اتصال سم افلاتوکسین M1 به باکتریهای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* در دوغ وسنجش آن به روش کمی سازی HPLC

رقیه سکوتی فر[۱]، ودوود رضویلر[۲]، سیدامیرعلی انوار[۲*]، شهرام شعیبی[۳]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات آزمایشگاهی دارو و غذا، سازمان دارو و غذا، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
[*]نویسنده مسئول: *saaa4824@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۰۶

چکیده

مواد غذایی مختلف از جمله محصولات لبنی ممکن است با آفلاتوکسین آلوده باشند که حتی در مقادیر اندک تأثیرات مضر بر روی سلامت انسان و حیوانات دارند. تعداد محدودی پروبیوتیک به آفلاتوکسین‌های موجود در مواد غذایی و خوراکی متصل می شوند و یا آن را تجزیه می کنند. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و ترکیبی از آنها بر حذف یا اتصال با آفلاتوکسین M1 در محیط دوغ بود. در این تحقیق، ۷۲ گروه تیمار و شاهد در سه تکرار تهیه شد. گروه‌ها عبارت بودند از گروه باکتری، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ، *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و ترکیبی از این دو و نهایتا با یک گروه غیر باکتریایی به عنوان کنترل (به طور کلی ۴ گروه). دوغ تهیه شده در دماهای مختلف (۴، ۲۱ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) برای ۲، ۱۱ و ۳۰ روز نگهداری شد. بالاترین میزان کنترل سم افلاتوکسین در محیط کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر فاکتور باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت دوغ صنعتی در همه دماهای مورد سنجش و در تمامی روزها بود. پس از روز صفر در روزهای دوم (۰/۸۶±۱۰۰/۰۰)، یازدهم (۱/۲۷±۱۰۰/۰۰) و سی‌ام (۰/۶۰±۱۰۰/۰۰) نتایج حاصله همواره بالاترین میزان کنترل سم افلاتوکسین را نشان داد. نتایج دلالت بر امنیت غذایی بهتر در استفاده از دوغ صنعتی دارد.

کلید واژه ها: آفلاتوکسین، دوغ، سم‌زدایی، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط تعدادی از گونه‌های آسپرژیلوس، شامل *Aspergillus flavus*، *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus nomius* می باشند (Sepahdari et al., 2010). بروز آفلاتوکسینها در سراسر جهان متداول است، اما معمولاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به دلیل شرایط آب و هوایی گرم‌تر شرایط مناسب برای تولید افلاتوکسین توسط قارچها بیش تر است (Zinedine et al., 2005). آلودگی قارچی ممکن است در طول رشد، برداشت، حمل و نقل یا ذخیره‌سازی رخ دهد که منجر به تولید آفلاتوکسین می‌شود. در این میان، افلاتوکسین M1 که از شیر و سایر فرآورده‌های لبنی گزارش شده است می‌تواند در بروز انواع بیماری‌ها بخصوص سرطان-ها در انسان تأثیرگذار باشد (Abbès et al., 2013). پروبیوتیک‌ها از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک میتوانند با استفاده از اتصال فیزیکی سموم را از محیط مایع حذف و در کاهش سموم در مواد غذایی همچون شیر و سایر فرآورده‌های لبنی نقش مهمی داشته باشند. پایداری ترکیبات آفلاتوکسین همراه با گونه‌های باکتریایی در هر دو شکل زنده و غیر زنده (به صورت گرمایی یا اسیدی) مورد بررسی قرار گرفته اند (Haskard et al., 2001). در مطالعه ای نقش تئی کوئیک اسیدهای موجود بر روی دیواره سلولی باکتری-ها در اتصال به آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت (Hernandez et al., 2009). اخیراً مشخص شد که گونه‌های لبنی *لاکتوباسیل* می توانند آفلاتوکسین‌ها را

از محلول‌های آبی یا شیر حذف کنند (El-Nezami et al., 1998). مهم‌ترین نقش این مواد تولید اسیدهای عالی در محیط مواد غذایی و افزایش ماندگاری آن و نیز تغییر خواص حسی آن ماده می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر پروبیونیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و ترکیبی از آنها بر حذف یا اتصال با آفلاتوکسین M1 در محیط دوغ بوده است.

