بررسی کارایی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور سم‌زدایی آفلاتوکسین M1 در شیر بدون چربی با استفاده از آنالیز HPLC

مصطفی فخرآبادی[a]، امیر اقبال خواجه‌رحیمی[*b]، نکیسا سهرابی حق‌دوست[*c]، سید امیرعلی انوار[d]، مریم طلا[e]

[a] دانشجوی دکتری گروه بهداشت مواد غذایی، واحد قشم، دانشگاه آزاد اسلامی، قشم، ایران
[b] استادیار گروه بهداشت آبزیان، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استادیار گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[d] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[e] استادیار گروه شیلات، واحد قشم، دانشگاه آزاد اسلامی، قشم، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۱/۲۰
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.3.7.9 DOI: 10.30495/jftn.2023.72437.11242

چکیده

مقدمه: آلودگی مواد غذایی با آفلاتوکسین به عنوان یک چالش در زمینهٔ سلامت و اقتصاد شناخته شده است. از این رو، سازمان‌های جهانی حداقل میزان آلودگی مواد غذایی مختلف را تعیین کرده‌اند. آفلاتوکسین M1 (AFM1) یک مایکوتوکسین سرطان‌زا است که بیشتر در محصولات لبنی یافت می‌شود و حذف آن همچنان به عنوان یک چالش باقی‌مانده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد آفلاتوکسین *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* در شیر بدون چربی آلوده بود.

مواد و روش‌ها: برای این منظور شیر بدون چربی با سه غلظت AFM1 و با دو سطح غلظت باکتری و قارچ به تنهایی یا ترکیبی تیمارگردید و در دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بازه‌های زمانی مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ دقیقه و ۲۴ ساعت) انکوبه شد. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای تشخیص AFM1 در شیر به کار گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که زمان انکوباسیون یک عامل کلیدی در فرآیند حذف AFM1 است. همچنین حذف AFM1 به عوامل دیگری مانند غلظت میکروارگانیسم‌ها، دمای انکوباسیون، غلظت سم و نوع تیمار (به تنهایی یا ترکیب) وابسته بود. توانایی این سویه‌ها برای حذف AFM1 بعد از گذشت ۲۴ ساعت به میزان ۲۰ تا ۹۰ درصد نشان داده شد. حذف AFM1 توسط *ساکارومایسس سرویزیه* (به میزان ۶۶/۸٪) در *مقایسه با بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به مقدار بیشتری (به میزان ۵۱/۳٪) بود و ترکیب پروبیوتیک‌ها توانایی آن‌ها را برای حذف سم (به میزان ۹۰ ٪) افزایش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک‌ها به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر در حذف AFM1 شیر نقش اساسی دارند.

واژه‌های کلیدی: *آفلاتوکسین M1، پروبیوتیک، شیر، HPLC*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Khajehrahimi@yahoo.com, Sohrabi.nakisa@gmail.com

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها[1] (AFs) ، به عنوان مایکوتوکسین‌هایی شناخته شده‌اند که توسط گونه‌های مختلف از جنس آسپرژیلوس تولید می‌شوند و ممکن است در غذاها و خوراک دام‌ها وجود داشته باشند. این امر بر ایمنی مواد غذایی تأثیر می‌گذارد و به همین دلیل، به عنوان یکی از مشکلات عمده در سراسر جهان (به‌ویژه در مناطق با آب و هوای گرمسیری) به دلیل خطرات جدی که برای انسان و حیوانات به دنبال دارد، مورد توجه قرار گرفته‌است (Kumar *et al*., 2017). به طور کلی، چهار توکسین اصلی وجود دارد که به گروه‌های B (B1 و B2) و G (G1 و G2) تقسیم‌بندی شده‌اند. آفلاتوکسین[2] B1 (AFB1)به عنوان یکی از توکسین‌های بسیار سمی معرفی شده‌است و توسط *آسپرژیلوس فلاووس*[3] تولید می‌شود. براساس دسته‌بندی فوق‌الذکر، آفلاتوکسین[4] M1 (AFM1) به عنوان یک متابولیت اصلی هیدروکسیله در گروهAFB1 جای می‌گیرد که به عنوان توکسین اصلی با فراوانی بالا در شیر یافت می‌شود و این توکسین می‌تواند با مصرف لبنیات آلوده به انسان منتقل شود که در حال حاضر، به یک موضوع نگران‌کننده برای بهداشت عمومی به ویژه برای نوزادان مصرف‌کنندهٔ شیر مادر (انسان) تبدیل شده‌است (*Marchese et al*., 2018; Min *Iqbal et al*., *2015*; *et al*., 2020).

بنابراین نظارت بر سطح آفلاتوکسین در محصولات لبنی به منظور کنترل میزانAFM1 (در صورتی که میزان آن زیر حد مجاز باشد)، به دلیل اثرات خطرناک این توکسین مانند جهش‌زایی، تراتوژنی، سرطان‌زایی و سرکوب نمودن سیستم ایمنی میزبان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Negash, 2018 ;Turna and Wu, 2021).

اگرچه در حال حاضر، روش الایزا[5](ELISA) به دلیل حساسیت و سرعت بالا و ارزان بودن آن به عنوان رایج‌ترین روش تحلیلی غربالگری برای کنترل و نظارت سطوح آفلاتوکسین موجود در محصولات لبنی به‌ویژه شیر مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[6] (HPLC) نیز به عنوان یکی دیگر از روش‌هایی شناخته شده‌است که می‌تواند به منظور اهداف غربالگری و تایید حضور یا عدم حضور آفلاتوکسین در مواد غذایی و خوراک دام‌ها (به‌ویژه در محصولات لبنی) به کار گرفته شود (Ismail *et al*., Ehsani *et al*., 2016 ; 2016).

از طرف دیگر، برخی دیگر از روش‌ها به منظور جلوگیری، غیرفعال کردن، حذف یا کاهش میزان آفلاتوکسین در مرحلهٔ قبل و پس از تولید محصول نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Gibellato *et al*., 2021). به عنوان مثال، از جملهٔ روش‌های پس از تولید می‌توان به روش‌های فیزیکی مانند غیرفعال‌سازی حرارتی، اشعهٔ فرابنفش یا استخراج با حلال‌ها اشاره نمود؛ همچنین روش‌های شیمیایی از دیگر روش‌های مورد استفاده در مرحلهٔ پس از تولید محصول هستند که برای کاهش مایکوتوکسین‌ها به کار گرفته می‌شوند و برخی از این روش‌ها عبارتند از کلرزنی و استفاده از اکسیدان یا عوامل هیدرولیتیک (Gibellato *et al*., 2021; Sipos *et al*., 2021). با این حال، این روش‌ها نمی‌توانند توکسین موجود در محصول را به طور کامل حذف کنند؛ زیرا که این روش‌ها گران‌قیمت هستند و منجر به از دست رفتن کیفیت و ویژگی‌های غذایی و حساس محصول می‌شوند. بنابراین، امروزه روش‌های آلودگی‌زدایی زیستی به دلیل ویژگی‌های خود (علاوه بر حفظ کیفیت محصول غذا) مانند کارایی بالا، مقرون‌به‌صرفه بودن، سازگاری با محیط‌زیست و امکان‌پذیر بودن، جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی یا شیمیایی شده‌اند (Gonçalves *et al*., 2020b; Guan *et al*., 2021).

استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک ابزار سم‌زدایی زیستی به دلیل ایمن و ارزان‌بودن و رشد سریع آن‌ها مورد توجه قرار گرفته‌است و این امر باعث شده‌است که محققان و کسانی که در صنعت فعالیت دارند از این میکروارگانیسم‌ها در مقیاس بزرگ و تولیدات تجاری خود استفاده نمایند (Pop *et al*., 2022). همچنین، این میکروارگانیسم‌ها فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوان هستند و به عنوان استارتر/پروبیوتیک در محصولات لبنی و افزودنی‌های غذایی استفاده می‌گردند (Afshar *et al*., 2020). از جمله ویژگی‌های مهم و مفید پروبیوتیک‌ها

[1] Aflatoxins [2] Aflatoxin B1 [3] *Aspergillus flavus*
[4] Aflatoxin M1
[5] Enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA)
[6] High-performance liquid chromatography

می‌توان به خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد سرطانی آن‌ها شاره نمود. به عنوان مثال، جنس بیفیدوباکتریوم[1] به عنوان یکی از رایج‌ترین پروبیوتیک‌های مورد استفاده در صنایع غذایی شناخته شده‌است. علاوه بر این، در میان میکروارگانیسم‌های مختلف حذف‌کنندهٔ توکسین‌ها، *ساکارومایسس سرویزیه* به‌طور گسترده در حذف آفلاتوکسین با اثرات بالقوه پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gonçalves *et al*., 2017; Pires *et al*., 2022). بازدهی و کارای این روش (استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان آلودگی‌زداهای زیستی) می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند سویه، غلظت آفلاتوکسین، تیمار میکروارگانیسم‌ها به تنهایی یا به صورت ترکیبی، زیست‌پذیری یا غیرقابل زیست‌پذیری، pH، دمای انکوباسیون، زمان نگهداری و برهمکنش بین آن‌ها قرار گیرد (GIsmail *et al*., 2017; Gonçalves *et al*., 2017; Karazhiyan *et al*., 2016; Khadivi *et al*., 2020; Sarlak *et al*., 2017).

در صنایع غذایی و محصولات غذایی تولید شده، وجود آفلاتوکسین امری اجتناب‌ناپذیر است و حضور این توکسین در محصولات تحت تأثیر عوامل محیطی می باشد؛ بنابراین، امروزه محققان و صنعتگران در تلاش‌اند تا بتوانند رویکردهایی را به منظور توسعهٔ روش‌های ایده‌آل برای کنترل، تشخیص دقیق و کمی‌سازی توکسین‌ها و متعاقب آن مدیریت خطر آلودگی آفلاتوکسین بیابند.

با توجه به مطالب ذکر شده در فوق و اهمیت موضوع، این پژوهش با هدف بررسی توانایی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*[2] و *ساکارومایسس سرویزیه*[3] به تنهایی یا به صورت ترکیبی در شیر بدون چربی آلوده با سه سطح از غلظت توکسین (۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بررسی اثرات درمانی آن انجام شد. در این مطالعه، با دو سطح غلظت باکتریایی یا قارچی (10^8 CFU/mL و 10^{10}) که به ترتیب در (۴ و ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد) و (۴ و ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) انکوبه شدند تا سطوح AFM1 در بازه‌های زمانی مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ دقیقه و ۲۴ ساعت) با استفاده از HPLC تشخیص داده شود.

مواد و روش‌ها

– تهیه سویه‌های پروبیوتیک

در این مطالعه از سویه قارچی *ساکارومایسس سرویزیه* (ATCC9763) و سویه باکتریایی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* استفاده شد (Igbafe *et al*., 2020). *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط YMB[4] و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (۱٪) در محیط MRS[5] (حاوی مکمل ال–سیستئین ۰/۰۵٪) کشت داده شدند و سپس، مرحلهٔ انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس، محلول استاندارد ۱۰ مک‌فارلند با مخلوط کردن ۹ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۱ میلی‌لیتر کلرید باریم ۱ ٪ تهیه گردید. کدورت سوسپانسیون بر اساس استاندارد ۷ مک فارلند (تقریباً 3×10^9CFU/ml) تنظیم گردیده و سپس، جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر خوانش شد (Rezasoltani *et al*., 2022).

– تهیه محلول‌های AM1

محلول استاندارد AM1 (6795-23-9, Aokin, Germany) با حل کردن پودر (۱۰ میکروگرم) در ۱ میلی‌لیتر استونیتریل تهیه گردید. محلول استاندارد به میزان بیشتری در استونیتریل رقیق شد تا غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آید و در نهایت، این محلول تا زمان استفاده در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (Rezasoltani *et al*., 2022).

– تهیه شیر آلوده و بدون چربی

در این مرحله، ۲۰ گرم پودر شیر بدون چربی (115363, Merck, Germany) به ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. نمونه‌ها پس از ۵ دقیقه هم زدن، در دور ۳۵۰۰ و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از برداشتن لایه کرمی رنگ، نمونه‌ها با سه غلظت مختلف AFM1 (۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد تیمار شدند (Rezasoltani *et al*., 2022).

[1] Bifidobacterium [2] *Bifidobacterium bifidum* [3] *Saccharomyces cerevisiae* [4] Yeast Mold Broth
[5] De-Man-Rogosa-Sharpe

- تیمار شیر بدون چربی با سویه‌های پروبیوتیک

دو غلظت (10^8 CFU/mL و 10^{10}) از سویه‌های مورد آزمایش به تنهایی یا به صورت ترکیبی در ۹ میلی‌لیتر شیر بدون چربی آلوده تلقیح و در دو دمای مختلف (۴ و ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد) و (۴ و ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) به منظور تیمار باکتریایی و قارچی به ترتیب در بازه‌های زمانی مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ دقیقه و ۲۴ ساعت) انکوبه شدند. در نهایت، نمونه‌ها در دور ۲۷۵۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا مایع رویی برای بررسی وجود آفلاتوکسین به‌دست آید.

