حذف AFM1 را در ترکیب دو باکتری مورد استفاده نشان داد. (۲۰)

نتایج این تحقیق تاثیر تمام فاکتور های مورد بررسی شامل زمان نگهداری، غلظت باکتری، دما، غلظت توکسین و ترکیب پروبیوتیک ها بر حذف و سم زدایی آفلاتوکسین M1 را نشان داد و در نتیجه می تواند به عنوان روشی موثر برای کاهش یا حذف آفلاتوکسین M1 در صنایع لبنی با استفاده از پروبیوتیک‌ها استفاده شود.

فهرست منابع

1. Mousavi Khaneghah A NM, Sant'Ana AS, Ferreira SO, Lima CG, de Oliveira CAF, et al. A review on aflatoxin M1 in milk and dairy products: Occurrence, detection, and control strategies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2021;20 (3).
2. Rahimi E SN, Soleimany F. A review on occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. Food Control Journal. 2016.
3. Wang J TL, Glenn TC, Wang JS, Liu X. Aflatoxin M1: Mechanisms of toxicity and biomarkers of exposure. Food and Chemical Toxicology Journal. 2020.
4. Jin W WS, Liang H. Biodegradation of aflatoxin M1 in milk by lactic acid bacteria. Food Control Journal. 2018.
5. Zhang D LY, Sun L, Huang Y, Yang L, Liu Y, et al. Removal of Aflatoxin M1 in milk by Lactobacillus casei Shirota and its cellular components. Journal of Functional Foods. 2020.
6. Asghar MA NM, Abbas Z, Khan MZ. Aflatoxin M1 reduction in dairy products by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Critical reviews in food science and nutrition. 2019.
7. Li Y ZJ, Zhang Q, Zhang W, Wang S, Zhang J, et al. Recent advances in analytical methods for the determination of aflatoxins in food. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2021.
8. Razzaghi-Abyaneh M S-GM, Rezaee MB, Jafari NJ, Alinezhad S. Aflatoxin detection methods in foodstuff. Methods in Molecular Biology. 2013.
9. Shetty PH JL, Saccharomyces C. Ability of selected lactic acid bacteria to remove aflatoxin B1 in vitro. Food additives and contaminants. 2007.
10. Mahdavi H RH, Pourreza J. The effect of dietary supplementation of thermophilic probiotics and phytobiotics on performance and serum parameters in broiler chickens fed aflatoxin B1 contaminated diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2016.
11. Norouzi S AE, Khomeiri M, Beheshti H. Probiotic bacteria for aflatoxin detoxification: Mechanisms and practical applications. Food Control Journal. 2021.
12. Fakhrabadipour M KA, Sohrabi Haghdoost N, Anvar SAA, Tala M. Efficiency of Bifidobacterium bifidum and Saccharomyces cerevisiae for detoxification of aflatoxin M1 in skim milk. International Journal of Dairy Technology. 2023.
13. Rezasoltani S EN, Boroujeni RK, et al. Detoxification of aflatoxin M1 by probiotics Saccharomyces boulardii, Lactobacillus casei, and Lactobacillus acidophilus in reconstituted milk. Gastroenterology and Hepatology from bed to bench Journal. 2022.
14. Namvar Rad M RV, Anvar SAA, et al. Selected bio-physical factors affecting the efficiency of Bifidobacterium animalis lactis and Lactobacillus delbrueckii bulgaricus to degrade aflatoxin M1 in artificially contaminated milk. Journal of Food Safety. 2018.
15. Ismail A LR, Riaz M, Akhtar S, et al. Effect of different microbial concentrations on binding of aflatoxin M1 and stability testing. Food Control Journal. 2017.
16. Sarlak Z RM, Mohammadi R, et al. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). Food Control Journal. 2017.

17. Panwar R KN, Kashyap V, et al. Aflatoxin M1 detoxification ability of probiotic lactobacilli of Indian origin in in-vitro digestion model. Probiotics and Antimicrobial Proteins Journal. 2019.
18. Karazhiyan H MS, Karazhyan R, et al. Ability of different treatments of Saccharomyces cerevisiae to surface bind aflatoxin M1 in yoghurt. Journal of Agricultural Science and Technology. 2016.
19. Khadivi R RV, Anvar SAA, et al. Aflatoxin M1-binding ability of selected lactic acid bacteria strains and Saccharomyces boulardii in the experimentally contaminated milk treated with some biophysical factors. Archives of Razi Institute Journal. 2020.
20. Barukcic I BN, Markov K, et al. Reduction in aflatoxin M1 concentration during production and storage of selected fermented milks. International Journal of Dairy Technology. 2018.