روش کار

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و آماده‌سازی سوسپانسیون‌های باکتریایی

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (PTCC 1058) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر به محیط (MRS broth) که از شرکت (Merck (Germany تهیه شده بود در دمای ۳۷ درجه به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بیهوازی کشت داده شد (Hernandez et al., 2009) . سپس سانتریفیوژ شده (۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳-۲ دقیقه) و رسوب آن به محیط نوترینت برات همراه ۱۸ ٪ گلیسرول به صورت ویال در دمای ۲۰- در نگهداری شد (Haskard et al., 2001).

از ویال هر دو باکتری مذکور، ابتدا درمحیط MRS broth در دمای ۳۷ درجه به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی برده شد. پس از رشد فاز لگاریتمی به محیط کشت MRS Agar (Merck) منتقل و پس از ۷۲ ساعت سوسپانسیون باکتری‌ها بوسیله PBS (سیناژن) تهیه شد.

غلظت سوسپانسیون باکتری‌ها با روش اسپکتوفتومتری و استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml) سنجیده شد و به میزان ۱:۱۰۰ رقیق شد و در نهایت سوسپانسیون دارای ۱×۱۰^{۴} جهت انجام ازمایش انتخاب گردید.

آلودگی نمونه‌های دوغ به آفلاتوکسین و تلقیح باکتری

دوغ‌های تجاری از نوع صنعتی و سنتی در بطری ۱/۵ لیتری از شرکت پگاه تهیه شد. دوغ‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه برای اطمینان از عدم وجود باکتری حرارت داده شدند. برای هردو نوع دوغ مذکور، آفلاتوکسین M1 اضافه شد تا به حد مورد نظر آزمایش (۱۸۰ pg/ml) برسد. به دوغ‌های آماده شده ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* جداگانه و ترکیبی از هر دو باکتری به ۱۰۰ میلی‌لیتر دوغ اضافه شد. سپس در دماهای ۴، ۲۱ و ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت، ۱۱روز و ۳۰ روز نگهداری گردید. در نهایت برای تعیین مقدار باقیمانده آفلاتوکسین M1، از روش HPLC استفاده گردید.

درصد افلاتوکسین M1 نمونه‌ها از طریق فرمول زیر بدست می‌اید:

$$\%AFM1 = 1 - \frac{\text{میزان افلاتوکسین}}{\text{مقدار روز صفر}} \times 100$$

کمی سازی HPLC افلاتوکسین M1

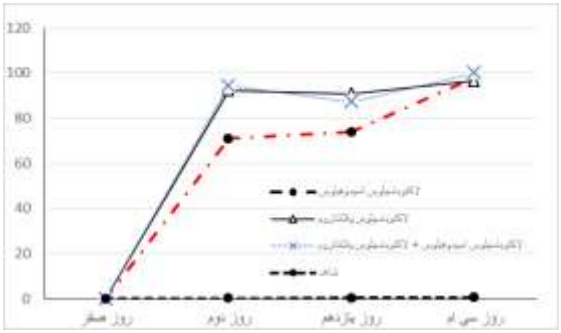
آفلاتوکسین M1 به صورت محلول استاندارد در استونیتریل (Sigma-Aldrich ,49319- USUPELCO) با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه گردید و به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی در دمای خنک انتقال داده شد و برای افزودن به دوغ آماده گردید. پس از تعیین مقدار به وسیله اسپکتوفتومتری غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر در آب و استونیتریل به نسبت ۲۵:۷۵ تهیه گردید. برای هر تکرار در آزمون HPLC 216 عدد لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری برای یک غلظت سم در زمان‌های ۴۸ ساعت، ۱۰ روز و ۳۰ روز، به همراه دو روش تولید دوغ سنتی و صنعتی استفاده گردید.

روش آماری

در این مطالعه از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و تست توکی استفاده گردید.