هر تیمار میکروارگانیسم بر اساس الگوی زیر نام‌گذاری شد (جدول ۱):

- تعیین کمیت AFM1 توسط HPLC

برای شناسایی باقی‌مانده‌های AFM1 در شیر بدون چربی، از سیستم HPLC (Waters Alliance 2695 Separations Module) مجهز به ستون (*Grom Sil* C18 *ODS-5ST*, 5µm×250×4.6mm) استفاده شد (Sarlak *et al*., 2017). در این روش کروماتوگرافی، فاز متحرک شامل آب: متانول: استونیتریل (۶۰:۲۰:۲۰) و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. تحت این شرایط، ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها تزریق شد و توسط دتکتور فلورسانس (water2475) در طول موج‌های ۳۶۵ و ۴۶۵ نانومتر برای تحریک و گسیل شناسایی گردید. درصد AFM1 حذف شده توسط سویه‌ها با رابطهٔ زیر محاسبه شد:

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

- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با حداقل سه تکرار مستقل و با استفاده از تحلیل واریانس اندازه گیری مکرر(ANOVA) انجام شد. از آزمون کرویت Mauchly استفاده گردید و در صورت معنی‌دار بودن مقادیر، گلخانه گیسر یا Huynh-Feldt به‌کار گرفته شد. از نظر آماری $P<0.05$ برای همه آزمایش‌ها معنی‌دار در نظر گرفته شد. آزمون تعقیبی برای مقایسه میانگین‌های حاشیهٔ برآورد شده با استفاده از بونفرونی استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که اثر دورهٔ نگهداری بر حذف AFM1 در مقایسه با سایر متغیرها مانند غلظت سویه‌ها، دمای انکوباسیون و غلظت توکسین معنی‌دار بود، در حالی که درصد حذف تحت تأثیر این عوامل قرار گرفت و در بهترین حالت جزیی‌تر بود. گروه‌هایی که می توانندAFM1 بیشتری را در همهٔ انواع درمان حذف کنند (*بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *ساکارومایسس سرویزیه* و ترکیبی از هر دو).

- تأثیر تیمار بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر حذف AFM1 در شیر بدون چربی

شکل ۱ اثر غلظت باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، دمای انکوباسیون و غلظت توکسین و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر حذف AFM1 توسط *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را* در بازه‌های زمانی مختلف نشان می‌دهد. اثر متقابل BC * Ti (شکل ۱الف)، Tem * Ti (شکل ۱ب) و TC * Ti (شکل ۱پ) به ترتیب بین ۲۱/۸۳-۴۳/۳٪، ۲۲/۰۳-۴۰/۱٪ و ۲۱/۷۵-۴۱/۹٪ قرار داشت. همچنین، مشخص شد که میزان حذف AFM1 با گذشت زمان افزایش‌یافته است. علاوه بر این، میزان حذف توکسین با افزایش غلظت باکتری، دما و غلظت توکسین افزایش یافت. نتیجهٔ مشابهی نیز در اثر متقابل BC*Tem*Ti (شکل ۱ت) و BC*TC*Ti (شکل ۱ث) بر حذف AFM1 مشاهده گردید. بیشترین درصد حذف مربوط به غلظت توکسین ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در10 log CFU/mL و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد بود. حذفAFM1 در ۶۰ دقیقه در مقایسه با بازه‌های زمانی ۳۰ دقیقه و ۲۴ ساعت به طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که در مقایسه با ۱۲۰ دقیقه نتایج معنی‌داری را نشان نداد. نکتهٔ قابل توجه این بود که اثر متقابل سه متغیر بر حذف AFM1 بیشتر از عدم وجود یکی از این عوامل بود. بیشترین درصد حذف AFM1 به ترتیب ۳۷٪ و ۵۱/۳٪ در ۶۰ دقیقه و ۲۴ ساعت مربوط به شیر بدون چربی با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و تیمار با 10 log CFU/mL *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (B.B- 0.5-10) بود (شکل ۱ث).

در مورد B.B-8 نتایج مشابهی در رابطه با دما و غلظت توکسین مشاهده شد که نشان می‌دهد اثر متقابل

جدول ۱- تیمار شیر بدون چربی با سویه‌های پروبیوتیک

Table 1- Treatment of skimmed milk with probiotic strains

Bacterial treatment	Bacterial Concentration	10^{10} and 10^{8} CFU/ml	B.B -8 and B.B-10
	Temperature	4 °C and 37 °C	B.B -4 and B.B-37
	Toxin Concentration	0.1, 0.25, and 0.5 µg/ml	B.B-0.1, B.B-0.25a, and B.B-0.5
Fungal treatment	Fungal Concentration	10^{10} and 10^{8} CFU/ml	S.C-8 and S.C-10
	Temperature	4 °C and 25 °C	S.C-4 and S.C-25
	Toxin Concentration	0.1, 0.25, and 0.5 µg/ml	S.C-0.1, S.C-0.25, and S.C-0.5