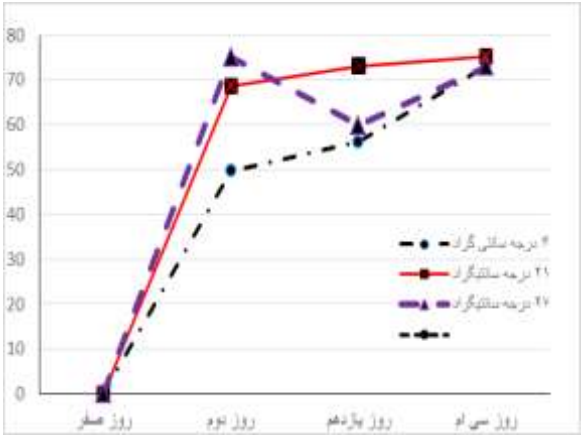
نتایج

با بررسی آماره‌های بدست آمده در نمودار ۱ مشخص میگردد که بالاترین درصد حذف سم افلاتوکسین در محیط دوغ، تحت تأثیر دو تیمار *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌باشد. به طوری‌که از میزان (۹۴/۳۸±۰/۳۵) در روز دوم با کاهشی ناچیز در روز یازدهم (۸۷/۱۹±۰/۵۲) به نقطه اوج خود در روز سی‌ام رسیده است (۱۰۰/۰۰±۰/۲۵).



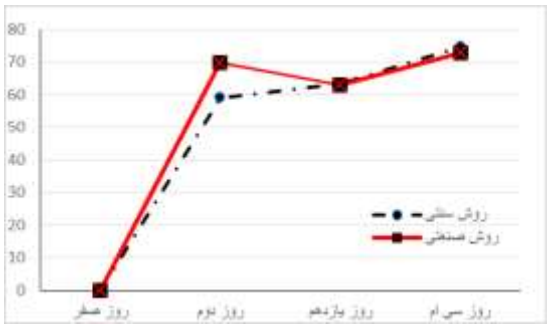
نمودار ۱- اثر متقابل میانگین حاشیه تخمینی زمان × باکتری

اثر متقابل میانگین حاشیه تخمینی زمان × دما در نمودار ۳ نشان داده شده است، با توجه به این نمودار، بالاترین درصد حذف سم آفلاتوکسین در محیط دوغ مورد پژوهش در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد بوده است. به‌طوری‌که از



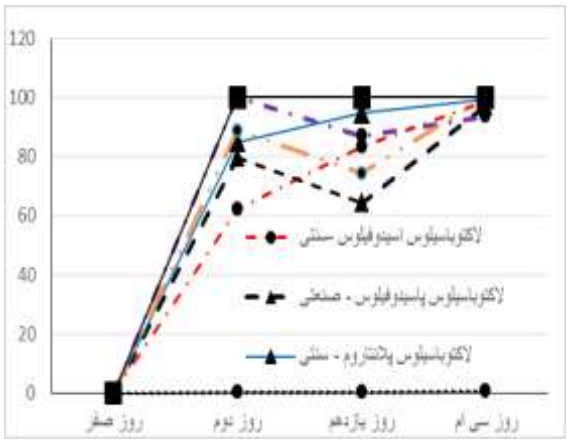
نمودار ۳- اثر متقابل میانگین حاشیه تخمینی زمان × دما

همچنین بالاترین درصد حذف سم آفلاتوکسین در محیط دوغ تحت تأثیر از دوغ تهیه شده با روش سنتی بوده است. به‌طوری‌که از میزان (۵۹/۰۴±۰/۲۵) در روز دوم با شیبی ملایم در روز یازدهم (۶۳/۲۴±۰/۳۷) به نقطه اوج خود در روز سی‌ام نسبت به روش تهیه دوغ صنعتی رسیده است (۷۴/۶۶±۰/۱۷) (نمودار ۲).