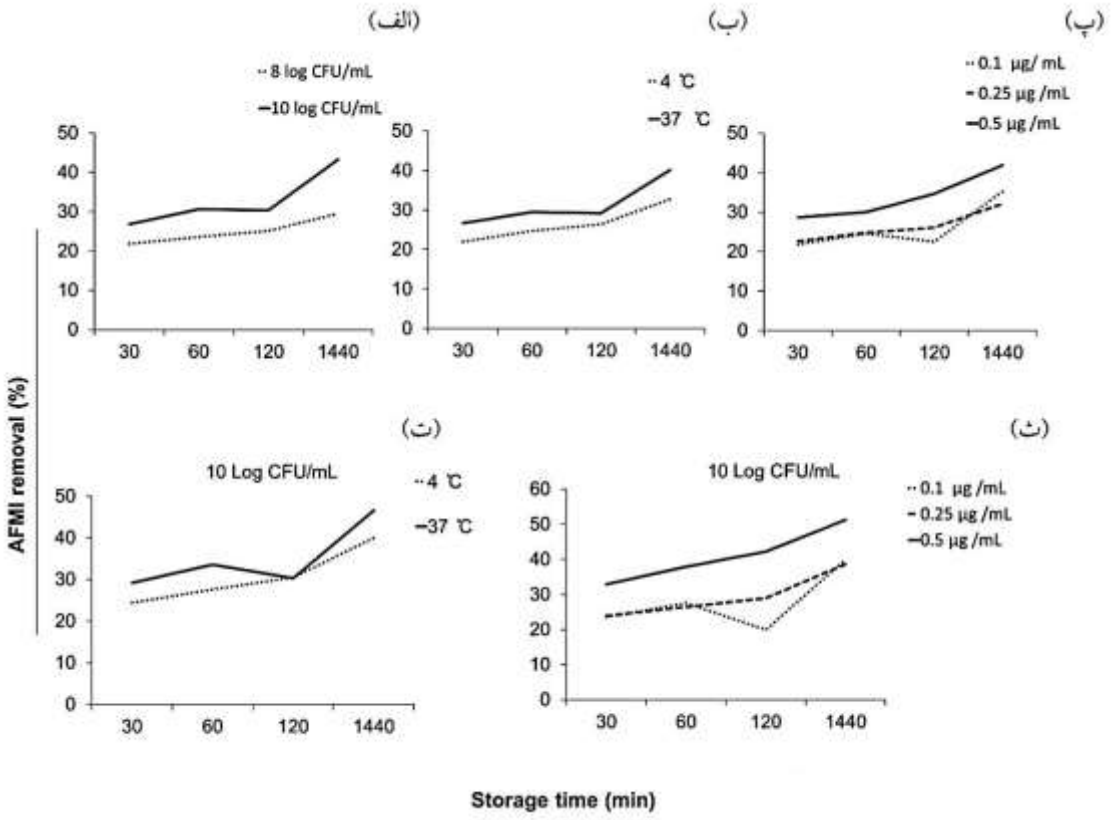

Figure 1- Effect of *Bifidobacterium bifidum* treatment on AFM1 removal in skim milk

شکل ۱- تأثیر تیمار *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر حذف AFM1 در شیر بدون چربی

BC*Tem*Ti و BC*TC*Ti به ترتیب در محدوده ۱۹/۶۶-۳۳/۶٪ و ۲۰-۳۲/۵٪ است. مشخص شد که با افزایش هر دوی آن‌ها (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، حذف AFM1 افزایش یافته و نسبت به B.B-10 کمتر است (شکل ۱ت و ث).

- تأثیر تیمار ساکارومایسس سرویزیه بر حذف AFM1 در شیر بدون چربی

همانطور که در شکل ۲ (الف-پ) مشاهده شد، درصد حذف AFM1 در محدودهٔ ۳۴/۶-۵۷/۹٪، ۳۱/۴۵-۶۰/۷۶٪ و ۳۱-۶۳/۸۵٪ به ترتیب برای برهمکنش (FC*Ti) ، (Tem*Ti) و (TC*Ti) بود. نتایج نشان داد که درصد حذف AFM1 در طول زمان افزایش یافته و بیشترین میزان حذف به سطح عوامل مستقل بستگی دارد. علاوه بر این مشخص شد که با افزایش غلظت قارچ، دما و غلظت توکسین، حذف AFM1 افزایش یافته‌است.

همچنین مشخص شد که اثر متقابل FC*Tem*Ti (شکل ۲ت) و FC*TC*Ti (شکل ۲ث) پتانسیل بیشتری برای کاهش AFM1 در شیر در مقایسه با عدم وجود یکی از عوامل مستقل دارد. میزان درصد بالاتر حذف AFM1 در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در مقایسه با ۴ درجهٔ سانتی‌گراد (۶۰/۹۳٪ در مقابل ۵۴/۸۶٪) در غلظت 10 log CFU/mL بود (شکل ۲ت).

همچنین، بیشترین ظرفیت حذف AFM1 در غلظت 10 log CFU/mL *ساکارومایسس سرویزیه* در ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر (۶۶/۸٪) مشاهده شد (شکل ۲ث). سایر داده‌ها کاهش قابل توجهی درمیزان AFM1 را در ۱۲۰ دقیقه در مقایسه با بازه‌های زمانی ۶۰ و ۳۰ دقیقه نشان دادند. با وجود روند صعودی در طول زمان، کاهش AFM1 در مقایسه با بازهٔ زمانی ۱۲۰ دقیقه معنی‌دار نبود. بنابراین، اتصال موثر در بازهٔ زمانی ۱۲۰ دقیقه در غلظت توکسین ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای 10 log CFU/mL *ساکارومایسس سرویزیه* رخ می‌دهد (S.C-0.5-10).

علاوه بر این، در رابطه باS.C-8 نتیجهٔ مشابهی مربوط به دما مشاهده شد، در حالی که میزان حذف توکسین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۶۰/۶٪ بود که کمتر از S.C-10-25 (حذف به میزان ۶۰/۹۳٪، شکل ۲ت) به‌دست آمد. همچنین، درصد حذف AFM1 پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به یک حالت ثابت (plateau) رسید.

همانطور که در شکل تکمیلی ۱(ت) مشاهده می‌شود، علیرغم نتایج مشابه مربوط به غلظت توکسین در اینجا بالاترین غلظت مربوط به توکسین S.C-8-0.5 منجر به بیشترین میزان حذف AFM1 شده است، اما کاهش میزان AFM1 کمتر ازS.C-10-0.5 بود . همچنین، یک روند نزولی نوسانی در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل تکمیلی ۱ت) مشاهده گردید.

– تأثیر ترکیب تیمارهای بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ساکارومایسس سرویزیه بر حذف AFM1 در شیر بدون چربی

شکل ۳ نتایج ترکیب *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* را در 10 log CFU/mL در حذف AFM1 موجود در شیر بدون چربی آلوده در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر [AFM1(0.5- 37- B.B-10) و (S.C-10-25-0.5)] به عنوان بهترین گروه در بازهٔ زمانی ۲۴ ساعت نشان داد.

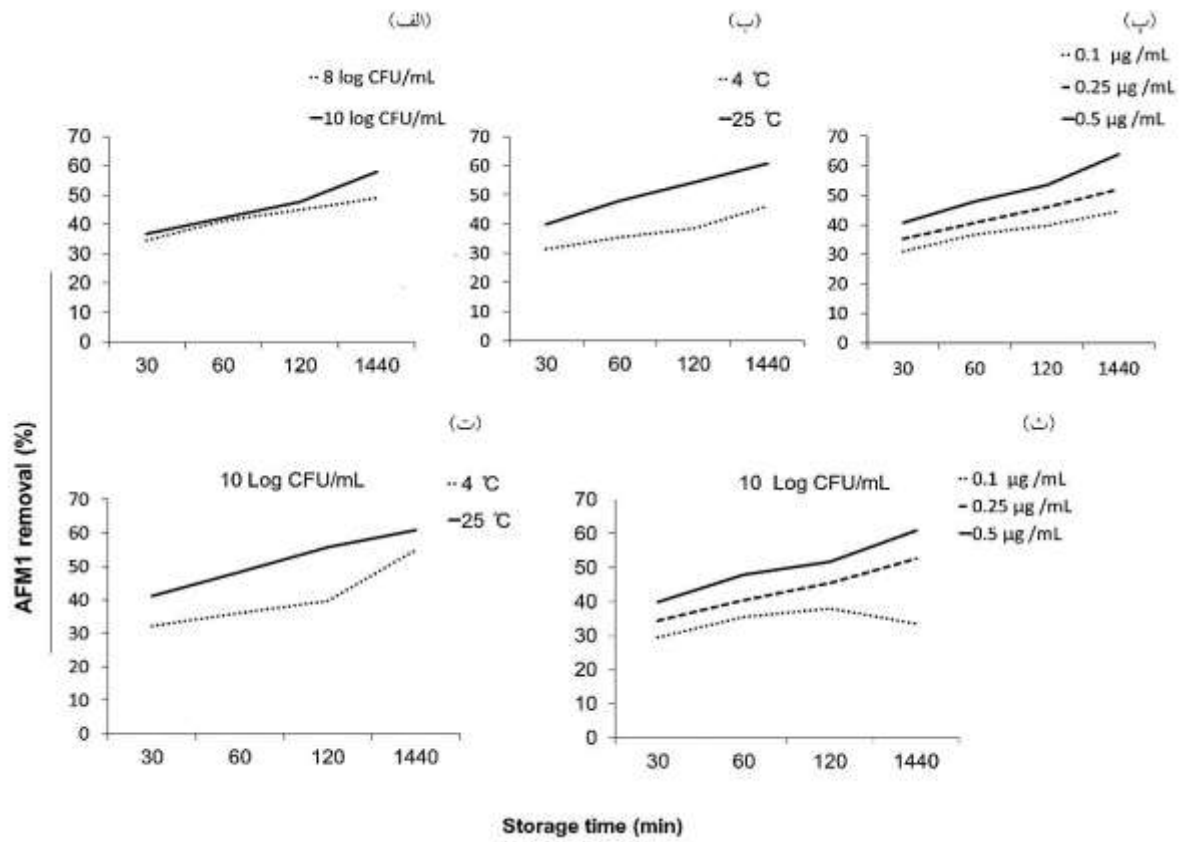

Figure 2- Effect of *Saccharomyces cerevisiae* treatment on AFM1 removal in skim milk.

شکل ۲- تأثیر تیمار *ساکارومایسس سرویزیه* بر حذف AFM1 در شیر بدون چربی

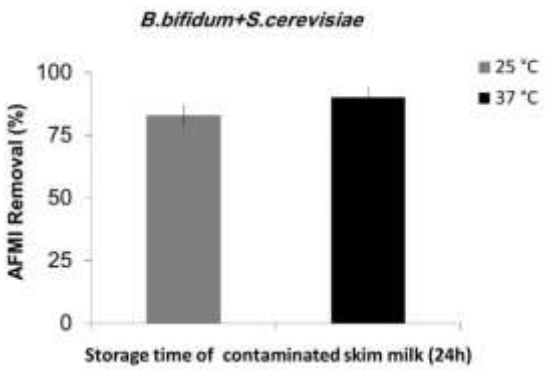

Figure 3- Effect of combination treatments on AFM1 removal in skim milk.

شکل ۳- تأثیر تیمارهای ترکیبی بر حذف AFM1 در شیر بدون چربی

بحث

امروزه، آلودگی غذا و خوراک با آفلاتوکسین به یک نگرانی جهانی برای ایمن بودن مواد غذایی تبدیل شده‌است. بنابراین، استراتژی‌های ایمن و عملی ضد آلودگی و ترکیب آن‌ها برای کنترل خطر آفلاتوکسین مورد نیاز است (Thakur *et al.*, 2022). طی مطالعه‌ای که توسط رحمانی و همکاران (سال ۲۰۲۰) انجام شد، مشخص شد که استفاده از روش‌های میکروبی مانند باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک‌ها و مخمرها یک استراتژی سودمند است. میکروارگانیسم‌هایی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که به دلیل حضور طبیعی در شیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این محققان بیان داشتند که دیواره سلولی این نوع باکتری‌ها در توانایی اتصال آن‌ها بسیار حائز اهمیت است. همچنین آن‌ها معتقدند که پارامترهایی مانند pH، دمای انکوباسیون، غلظت میکروارگانیسم‌ها در شیر و میزان سم می‌تواند بر کارایی میکروارگانیسم‌ها تاثیر بگذارد. به‌طور کلی در این مطالعه قبلی مشخص گردید که روش‌های میکروبی بر جذب و کاهش آفلاتوکسین در شیر موثرند (Rahmani and Faraki, 2020).

در مطالعه حاضر نیز اثر میکروارگانیسم ها، عوامل موثر و مکانیسم‌های این روش‌ها مقایسه شده‌اند. همانطور که ذکر شد، سویه‌های پروبیوتیک به تنهایی یا به صورت ترکیبی در پاسخ به تغییر عوامل مرتبط به منظور ارزیابی روش موثر برای حذف AFM1 از شیر بدون چربی آلوده که به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده بود، استفاده شدند. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان دادند که رابطه بین زمان نگهداری شیر با حذف AFM1 معنی‌دار است و همچنین مشخص گردید که حداکثر میزان حذف در دقایق اول اتفاق می‌افتد. نتایج مطالعهٔ حاضر با سایر مطالعاتی که روند حذف سریع را گزارش نموده‌اند، مطابقت داشت (Serrano-Niño *et al.*, 2013; Namvar Rad *et al.*, 2018). همچنین یافته‌های حاصل از مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که با طولانی شدن زمان نگهداری، حذف AFM1 توسط *ساکارومایسس سرویزیه* افزایش یافت و مخمر زنده تقریباً میزان این حذف را در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۲۱ روز به ترتیب ۷۶٪ و ۷۴٪ نشان داد. همچنین، نتایج حاصل نشان دادند که با افزایش غلظت توکسین از ۱۰۰ به ۷۵۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، حذف AFM1 نیز از ۵۰ به ۹۰٪ افزایش یافت. علاوه بر این مشخص گردید که کاهش AFM1 وابسته به غلظت توکسین بود که درواقع این یافته بر اساس اینکه حداکثر کاهش AFM1 در شیر بدون چربی در بالاترین غلظت توکسین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای *ساکارومایسس سرویزیه* به میزان ۶۶/۸٪ و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به میزان ۵۱/۳٪ مشاهده شد، گزارش گردید (Karazhiyan *et al.*, 2016).