نمودار ۲- اثر متقابل میانگین حاشیه تخمینی زمان × روش تهیه دوغ

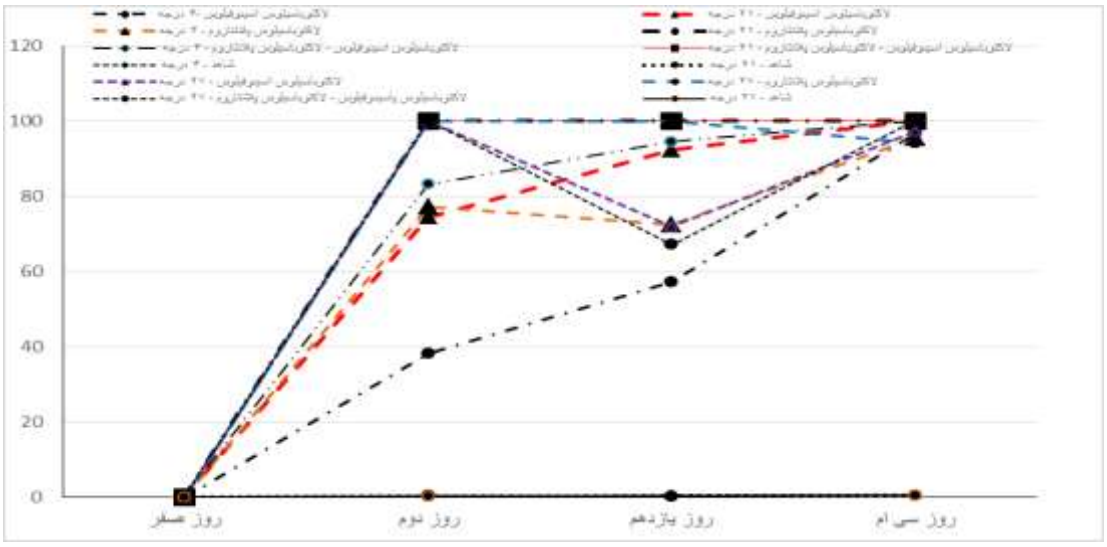
میزان (۶۸/۶۸±۰/۳۰) در روز دوم با شیبی نسبتا تند در روز یازدهم (۷۳/۱۱±۰/۴۵)، به نقطه اوج خود در روز سیام نسبت به سایر دماهای محیط کشت پژوهش رسیده است (۷۲/۹۷ ±۰/۲۱).



نمودار ۴- اثر متقابل میانگین حاشیه تخمینی زمان × نوع باکتری× روش تهیه دوغ

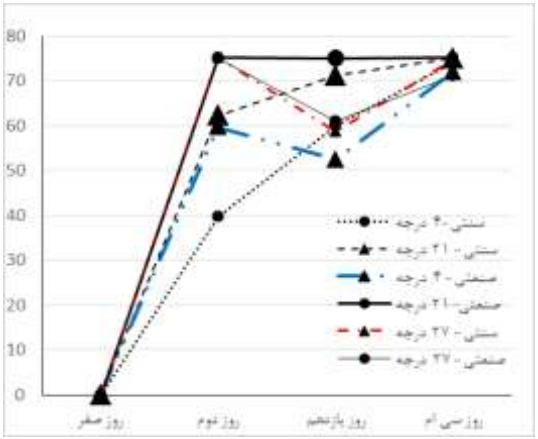
با توجه به نتایج بررسی اثر متقابل میانگین حاشیه تخمینی زمان × نوع باکتری × روش تهیه دوغ (نمودار ۴) مشخص میگردد که بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین در محیط کشت دوغ مورد پژوهش تهیه شده با روش صنعتی و تحت تأثیر تیمار *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده است. چنانچه پس از روز صفر، روزهای دوم (۰/۵۰±۱۰۰/۰۰)، یازدهم (۰/۷۳±۱۰۰/۰۰) و سی‌ام (۰/۳۵±۱۰۰) بالاترین میزان حذف سم آفلاتوکسین را نشان می‌دهد.

با بررسی آماره‌های بدست آمده از اثر متقابل میانگین حاشیه ای تخمینی زمان × نوع باکتری × دما (نمودار ۵) شخص میگردد که بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین در محیط کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر تیمارهای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس + لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و نیز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به تنهایی در دمای محیط کشت ۲۱ درجه سانتی‌گراد بوده است. چنانچه پس از روز صفر، در روزهای دوم (۰/۶۱±۰۰/۱۰۰)، یازدهم (۰/۹۰±۱۰۰/۰۰) و سی‌ام (۰/۴۳±۱۰۰) بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین را نشان داده است.



نمودار ۵- اثر متقابل میانگین حاشیه ای تخمینی زمان × نوع باکتری× دما:

اثر متقابل میانگین حاشیه‌ای زمان× روش تهیه دوغ× دما در نمودار ۶ نشان داده شده است. با توجه به این نمودار، بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین در محیط کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر روش تهیه دوغ صنعتی در دمای محیط کشت ۲۱ درجه سانتی‌گراد بوده است.
چنانچه پس از روز صفر در روزهای دوم (۰/۴۳±۷۳/۱۰)، یازدهم (۰/۶۳±۷۵/۰۷) و سی‌ام (۰/۳۰±۷۵/۱۸) با اختلاف‌های بسیار ناچیزی از هم، بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین را نشان داد.