برخلاف نتایج مربوط به غلظت توکسین، سویه‌های غیر زندهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* (با غلظت 10^{10} سلول بر میلی‌لیتر) پس از گذشت ۱ ساعت به ترتیب به میزان ۱۰۰٪ و ۹۲٪ به AFM موجود در شیردر غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ متصل شد. همچنین در راستای نتایج تحقیق حاضر، طی یک مطالعهٔ قبلی حداکثر میزان اتصال برای غلظت بالاتر مخمر (10^{10} در مقابل 10^{8}) گزارش گردید (Ismail *et al.*, 2017).

طی مطالعهٔ دیگری توانایی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* برای حذف AFM1 در PBS آلوده (غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر AFM1) پس از ۲۴ ساعت و ۱۰ روز و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۵۳٪ و ۵۱٪ به دست آمد (در ۴ ساعت اول انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد) (Sevim *et al.*, 2019). نتایج این مطالعهٔ پیشین با نتایج تحقیق حاضر مغایرت نشان داد زیرا که یافته‌های ما حاکی از این بود که اتصال باکتری به AFM1 تحت تأثیر افزایش بازهٔ زمانی قرار نگرفت. چنین نتایج متناقضی ممکن است به دلیل تفاوت در متغیرهای مستقل مانند غلظت توکسین و پروبیوتیک، زمان و دمای انکوباسیون، زنده بودن سلول‌ها و نوع سویه‌ها حاصل شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حذف AFM1 با افزایش غلظت قارچ یا باکتری افزایش یافته‌است. درواقع، نتایج حاصل از پژوهش ما با یک مطالعهٔ قبلی انجام شده توسط مرحمتی زاده و همکاران مطابقت نشان داد (Marhamatizadeh and Goosheh, 2016)؛ زیرا که این محققان در مطالعهٔ خود اثر ترکیبی سه غلظت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و عصارهٔ آویشن را بر کاهش نوشیدنی کفیر AFM1 (شیر تخمیر شده) با غلظت ۲۰۰ ppm مورد بررسی قرار دادند و در نهایت آن‌ها گزارش کردند که کاهش AFM1 در ۴ گرم بر لیتر *آویشن* در غلظت‌های ۶×۱۰^{۸} و $۱۰^{۸}$ به ترتیب منجر به کاهش ۳۶٪ و ۲۶٪ میزان AFM1 شد که حذف بیشتر مربوط به غلظت بالاتر باکتری بود.

علاوه بر این، محققان طی مطالعهٔ دیگری اثر غلظت پروبیوتیک به همراه سویه‌های زنده و غیر زندهٔ پروبیوتیک را بر کاهش میزان AFM1 در PBS (با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۱ روز توسط HPLC مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها حداکثر میزان حذف را در بازه‌های زمانی قبلی نشان دادند. نتایج حاصل از مطالعهٔ آن‌ها همچنین حاکی از این بود که افزایش غلظت پروبیوتیک‌ها از ۳×۱۰^{۹} و $۱۰^{۹}$منجر به حذف AFM1 از ۴۵٪ به ۵۸٪ و از ۶۲٪ به ۷۰٪ برای سویه‌های زندهٔ *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و سویه‌های غیر زندهٔ *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* شد (Abdelmotilib *et al*., 2018). درواقع، مشخص گردید که این یافته‌ها به همراه نتایج حاصل از مطالعهٔ قبلی (Sokoutifar *et al*., 2018) در راستای یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر می‌باشند و به طور کلی همهٔ این نتایج نشان داده‌اند که افزایش غلظت باکتری و دما منجر به افزایش حذف AFM1 شده‌است. ما همچنین دریافتیم که اثر حذف AFM1 توسط *ساکارومایسس سرویزیه* بیشتر از *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* است که این یافته نیز در راستای نتایج بدست آمده از مطالعهٔ Abdelmotilib و همکاران (سال ۲۰۱۸) است. درواقع، این محققان نشان دادند که سویه‌های زندهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با سویه‌های زندهٔ *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* پس از گذشت ۷۲ ساعت قادر است AFM1 را به میزان ۷۹–۶۵٪ حذف نماید.

علاوه بر نتایج بالا، ما دریافتیم که استفاده از ترکیب سویه‌ها منجر به افزایش قابل توجه حذف AFM1 (۹۰٪ در ۲۴ ساعت) می‌گردد که این یافته نیز در راستای نتایج سایر مطالعات بود. درواقع سایر مطالعات نشان دادند که استفاده از *ساکارومایسس سرویزیه* (سویه‌های کشته شده با گرما) به همراه باکتری اسید لاکتیک به ترتیب منجر به حذف AFM1 به میزان ۹۱٪ و ۱۰۰٪ در بازه‌های زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه شد (Corassin *et al*., 2013) و همچنین، مشخص گردید که استفاده از سویه‌های غیر زنده همچون *بیفیدوباکتریوم بیفیدوبوم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوی پلانتاروم*، *کلویورومایسس لاکتیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* قادرند AFM1 موجود در شیر را پس از گذشت بازه‌های زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۸۸/۶۰٪ و ۹۰/۸۸٪ حذف کنند.

همچنین، یافته‌های حاصل از سایر مطالعات نشان داده‌اند که سویه‌های با گرما کشته شدهٔ باکتریایی اسید لاکتیک (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[1] و *لاکتوباسیلوس لاکتیس*[2]) و *ساکارومایسس سرویزیه* قادرند به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر AFM1 موجود در پنیر Frescal را که به مدت ۳۰ روز نگهداری شده‌است، حذف کنند. درواقع توانایی آن‌ها در حذف توکسین مذکور هنگامی که به صورت تنها در روز سی‌اُم و هنگامی که به صورت ترکیبی در روز دهم استفاده می‌شوند، به میزان ۱۰۰٪ است (Gonçalves *et al*., 2020a).

مقایسه سویه‌های زندهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* و تیمار تحت شرایط اسیدی یا حرارتی نشان داد که مخمرهای تیمار شده با حرارت و اسید در مقایسه با ارگانیسم‌های زنده توانایی بیشتری برای کاهش یا حذف AFM1 را دارند که این امر ممکن است به دلیل افزایش نفوذپذیری دیوارهٔ سلولی و قرار گرفتن در معرض جایگاه اتصال یا شکست پیوندهای گلیکوزیدی باشد (Karazhiyan *et al*., 2016).

علاوه بر این، تفاوت در اثربخشی سویه‌های پروبیوتیک برای حذف AFM1 به ساختارهای مختلف دیوارهٔ سلولی مانند پلی ساکارید، اسیدهای تیکوئیک و پپتیدوگلیکان نسبت داده شده است. مکانیسم‌های پیشنهادی ضد آلودگی آفلاتوکسین‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها شامل مهار تولید آفلاتوکسین‌ها (به عنوان مثال توسط جهش‌های ژنی)، تخریب میکروبی و جذب میکروبی است (Guan *et al*., 2021; Muaz *et al*., 2022). تا کنون، مطالعات متعددی برای بررسی پایداری اتصال سلول میکروبی به AM1 انجام شده است (Serrano-

[1] *Lacticaseibacillus rhamnosus*

[2] *Lactococcus lactis*

Niño *et al*., 2013; Panwar *et al*., 2019; Bovo *et al*., 2013). مکانیسم جذب که با اتصال غیر کووالانسی توکسین به اجزای دیواره سلولی همراه است، بیش از مکانیسم‌های دیگر مورد توجه است. به طور کلی، چنین به نظر می‌رسد که توانایی بیشتر برای کاهش میزان AFM1 توسط سویه‌های *بیفیدوباکتریوم* و *ساکارومایسس* نسبت به *لاکتوباسیلوس*، این ارگانیسم‌ها را به عنوان جاذب‌های آفلاتوکسین نسبتاً پایدارتری معرفی نموده‌است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حذف AFM1 از شیر بدون چربی به طور معنی‌داری به زمان انکوباسیون بستگی دارد. درواقع، اتصال سویه‌های پروبیوتیک به AFM1 یک فرآیند سریع است و حداکثر میزان اتصال بین این سویه‌ها و توکسین موردنظر در اولین دقایق تشکیل برهمکنش مشاهده می‌شود. همچنین، مشخص گردید که حذف AFM1 تحت تأثیر سایر متغیرهای بیوفیزیکی مانند غلظت پروبیوتیک، توکسین و دما انجام شد. سایر یافته‌ها نیز حاکی از این بود که میزان درصد حذف AFM1 در شیر آلوده (با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (AFM1) پس از گذشت ۲۴ ساعت توسط *ساکارومایسس سرویزیه* (به میزان ۶۶/۸٪) بیشتر از بیفیدوباکتریوم *بیفیدیوم* (به میزان ۵۱/۳٪) به دست آمد (تیمار در این مرحله با میزان 10^{10} از هر ارگانیسم و در دماهای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد). همچنین، سویه‌های ترکیبی بیشترین میزان حذف AFM1 (۹۰٪) را در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نشان دادند. *ساکارومایسس سرویزیه* منجر به کاهش قابل توجه سطوح AFM1 (به میزان ۵۵/۳٪) پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه شد و این در حالی بود که سویه‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* حداکثر میزان حذف توکسین را پس از گذشت ۶۰ دقیقه (به میزان ۳۷/۹٪) و ۲۴ ساعت (به میزان ۵۱/۳٪) نشان دادند. به‌طور کلی، نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کنند که در صنایع غذایی این پروبیوتیک‌ها و ترکیب آن‌ها با یکدیگر می‌توانند به عنوان یک رویکرد و روش کارآمد برای سم‌زدایی یا به‌عبارتی حذف آفلاتوکسین در غذا و خوراک‌های دامی مورد استفاده قرار بگیرند. با این حال، مطالعات بیشتری برای درک مکانیسم اتصال و عوامل فیزیکوشیمیایی مؤثر بر فعالیت ضد آفلاتوکسینی این پروبیوتیک‌ها مورد نیاز است.

منابع

Abdelmotilib, N. M., Hamad, G. M., Elderea, H. B., Salem, E. G. & El Sohaimy, S. A. (2018). Aflatoxin M1 reduction in milk by a novel combination of probiotic bacterial and yeast strains. *regulation*, 9.

Afshar, P., Shokrzadeh, M., Raisi, S. N., Ghorbani-HAasansaraei, A. & Nnasiraii, L. R. (2020). Aflatoxins biodetoxification strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*, 178**,** 50-58.

Bovo, F., Corassin, C. H., Rosim, R. E. & De Oliveira, C. A. (2013). Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M_1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk.

Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E. & Oliveira, C. A. F. D. (2013). Efficiency of Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food control*, 31**,** 80-83.

Ehsani, A., Barani, A. & Nasiri, Z. (2016). Occurrence of aflatoxin B1 contamination in dairy cows feed in Iran. *Toxin Reviews*, 35**,** 54-57.

Gibellato, S., Dalsoquio, L., Do Nascimento, I. & Alvarez, T. (2021). Current and promising strategies to prevent and reduce aflatoxin contamination in grains and food matrices. *World Mycotoxin Journal*, 14**,** 293-304.

Goncalves, B. L., Goncalves, J. L., Rosim, R. E., Cappato, L. P., Cruz, A. G. D., Oliveira, C. A. F. D. & Corassin, C. H. (2017). Effects of different sources of Saccharomyces cerevisiae biomass on milk production, composition, and aflatoxin M1 excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 100**,** 5701-5708.

Goncalves, B. L., Muaz, K., Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F. & Corassin, C. H. (2020a). Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae strains in Frescal cheese. *Food research international*, 136**,** 109604.

Goncalves, B. L,. Uliana, R. D., Coppa, C. F. S. C., Lee, S. H. I., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F. & Corassin, C. H. (2020b). Aflatoxin M 1: biological decontamination methods in milk and cheese. *Food Science and Technology*.

Guan, Y., Chen, J., Nepovimova, E., Long, M,. Wu, W. & Kuca, K. (2021). Aflatoxin detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxins*, 13**,** 46.

Igbafe, J., Kilonzo-Nthenge, A., Nahashon, S. N., Mafiz, A. I. & Nzomo, M. (2020). Probiotics and antimicrobial effect of Lactiplantibacillus plantarum, Saccharomyces cerevisiae, and Bifidobacterium longum against common foodborne pathogens in poultry. *Agriculture*, 10**,** 368.

Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. & Faizal, A. A. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46**,** 110-119.

Ismail, A., Akhtar, S., Levin, R. E., Ismail, T., Riaz, M. & Amir, M. (2016). Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. *Critical reviews in microbiology*, 42,-418-427.

Ismail, A., Levin, R. E., Riaz, M., Akhtar, S., Gong, Y. Y. & De Oliveira, C. A. (2017). Effect of different microbial concentrations on binding of aflatoxin M1 and stability testing. *Food Control*, 73**,** 492-496.

Karazhiyan, H., Mehraban, S. M., Karazhyan, R., Mehrzad, A. & Haghighi, E. (2016). Ability of different treatments of Saccharomyces cerevisiae to surface bind aflatoxin M1 in yoghurt.

Khadivi, R., Razavilar, V., Anvar, S. & Akbari-Adergani, B. (2020). 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*, 75**,** 63.

Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K. & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology*, 7**,** 2170.

Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S. & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10**,** 214.

Marhamatizadeh, M. H. & Goosheh, S. R. (2016). The combined effect of thymus vulgaris extract and probiotic bacteria (Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum) on aflatoxin M^ sub 1^ concentration in kefir beverage. *Italian Journal of Food Science*, 28**,** 517.

Min, L., Li, D., Tong, X., Sun, H., Chen, W., Wang, G., Zheng, N. & Wang, J. (2020). The challenges of global occurrence of aflatoxin M1 contamination and the reduction of aflatoxin M1 in milk over the past decade. *Food Control*, 117**,** 107352.

Muaz, K., Riaz, M., Oliveira, C. A. F. D., Akhtar, S., Ali, S. W., Nadeem, H., Park, S. & Balasubramanian, B. (2022). Aflatoxin M1 in milk and dairy products: Global occurrence and potential decontamination strategies. *Toxin reviews*, 41**,** 588-605.

Namvar Rad, M., Razavilar, V., Anvar, S. A. A. & Akbari-Adergani, B. (2018). Selected bio-physical factors affecting the efficiency of Bifidobacterium animalis lactis and Lactobacillus delbrueckii bulgaricus to degrade aflatoxin M١ in artificially contaminated milk. *Journal of Food Safety*, 38**,** e12463.

Negash, D. (2018). A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. *Journal of Applied Microbiological Research*, 1**,** 35-43.

Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Ram, C. & KAPILA, R. (2019). Aflatoxin M 1 detoxification ability of probiotic Lactobacilli of Indian origin in in vitro digestion model. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11**,** 460-469.

Pires, R. C., Portinari, M. R., Moraes, G. Z., Khaneghah, A. M., Goncalves, B. L., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. & Corassin, C. H. (2022). Evaluation of Anti-Aflatoxin M1 effects of heat-killed cells of Saccharomyces cerevisiae in Brazilian commercial yogurts. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 14,75-81.

Pop, O. L., Suharoschi, R. & Gabbianelli, R. (2022). Biodetoxification and protective properties of probiotics. *Microorganisms*, 10**,** 1278.

Rahmani, F. and Faraki, A., (2020). Microbial methods effect on adsorption and reduction of Aflatoxin contamination in milk.*Food& Health Journal*, 13-18.

Rezasoltani, S., Ebrahimi, N. A., Boroujeni, R. K., Aghdaei, H. A. & Norouzinia, M. (2022). Detoxification of aflatoxin M1 by probiotics Saccharomyces boulardii, Lactobacillus casei, and Lactobacillus acidophilus in reconstituted milk. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*.

Sarlak, Z., Rouhi, M., Mohammadi, R., Khaksar, R., Mortazavian, A. M., Sohrabvandi, S. & Garavand, F. (2017). Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). *Food control*, 71**,** 152-159.

Serrano-Nino, J., Cavazos-Garduno, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M., San Martin-Gonzalez, M. & Garcia, H. (2013). Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food control*, 31**,** 202-207.

Sevim, S., Topal, G. G,. Tengilimoglu-Metin, M. M., Sancak, B. & Kizil, M. (2019). Effects of inulin and lactic acid bacteria strains on aflatoxin M1 detoxification in yoghurt. *Food control*, 100**,** 235-239.

Sipos, P., Peles, F., Brasso, D. L., Beri, B., Pusztahelyi, T., Pocsi, I& . Gyori, Z. (2021). Physical and chemical methods for reduction in aflatoxin content of feed and food. *Toxins*, 13**,** 204.

Sokoutifar, R., Razavilar, V., Anvar, A. A. & Shoeiby, S. (2018). Degraded aflatoxin M1 in artificially contaminated fermented milk using Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus plantarum affected by some bio-physical factors. *Journal of food safety*, 38**,** e12544.

Thakur, S., Singh, R., De, P. & Dey, A. (2022). Aflatoxins in feeds: Issues and concerns with safe food production. *Indian Journal of Animal Health***,** 2.

Turna, N. S. & Wu, F. (2021). Aflatoxin M1 in milk: A global occurrence, intake, & exposure assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 110**,** 183-192.

Efficiency of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* for Detoxification of Aflatoxin M1 in Skim Milk Using HPLC Analysis

M. Fakhrabadi [a], A. E. Khajehrahimi [b]*, N. Sohrabi Haghdoost [c]*, S. A .A. Anvar [d], M. Tala [e]

[a] PhD Student of the Department of Food Hygiene, Qeshm Branch, Islamic Azad University, Qeshm, Iran.

[b] Assistant Professor of the Department of Aquatic Hygiene, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Assistant Professor of the Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[d] Assistant Professor of the Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[e] Assistant Professor of the Department of Fisheries, Qeshm Branch, Islamic Azad University, Qeshm, Iran.

Received: 14 March 2023 Accepted: 9 April 2023

Abstract

Introduction: Food contamination with aflatoxin is identified as a challenge for health and economics; therefore, global organizations have determined the minimum contamination of different foods. Aflatoxin M1 (AFM1) is a carcinogenic mycotoxin mostly found in dairy products and its removal has remained a challenge. This study aimed to evaluate the effect of anti-aflatoxin of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* in contaminated skim milk.

Materials and Methods: In order to carry out this project, skim milk was spiked with three concentrations of AFM1 and treated with two levels of bacteria and fungi concentration, alone or mixed, and incubated at 4 and 37 ˚C for different time points (30, 60, 120 min, and 24h). High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the AFM1 in milk.

Results: The results showed that the incubation time is a key factor in the removal process of AFM1. Also, the removal of AFM1 was dependent on other factors such as the concentration of microorganisms, incubation temperature, toxin concentration and type of treatment (alone or combination). The ability of these strains to remove AFM1 after 24 hours was shown to be 20-90%. The removal of AFM1 by *Saccharomyces cerevisiae* (66.8%) as compared to *Bifidobacterium bifidum* (51.3%), and the combination of probiotics increased their ability to remove the toxins (90%).

Conclusion: The results of this study showed that probiotics alone or in combination with each other play an essential role in removing AFM1 from milk.

***Keywords**: Aflatoxin M1, HPLC, Milk, Probiotic.*

* Corresponding Author: Khajehrahimi@yahoo.com; sohrabi.nakisa@gmail.com