نمودار ۶- اثر متقابل میانگین حاشیه ای زمان× روش تهیه دوغ× دما

برآورد میانگین‌های حاشیه‌ای اثر متقابل زمان × روش تهیه دوغ× دما × باکتری در جدول ۱ مشخص شده است. چنانچه، بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین در محیط کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر فاکتور باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت دوغ صنعتی در همه دماهای مورد سنجش و در تمامی روزها بوده است .چنانچه پس از روز صفر در روزهای دوم (۱۰۰/۰۰±۰/۸۶)، یازدهم (۱۰۰/۰۰±۱/۲۷) و سی‌ام (۱۰۰±۰/۶۰) همواره بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین را نشان داد. لازم به ذکر است همین روند در محیطهای کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر تحت تأثیر فاکتور باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت دوغ سنتی در دمای مورد سنجش ۲۱ درجه و در تمامی روزها (روزهای دوم (۱۰۰/۰۰±۰/۸۶)، یازدهم (۱۰۰/۰۰±۱/۲۷) و سی‌ام (۱۰۰±۰/۶۰) همواره بالاترین میزان کنترل سم آفلاتوکسین را نشان داد. لازم به ذکر است همین روند در محیطهای کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر تحت تأثیر فاکتور باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت دوغ سنتی در دمای مورد سنجش ۳۷ درجه و در تمامی روزها (روزهای دوم (۱۰۰/۰۰±۰/۸۶)، یازدهم (۱۰۰/۰۰±۱/۲۷) و سی‌ام (۱۰۰±۰/۶۰) بوده است.

ازطرف دیگر این روند در محیطهای کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر تحت تأثیر فاکتور باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت دوغ سنتی و صنعتی در دمای مورد سنجش ۲۱ درجه و در تمامی روزها (روزهای دوم (۱۰۰/۰۰±۰/۸۶)، یازدهم (۱۰۰/۰۰±۱/۲۷) و سی‌ام (۱۰۰±۰/۶۰) مشاهده شد. در انتها این روند را نیز در محیطهای کشت دوغ مورد پژوهش تحت تأثیر تحت تأثیر فاکتور باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محیط کشت دوغ سنتی و صنعتی به ترتیب در دمای مورد سنجش ۳۷ و ۲۱ درجه و در تمامی روزها (روزهای دوم (۱۰۰/۰۰±۰/۸۶)، یازدهم (۱۰۰/۰۰±۱/۲۷) و سی‌ام (۱۰۰±۰/۶۰) مشاهده شد.

جدول ۱- برآورد میانگین‌های حاشیه ای: اثر متقابل زمان× روش تهیه دوغ× دما × باکتری

نوع باکتری	روش تهیه دوغ	دمای محیط	زمان	خطای استاندارد ± میانگین
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	سنتی	۴ درجه	روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
			روز دوم	۸۳/۱۳±۰/۸۶
			روز یازدهم	۶۶/۱۷±۱/۳۷
			روز سی‌ام	۹۶/۵۷±۰/۶۰
		۲۱ درجه	روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
			روز دوم	۴۸/۷۷±۰/۸۶
			روز یازدهم یازدهم	۸۴/۴۰±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
		۳۷ درجه	روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
			روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
	صنعتی	۴ درجه	روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
			روز دوم	۳۸/۴۳±۰/۸۶
			روز یازدهم	۴۸/۲۷±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۹۶/۸۰±۰/۶۰
		۲۱ درجه	روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰

			روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۳۷ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۴۴/۰۱±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۹۴/۲۸±۰/۶۰
			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۴ درجه	روز دوم	۵۴/۵۷±۰/۸۶
			روز یازدهم	۸۴/۲۰±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۲۱ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
	سنتی		روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۳۷ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
لاکتوباسیلوس			روز سی‌ام	۹۸/۱۴±۰/۶۰
پلانتاروم			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۴ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۶۰/۸۷±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۹۰/۶۷±۰/۶۰
			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۲۱ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
	صنعتی		روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
			روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
		۳۷ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
			روز یازدهم	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
			روز سی‌ام	۱۸.۹۰±۰/۶۰
لاکتوباسیلوس	سنتی	۴ درجه	روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
			روز دوم	۶۶/۲۷±۰/۸۶

		روز یازده	۸۹/۰۰±۱/۲۷
		روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
		روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
	۲۱ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
		روز یازده	۱۰۰/۰۰±۱/۲۷
		روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰
		روز صفر	۰/۰۰±۰/۰۰
	۳۷ درجه	روز دوم	۱۰۰/۰۰±۰/۸۶
		روز یازده	۳۴/۱۴±۱/۲۷
		روز سی‌ام	۱۰۰/۰۰±۰/۶۰

بحث

هدف این تحقیق بررسی تأثیر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و ترکیب این دو در اتصال به آفلاتوکسین M1 در محیط دوغ به عنوان یک محصول لبنی تخمیر شده و اندازه گیری مقادیر باقی مانده آفلاتوکسین M1 با روش کروماتوگرافی مایع بوده است. یکی از مهم ترین توانمندی‌ها در اسید لاکتیک باکتری‌ها در اتصال به آفلاتوکسینM1 می‌تواند ناشی از خاصیت لایه آب گریز موجود در سطح این باکتری‌ها از جمله *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باشد (Ahlberg et al., 2015; Haskard et al., 2001). بر اساس نتایج ، با افزایش دما نقش سم‌زدایی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در اتصال به آفلاتوکسینM1 در محیط افزایش می یابد. به عبارتی می توان گفت توانایی این پروبیوتیک در اتصال به مایکوتوکسین با افزایش دما رابطه مستقیمی دارد. به‌طوری‌که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از روز دوم میزان درصد اتصال به آفلاتوکسین M1 به ۱۰۰ درصد می رسد و این میزان تا روز سی‌ام همچنان ۱۰۰ درصد باقی مانده است. مشابه با کارهای قبلی (Adamberg et al., 2003; Sokootifar et al., 2018) نتایج دلالت بر الگویی مشابه در نتایج با الایزا دارد و نتایج الایزا نیز بیشترین توانایی این باکتری در حذف آفلاتوکسین M1 در دوغ‌های سنتی را دمای ۳۷ درجه ثبت کرده است. بالاترین توانایی (۱۰۰ درصد حذف افلاتوکسین M1) در اتصال *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به آفلاتوکسین M1 در محیط دوغ تهیه شده به روش صنعتی صرفا در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاده است که با نتایج الایزای ما متفاوت بوده و روش الایزا بیشترین تأثیر گذاری را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت نموده است. حذف آفلاتوکسین چه در دوغ سنتی یا صنعتی در همان روزهای اول اتفاق افتاده است. این یافته با نتایج سایر محققین (Sarlak et al., 2017) که نشان دادند در همان ساعات اولین حذف بالایی از آفلاتوکسین M1 اتفاق می‌افتد مشابهت دارد. در تشابه با نتایج این تحقیق، محققین دیگری (Adibpour et al., 2016) مشاهده کردند میزان حذف سم آفلاتوکسین M1 توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محیط ماست در همان ساعت‌های اول بالا بوده و با افزایش زمان نگهداری تا روز بیست وپنج ام این میزان حذف از ۹۰ درصد بیش تر شده است. بر خلاف نتایج *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

چه در دوغ‌های سنتی و چه در دوغ‌های تهیه شده به روش صنعتی بیشترین توانایی خود را در اتصال به آفلاتوکسین M1 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داده است. این باکتری توانسته است در محیط سرم جنین گاوی در همان ۲۴ ساعت اول مواجهه، به بیش از ۸۹ درصد از آفلاتوکسین M1 متصل گردد (Assaf et al., 2018; Jebali et al., 2015).. تحقیق ما نشان داد که با افزایش دما قابلیت‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در حذف آفلاتوکسین M1 افزایش می‌یابد. این نتیجه با یافته دیگری (Jebali et al., 2015) همسو بود که نشان داد با افزایش دما، دیواره سلولی این باکتری به سمت آب گریزی سوق پیدا می‌کند و در نتیجه افزایش اتصال با آفلاتوکسین M1 را موجب می‌شود. در تحقیق ما ترکیب این دو باکتری نشان داد بیشترین توانایی جهت اتصال به آفلاتوکسین M1 (۱۰۰ درصد) در دوغ سنتی در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاده است، حال آنکه این مقدار در دوغ‌های صنعتی در تمام دماها از ۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میزان ۱۰۰ درصد خواهد بود. این یافته با نتایج سایر محققین که اشاره داشتند با کاهش دما توانمندی پروبیوتیک در اتصال به آفلاتوکسین M1 کاهش می یابد در تناقض می باشد (Zinedine et al., 2005; El-Nezami et al., 1998).

نتیجه گیری نهایی این تحقیق نشان داد که ترکیب پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بهتر از هر یک از این پروبیوتیک‌ها قادر است تا به آفلاتوکسین M1 در محیط دوغ متصل گردد. دوغ سنتی به دلیل آنکه از همان روز اول تولید در تمام دماهای ۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مواجهه با ترکیب این دو پروبیوتیک بیشترین تأثیرگذاری را در حذف آفلاتوکسین M1 دارد.

منابع

1. Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Sharafi, H., Jebali, R., Noghabi, K.A., Oueslati, R. 2013. Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM1 *in vitro* and to counteract AFM1 immunotoxicity in vivo, J. Immunotoxicol. 10: 279-286.
2. Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.M., Paalme, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study, Int J Food Microbiol. 85: 171-183.
3. Adibpour, N., Soleimanian-Zad, S., Sarabi-Jamab, M., Tajalli, F. 2016. Effect of storage time and concentration of Aflatoxin M1 on toxin binding capacity *of L. acidophilus* in fermented milk product, J Agricul Sci Technol. 18: 1209-1220.
4. Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V., Korhonen, H.J. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation, Int J Food Microbiol. 207: 87-102.
5. Assaf, J.C., Atoui, A., Khoury, A.E., Chokr, A., Louka, N. 2018. A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG, Braz. J. Microbiol. 49: 120-127.
6. El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B 1, Food Chem. Toxicol. 36: 321-326.
7. Jebali, R., Abbes, S., Salah-Abbes, J.B., Younes, R.B., Haous, Z., Oueslati, R. 2015. Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B1 and M1) immunotoxicities in mice, J Immunotoxicol. 12: 290-299.
8. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria, Appl. Environ. Microb. 67: 3086-3091
9. Hernandez Mendoza, A., Guzman de Peña, D., Garcia, H.S. 2009. Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by

probiotic bacteria, J. Appl. Microbiol. 107: 395-403.
10. Sarlak, Z., Rouhi, M., Mohammadi, R., Khaksar, R., Mortazavian, A.M., Sohrabvandi, S., et al. 2017. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh), Food Control. 71: 152-159.
11. Sepahdari, A., Ebrahimzadeh Mosavi, H.A., Sharifpour, I., Khosravi, A., Motallebi, A.A., Mohseni, M., et al. 2010. Effects of different dietary levels of AFB1 on survival rate and growth factors of Beluga (Huso huso), Iran J. Fish. Sci. 9:141-150.
12. Sokootifar, R., Razavilar, V., Anvar, A., Shoeiby, S. 2018. Degraded Aflatoxin M1 in artificially contaminated fermented milk using *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* affected by some bio-physical factors, J. Food Saf. 10.1111/jfs.12544.
13. Zinedine, A., Faid, M., Benlemlih, M. 2005. *In vitro* reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread, Int J Agricul Biol. 7: 67-70.

The binding of Aflatoxin M1 to *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* bacteria in yogurt drink and its assessment by HPLC quantification method

Sokoutifar R[1], Razavilar V[2], Anvar SAA[2*], Shoeiby S[3]

1. PhD student, Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

***Corresponding author:** *saaa4824@gmail.com*

Received: 27 December 2018 Accepted: 26 March 2019

Abstract

Various foods, including dairy products, may be contaminated with aflatoxin, which even in small amounts has harmful effects on human and animal health. A limited number of probiotics attach and/or break down aflatoxins in foods and edible substances. The aim of this study was to investigate the effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* probiotics and their combinations on the removal of or coupling with aflatoxin M1 in yoghurt drink (Doogh). In this study, 72 treatment and control groups were prepared in three replicates. The groups were included four groups of bacterial *L. acidophilus*, *L. plantarum*, and a combination of them, and finally with a non-bacterial group as control (in general four groups). Doogh was prepared at different temperatures (4, 21 and 37 °C) was being before stored for 2, 11 and 30 days. The maximum level of aflatoxin degraded was done in industrial Doogh affected by *L. acidophilus* plus *L. plantarum* at all assigned temperatures and days. This maximum level was measured on the second day (100.00 ± 0.86), eleventh day (100.00 ± 1.27) and thirtieth day (100.00 ± 0.60) of storage. The results suggest a better food security in using industrial Doogh compared to traditional one.

Keywords: Aflatoxin, yoghurt drink, Detoxification, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum.