

## ارزیابی کارایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در سم‌زدایی آفلاتوکسین B1 بر پایه مدل شبیه‌سازی شده‌ی ترشحات دستگاه گوارش

مهران صیادی<sup>۱\*</sup>، حسین تاجیک<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۲/۰۸

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** از آنجایی که آلودگی با آفلاتوکسین در مواد غذایی و خوراک دام مشکل جدی برای سلامت انسان و دام است در این پژوهش توانایی کاهش آفلاتوکسین B1 توسط باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC 4356) در محیط شبیه‌سازی شده‌ی ترشحات دستگاه گوارش انسان حاوی شیرسترون بررسی گردید.

**مواد و روش کار:** بدین منظور تعداد باکتری  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml و غلظت آفلاتوکسین ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد که در محیط شبیه‌سازی شده ترشحات مصنوعی بزاق دهانی، معده و روده کوچک انسان تلقیح گردید. در این پژوهش شش گروه تیمار در بود و نبود باکتری، شیرسترون، سوسپانسیون شیره دستگاه گوارش بررسی شد. غلظت آفلاتوکسین باقیمانده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تخلیص با ستون ایمونوفینیستی تعیین گردید و نتایج توسط نرم افزار آماری SPSS20 تحلیل شد. نتایج نشان داد که کاهش آفلاتوکسین B1 در تمام تیمارها با استفاده از HPLC با حد تشخیص ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حد تعیین کمی ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. مقادیر بازیافت مایکوتوکسین AFB1 بین ۸۹ تا ۹۴ درصد بود منحنی درجه‌بندی آفلاتوکسین B1 با ضریب همبستگی ۰/۹۹۵ در گستره غلظتی ۱۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر خطی بود.

**یافته‌ها:** بیشترین میانگین درصد حذف آفلاتوکسین B1 توسط سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نبود شیر سترون حدود  $70 \pm 0/022$  درصد و کمترین میزان حذف مربوط به گروه یک به میزان  $13/86 \pm 0/017$  بود که تفاوت معنی‌داری برای شش گروه وجود داشت ( $P < 0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشانگر این بود که باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، عامل زیستی مناسبی برای حذف یا کاهش آفلاتوکسین B1 را در دستگاه گوارش انسان هست و همچنین علاوه بر باکتری، شیره معده و روده کوچک هم در کاهش یا حذف آفلاتوکسین B1 موثر می‌باشند.

**کلیدواژه‌ها:** باکتری پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، آفلاتوکسین B1، دستگاه گوارش، سم‌زدایی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره چهارم، ص ۲۸۱-۲۷۰، تیر ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی. تلفن: ۰۹۱۷۹۲۴۸۷۰۳

Email: mehransayadi62@gmail.com

### مقدمه

ترکیب مختلف از آفلاتوکسین‌ها شناسایی شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها شامل آفلاتوکسین B1، G1، B2 و G2 هستند و از نظر سمیت و کمیت در مواد غذایی، AFB1<sup>۱</sup> در اولویت قرار دارد (۸-۱۱). سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)<sup>۲</sup> حداکثر سطح مجاز AFB1 در مواد غذایی ۲۰ ppb و AFB1<sup>۱</sup> در شیر را ۰/۵ ppb (نانوگرم در میلی‌لیتر) تعیین کرده است (۱۲). با افزایش دانش و آگاهی از اینکه

آفلاتوکسین‌ها، متابولیت ثانویه بعضی از قارچ‌ها از جمله گونه‌های اسپرژیلوس می‌باشند (۱-۴) که توانایی جهش‌زایی، سرطان‌زایی و مهار سیستم ایمنی در موجودات زنده را دارند (۵،۶). این قارچ‌ها در مواد غذایی خام و محصولات کشاورزی مخصوصاً لعل، پسته، آجیل، انجیر و میوه خشک‌شده رشد می‌کنند (۷). ۱۸

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۱</sup> Aflatoxin B<sub>1</sub>

<sup>۲</sup> USA Food and Drug Administration

<sup>۳</sup> Aflatoxin M<sub>1</sub>

برای آماده‌سازی آفلاتوکسین از روش ال-نظامی (۱۹۹۸) با تغییرات جزئی استفاده شد بدین‌صورت که، یک میلی‌گرم AFB<sub>1</sub> جامد (Sigma-Aldrich 6636/USA) را در حلال بنزن/استونیتریل (۳:۹۷) حل گردید و برای رسیدن به غلظت ۱۰ ppm از محلول بافر فسفات (PBS, pH 7.3) استفاده کرده و ادامه حلال بنزن/استونیتریل را توسط حمام آب با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تبخیر شد، ضمناً به مخلوط کردن ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون آفلاتوکسین (۱۰ ppm) با ۱۰ میلی‌لیتر شیر استریلیزه، غلظت نهایی ۵ ppm به دست آمد و محلول استاندارد تا زمان مصرف در ظرف شیشه‌ای تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۱).

#### سویه باکتری، شرایط کشت و برآورد غلظت باکتری:

باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC 4356) به صورت خالص و لیوفیلیزه از کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد و لاکتوباسیلوس مورد مطالعه در محیط کشت ام.آر.اس پرا<sup>۷</sup> تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی) گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت کشت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل Rotofix 32A شرکت HETTICH کشور آلمان) شده و مایع رویی تحت شرایط سترون خارج گردید و سلول‌های ته‌نشین را سه بار با PBS شستشو داده شد در نهایت با محلول بافر فسفات سدیم، کدورت آن را توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر و مقدار جذب حدود یک که معادل  $1 \times 10^{11}$  cfu/ml باکتری به دست آمد. تعداد باکتری با استفاده از شمارش پلیت استاندارد به کمک محیط کشت ام.آر.اس-آگار تعیین گردید (۲۲-۲۴).

#### آماده‌سازی نمونه غذایی (شیر سترون):

آماده‌سازی شیر سترون مطابق روش استفاده‌شده‌ی حدادیان (۲۰۱۰) شد، در ابتدا شیر استریلیزه ۲/۵ در صد (شرکت صنایع لبنی ایران، پگاه) خریداری شد و جهت اطمینان از استریل بودن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع (PSI) به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد (۲۵).

#### آماده‌سازی مایع گوارشی (بزاغ دهان، شیره معده، شیره

روده):

آفلاتوکسین‌ها خطر جدی برای سلامت مصرف‌کننده دارند محققان به دنبال حذف و کاهش این نوع مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی هستند (۱۳). روش‌های متعددی جهت سم‌زدایی و کاهش آن‌ها در مواد غذایی و خوراک دام آلوده مثل جداسازی فیزیکی، غیرفعال کردن دمایی، تیمار با مواد شیمیایی، تشعشع و بیولوژیکی وجود دارد (۱۴) که یکی از اساسی‌ترین روش، استفاده از باکتری‌های خانواده اسیدلاکتیک می‌باشد (۱۵، ۱۶). ترکیبات دیواره سلولی باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل ماتریکس پپتیدوگلیکان، اسیدتیکوئیک، اسید لیپوتیکوئیک، لایه پروتئین، پلی‌ساکاریدهای خنثی و آمینواسیدپیرولیزین<sup>۴</sup> می‌باشند که خاصیت هیدروفوبی بالایی دارند و در نتیجه در سازوکار جذب سطحی توکسین‌ها آن‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۷-۱۹). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که نقش حذف مایکوتوکسین‌ها به خاطر چسبیدن توکسین به ترکیبات دیواره سلولی بیشتر از چسبیدن کووالانسی یا متابولیسم سلولی است بنابراین سلول‌های مرده هم توانایی چسبیدن و سم‌زدایی را دارند (۱۷، ۲۰) اما تاکنون اثر باکتری لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس<sup>۵</sup> در مدل شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان بر سم‌زدایی AFB<sub>1</sub> بررسی نگردیده است بنابراین هدف از این مطالعه تعیین کارایی باکتری مذکور در کاهش AFB<sub>1</sub> در شرایط شبیه‌سازی ترشحات دستگاه گوارش می‌باشد.

#### مواد و روش کار

در این مطالعه، اثر شش گروه تیمار به صورت سه بار تکرار در غلظت پنج میکروگرم در میلی‌لیتر AFB<sub>1</sub> در محیط برون تنی بررسی شد که در مجموع ۱۸ نمونه آماری داریم.

#### طراحی آزمایش:

شش گروه تیمار این مطالعه شامل: (۱) سوسپانسیون ترشحات دستگاه گوارش + شیر استریلیزه + AFB<sub>1</sub> (گروه کنترل منفی)، (۲) بایندر HSCAS + سوسپانسیون ترشحات دستگاه گوارش + شیر استریلیزه + AFB<sub>1</sub> (گروه کنترل مثبت)، (۳) سوسپانسیون ترشحات دستگاه گوارش + AFB<sub>1</sub>، (۴) سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس + سرم فیزیولوژی + شیر استریلیزه + AFB<sub>1</sub>، (۵) سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس + سوسپانسیون ترشحات دستگاه گوارش + سرم فیزیولوژی + AFB<sub>1</sub> و (۶) سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس + سوسپانسیون ترشحات دستگاه گوارش + شیر استریلیزه + AFB<sub>1</sub> بودند.

#### آماده‌سازی آفلاتوکسین B<sub>1</sub>:

<sup>6</sup> El-nezami

<sup>7</sup> deMan, Rogosa, Sharpe broth, Oxoid, UK

<sup>4</sup> Amino Acid Pyrrolysine

<sup>5</sup> Lactobacillus acidophilus

میکروتیوپ منتقل و با  $7500 \text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی حاصله (سوپرناتانت) را در لول‌های کرایوتیوپ جمع‌آوری و تا زمان آزمون  $11^{\text{HPLC}}$  در  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند ضمناً اگر زمان تهیه سوپرناتانت تا انجام تست HPLC کمتر از ۲۴ ساعت باشد می‌توانیم سوپرناتانت را در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری کنیم (۲۹) دیاگرام شماتیک از مدل آزمایشگاهی در مدل گوارش تیمار ۶ در شکل یک نشان داده شده است.

#### استخراج آفلاتوکسین B<sub>1</sub> از سوسپانسیون با استفاده از

##### ستون ایمنوافینیتی:

استخراج آفلاتوکسین B<sub>1</sub> به روش باگنونو و همکارانش<sup>۱۲</sup> (۲۰۰۶) با کمی تغییرات صورت گرفت بدین صورت که یک گرم سوسپانسیون‌های نهایی را با ۴ میلی‌لیتر حلال متانول به دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد رسانده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $2750$  سانتریفیوژ شدند مایع رویی به‌طور کامل حذف و محلول باقیمانده را با کاغذ واتمن شماره ۴ فیلتر و ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده را با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شدند و سپس از ستون ایمنوافینیتی عبور داده شد و ستون دوبار با  $500$  میکرولیتر متانول کروماتوگرافی شستشو و در ادامه با گاز نیتروژن حلال را خشک کردیم، آفلاتوکسین را با  $500$  میکرولیتر فاز حامل آب، متانول و استونیتریل با نسبت  $6:3:2$  حجمی حل شد و در آخر یک میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید (۳۰).

#### اندازه‌گیری آفلاتوکسین B<sub>1</sub> استخراج‌شده با کروماتوگرافی

##### مایع با کارایی بالا:

در این تحقیق از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی مدل Agilent Technology 1100 و ستون کروماتوگرافی Agilent Zorbax XDB C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی  $4/6$  میلی‌متر و مواد پر شده ۵ میکرو متری استفاده شد. از آشکارساز فلورسانس RF-10AXL با طول‌موج تحریک  $365$  و نشر  $435$  نانومتر استفاده گردید. تنظیم دمای ستون با استفاده از آون ستون S4011 در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انجام گردید. حجم تزریق یک میکرولیتر بود، فاز حامل مخلوطی از آب دیونیزه: استونیتریل: متانول ( $6:4:3$ ، حجمی/حجمی) بود، سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم گردید. کروماتوگرام HPLC استاندارد آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، نمونه بلانک و شش تیمار در شکل ۲ آورده شده است.

محلول بزاق دهانی، معده و روده بر طبق پروتکل فرناندز و پالنسیا<sup>۸</sup> (۲۰۰۸) آماده گردید. سوسپانسیون بزاق دهانی شبیه‌سازی شده حاوی  $6.2 \text{ g/L NaCl}$ ،  $2.2 \text{ g/L KCl}$ ،  $0.22 \text{ g/L CaCl}_2$ ،  $1.2 \text{ g/L NaHCO}_3$ ،  $0.01\%$  lysozyme و سوسپانسیون شیر معده شبیه‌سازی شده حاوی  $6.2 \text{ g/L NaCl}$ ،  $2.2 \text{ g/L KCl}$ ،  $0.22 \text{ g/L CaCl}_2$ ،  $1.2 \text{ g/L NaHCO}_3$ ،  $0.3\%$  pepsin و سوسپانسیون شیر روده شبیه‌سازی شده حاوی  $5 \text{ g/L NaCl}$ ،  $0.6 \text{ g/L KCl}$ ،  $0.3 \text{ g/L CaCl}_2$ ،  $0.45\%$  bile،  $0.1\%$  pancreatin، salts بود و سپس pH شیر معده را به‌وسیله اسیدکلریدریک  $0.1$  مولار به  $2/5$  و pH شیر روده و بزاق دهانی به‌وسیله سود  $0.1$  مولار به  $7/5$  رسانده شد. هر سه سوسپانسیون حاصله به‌وسیله میکروفیلتر  $0.22$  میکرومتر (مدل ایواکی ساخت ژاپن) استریل گردید (۲۶، ۲۷).

##### بایندر:

بایندر آزمایشی مورداستفاده سدیم آلومینوسیلیکات کلسیم-هیدراته (HSCAS)<sup>۱۰</sup> است. می‌توان آن را به‌عنوان ماده رس که حاوی آلومینیوم، سیلیس، سدیم و کلسیم کاندی قابل تعویض و آب‌هیدراته تعریف شده است. مقدار استفاده از این بایندر در تیمار  $0.25$  میلی‌گرم بر  $10$  میلی‌لیتر بود (۲۸).

#### آماده‌سازی مدل غذایی، تلقیح شده با باکتری و آلوده به سم AFB<sub>1</sub> حاوی محیط شبیه‌سازی شده‌ی ترشحات دستگاه گوارش:

ابتدا AFB<sub>1</sub> و باکتری به شیر تلقیح گردید بدین صورت که بعد از شیکر کردن سوسپانسیون حاصل، غلظت سم AFB<sub>1</sub> و باکتری مورد مطالعه به ترتیب  $5$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و  $10^8 \text{ cfu/ml}$  شدند (۲۹، ۲۴). سپس  $4/5$  میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصله با  $6$  میلی‌لیتر از بزاق دهانی شبیه‌سازی شده مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد با انکوباتور شیکردار با  $85 \text{ rpm}$  تحت اتمسفر نیتروژن گرمخانه قرار داده شد بعد از طی شدن زمان مذکور سوسپانسیون را به  $12$  میلی‌لیتر شیر معده شبیه‌سازی شده اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت سوسپانسیون حاصله را به  $12$  میلی‌لیتر شیر روده شبیه‌سازی شده منتقل و به مدت ۲ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها را در

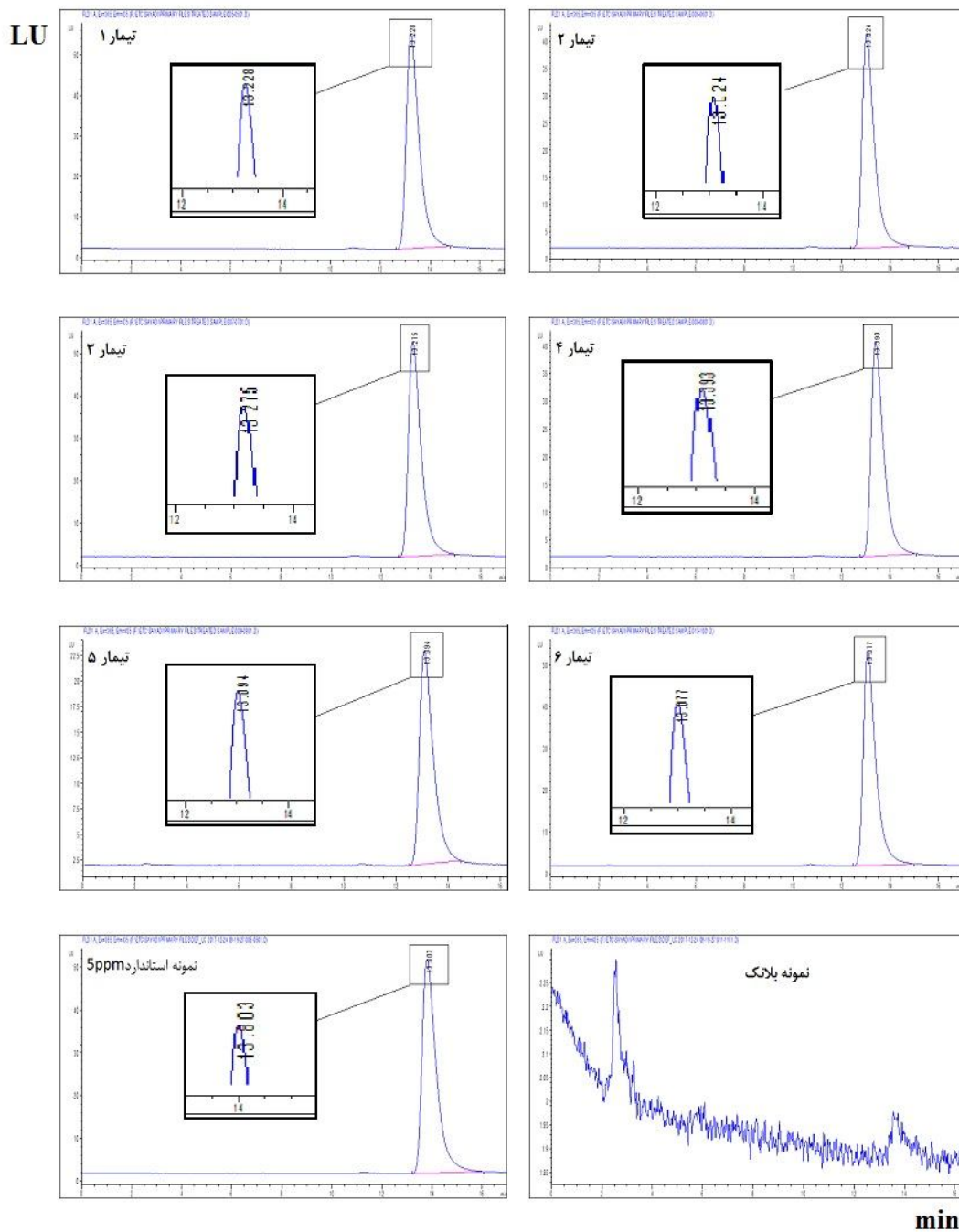
<sup>11</sup> High-performance liquid chromatography

<sup>12</sup> Bognanno

<sup>8</sup> Fernandez de Palencia

<sup>9</sup> Iwaki, Japan

<sup>10</sup> Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicates



شکل (۲): کروماتوگرام HPLC نمونه استاندارد آفلاتوکسین B1، بلانک و شش تیمار

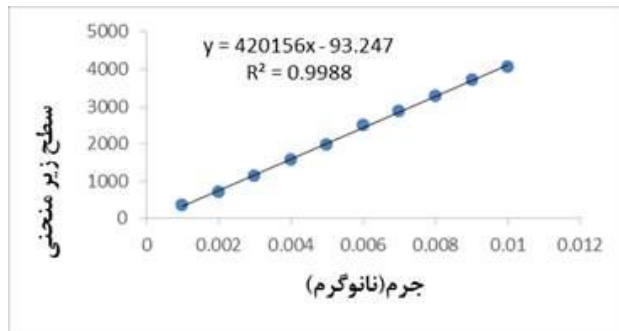
نمودار یک نشان داده شده است. تعیین خطی بودن با رسم منحنی کالیبراسیون در محدوده ۱-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) با ضریب همبستگی  $R^2$  انجام شد، LOD و LOQ بر اساس نسبت سیگنال به نویز (S/N) به ترتیب ۳:۱ و ۱۰:۱ تعریف شد. مقادیر بازیافت توسط غنی کردن تیمار غیر آلوده با آفلاتوکسین در سه

#### اعتبارسنجی روش HPLC:

خطی بودن، صحت، دقت، حد تشخیص (LOD) و حد تعیین کمی (LOQ) برای آزمایش اعتبار از روش HPLC مورد استفاده برای آفلاتوکسین تعیین شد. استاندارد کالیبراسیون با رقیق کردن محلول‌های استاندارد AFB1 با ماتریکس خالص تهیه شد که در

میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نسبی (RSD) بیان می‌شود. تکرارپذیری با سنجش سه نمونه تکرار شده غنی شده با آفلاتوکسین B1 در سطوح ۳، ۵ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای AFB1 برآورد شد. نمونه‌ها در همان روز توسط همان فرد تحلیلگر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

سطح غلظت ۳، ۵ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای AFB1 تعیین شد و سه نمونه تکرار در هر سطح تعیین گردید. با تعیین میزان بازیابی آفلاتوکسین، صحت بررسی شد. آزمون دقت برای دستیابی به تجدیدپذیری از سه غلظت مختلف ۳، ۵ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای AFB1، در سه روز انجام شد که دقت AFB1 بیانگر



نمودار (۱): منحنی کالیبراسیون و معادله خط به دست آمده از نمونه‌های استاندارد آفلاتوکسین B1

#### یافته‌ها

##### اعتبار سنجی روش:

نتایج اعتبار سنجی شامل LOD، LOQ، خطی بودن، بازیابی، صحت و دقت در روش HPLC در جدول ۱ نشان داده شده است. این داده‌ها نشان داد که روش HPLC در این مطالعه پذیرفته شده است.

#### تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک راهه (ON WAY ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار توسط نرم‌افزار SPSS Statistics 22 انجام پذیرفت. مقایسه تعقیبی بین نتایج بدست آمده به وسیله آزمونهای آماری چند دامنه ای LSD در سطح اطمینان ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول (۱): اعتبارسنجی آفلاتوکسین B1 با استفاده از آنالیز HPLC

		درصد بازیافت (انحراف استاندارد نسبی)			
ضریب همبستگی	منحنی کالیبراسیون	حد تعیین کمی ( $\mu\text{g/ml}$ )	حد تشخیص سطح آلودگی ( $\mu\text{g/ml}$ )		
			۳	۵	۷
۰/۹۹	$y = 420156x - 247.93$	۰/۷۵	۸۹ (۰/۱)	۹۸ (۰/۰۸)	۹۴ (۰/۰۶)

می‌باشد. بررسی‌های آماری حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که درصد حذف آفلاتوکسین در تمام تیمارها معنی‌دار بوده ( $P < 0.05$ ) و حضور باکتری و شرایط شبیه‌سازی شده ترشحات دستگاه گوارش تاثیر معنی‌داری در کاهش AFB1 دارد و بین همه تیمارها ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ).

#### اثر تیمارها بر کاهش آفلاتوکسین B1:

نتایج توانایی اتصال AFB1 به سویه باکتری لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس در شش تیمار مورد مطالعه در جدول ۲ ذکر شده است. میزان اتصال در تیمارها متغییر بود. آنالیز داده‌ها حاکی از این است که دامنه اتصال سم از محدوده ۱۳/۸۶ تا ۷۰ درصد می‌باشد و بیشترین و کمترین میزان جذب به ترتیب مربوط به تیمار ۵ و ۱

**جدول (۲): حذف آفلاتوکسین B1 توسط سویه لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلیوس بر روی مدل شبیه‌سازی شده ترشحات سیستم گوارش**

تیمار	میانگین آفلاتوکسین B1 (ppm) $\pm$ انحراف استاندارد	درصد کاهش آفلاتوکسین B1 (ppm) $\pm$ انحراف استاندارد	سطح معنی‌داری
تیمار ۱	(سه بار تکرار) ۴/۳۰۷ $\pm$ ۰/۰۱۷	(سه بار تکرار) ۱۳/۸۶ $\pm$ ۰/۰۱۷	
تیمار ۲	۳/۱۵۶ $\pm$ ۰/۰۲۷	۳۶/۸۸ $\pm$ ۰/۰۲۷	
تیمار ۳	۴/۰۰۳ $\pm$ ۰/۰۲۸	۱۹/۹۴ $\pm$ ۰/۰۲۸	
تیمار ۴	۲/۸۲۵ $\pm$ ۰/۰۱۴	۴۳/۵ $\pm$ ۰/۰۱۴	۰/۰۵
تیمار ۵	۱/۵ $\pm$ ۰/۰۲۲	۷۰ $\pm$ ۰/۰۲۲	
تیمار ۶	۳/۵۸۳ $\pm$ ۰/۰۱۷	۲۸/۳۴ $\pm$ ۰/۰۱۷	

**بحث و نتیجه‌گیری**

چندین راهبرد جهت کاهش یا حذف آفلاتوکسین در علم مواد غذایی وجود دارد. بعضی از این روش‌ها تاثیر بیشتری در کاهش یا تغییر این سموم را دارند که می‌توان به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژی اشاره کرد که تیمار بیولوژیکی بدلیل عدم کاهش کیفیت تغذیه‌ای غذا، گران نبودن تجهیزات نسبت دو روش قبلی در صنعت غذا و خوراک دام بیشتر استفاده می‌گردد (۳۱). در پژوهش حاضر، به بررسی تاثیر باکتری‌های پروبیوتیک در کاهش آفلاتوکسین در محیط دستگاه گوارش شبیه‌سازی شده در مدل غذایی (شیراستریلیزه) در شش گروه مورد بررسی قرار گرفت که اهداف و تفاوت هر یک از گروه‌ها را به اختصار بیان می‌شود:

۱- تیمار یک که گروه کنترل منفی می‌باشد بیانگر این مطلب بود که سوسپانسیون ترشحات دستگاه گوارش و شیر استریلیزه چه تاثیری بر کاهش یا عدم کاهش آفلاتوکسین دارد و نتایج نشان داد که سوسپانسیون دستگاه گوارش تاثیر خیلی کمی در کاهش آفلاتوکسین دارد و شیر بصورت پوشش، اطراف سم را گرفته و مانع از عملکرد ترشحات دستگاه گوارش می‌گردد.

۲- علت استفاده از بایندر HSCAS در گروه کنترل مثبت، دستیابی به این مطلب بود که آیا سوسپانسیون شیر دستگاه گوارش و شیر در اتصال آفلاتوکسین اختلال ایجاد می‌کند یا نه. بایندر HSCAS حدود ۳۰ درصد از میزان آفلاتوکسین را کاهش داد.

۳- تیمار گروه سوم نشان داد که محیط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش توانایی کاهش سم آفلاتوکسین را دارد.

۴- تیمار گروه ۴ بیانگر این مطلب می‌باشد که عدم ترشحات شیر دستگاه گوارش شبیه‌سازی شده در پرورش، چه تاثیر در کاهش آفلاتوکسین دارد.

۵- یکی از عواملی که باعث کاهش اتصال آفلاتوکسین به باکتری وجود شیر در تیمارها می‌باشد بنابراین یکی از عوامل موثر در کاهش میزان آفلاتوکسین تیمار پنج به دلیل عدم وجود شیر در پرورش می‌باشد زیرا شیر به دلیل داشتن پروتئین، چربی و کربوهیدرات مانند یک پوشش اطراف آفلاتوکسین قرار می‌گیرد و از اتصال آفلاتوکسین به باکتری جلوگیری می‌کند.

۶- تیمار گروه ۶ یک تیمار شبیه‌سازی شده کامل از یک وعده غذایی انسان می‌باشد زیرا حاوی باکتری، ترشحات دستگاه گوارش، شیر و آفلاتوکسین می‌باشد و این تیمار نشان داد که آفلاتوکسین با وجود باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلیوس و مواد غذایی حاوی سم در بدن انسان یا دام حدود ۲۸ درصد کاهش می‌یابد.

دلیل انتخاب آفلاتوکسین B1 در این مطالعه، وجود گسترده آن در مواد غذایی و ضررهای انسانی و دامی می‌باشد. همانند مطالعات پیشین، کاهش آفلاتوکسین در تمام تیمارها مشاهده شد ولی بیشترین کاهش مربوط به تیمار پنج می‌باشد که در دامنه ۷۰ درصد بود (۲۱، ۳۲). محققان حدس می‌زنند که اتصال مایکوتوکسین به باکتری به وسیله دیواره سلولی آن‌ها است (۳۲، ۳۳). ولی هنوز عملکرد دقیق اتصال باکتری‌ها، روشن نیست با این حال، گمان می‌برند که این عملکرد باعث غیرفعال شدن آفلاتوکسین‌ها می‌گردد بنابراین باکتری‌های پروبیوتیک مانع از فعال شدن متابولیکی و جذب آن‌ها از لومن روده می‌شود. تفاوت باکتری‌ها در میزان اتصال یا تخریب آفلاتوکسین به دیواره سلولی و ساختارهای پوشش سلولی دارد (۳۴). اتصال آفلاتوکسین به دیواره سلولی و ترکیبات دیواره سلولی باکتری‌ها نسبت به تخریب متابولیک بیشتر می‌باشند (۳۴). کمپلکس یا اتصال آفلاتوکسین<sup>۱</sup> به فلور میکروبی دستگاه گوارش (معده، روده کوچک و روده بزرگ) بستگی به تعداد و نوع سویه میکروارگانیسم، حالات فیزیکی آن‌ها، شرایط محیطی و میزان

<sup>1</sup> Aflatoxins

بیفیدوباکتریوم/نیمالیس<sup>۷</sup> بالاترین نرخ مرگ و میر را در شیر مده و همچنین در برابر نمک صفرا دارند و بیشترین زنده‌مانی برای باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس مشاهده شد (۴۸). فاکتورهای اساسی مؤثر بر زنده‌مانی باکتری‌ها در دستگاه گوارش، شرایط pH مده و نمک صفرا روده است (۴۸،۴۹). بنابراین در صورت وجود صفرا، اتصال آفاتوکسین با باکتری‌های پروبیوتیک افزایش می‌یابد (۳۸). ال-نظامی و همکاران<sup>۸</sup> (۱۹۹۸) بیان کردند که pH یکی از فاکتورهایی می‌باشد که در حذف آفاتوکسین مؤثر می‌باشد pH در محدوده ۴-۶ اثر مثبت به حذف آفاتوکسین ندارد (۲۱). که با یافته های مگالا<sup>۹</sup> و حافظ<sup>۱۰</sup> (۱۹۸۲) مغایرت دارد آنها به این نتیجه رسیدند که در ماست اسیدی AFB1 به AFB2 غیرسمی تبدیل می‌گردد همچنین راسیک<sup>۱۱</sup> و همکاران (۱۹۹۱) به نتایج مشابهی دست یافتند که کاهش AFB1 در ماست تخمیری و شیر اسیدی مشاهده گردیده است (۵۰،۵۱). شرایط اسیدی با اثر بر پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی و آزاد سازی مونومرها و با شکستن پیوند گلیکوزیدی آلدئیدها باعث ایجاد مکان‌های اتصال می‌گردد (۵۲). اسید کلریدریک ۲ مولار به مدت ۶۰ دقیقه، باعث کاهش ۸۰ درصد AFB1 در حضور ساکارومایسس سروزیه<sup>۱۲</sup> گردید (۵۳). تاثیر آیزیم پرونازو لپاز در بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت بر اتصال AFB1 به باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس سویه GG<sup>۱۳</sup> به صورت زنده، حرارت کشته حرارتی و کشته اسیدی، نشان داد که دامنه اتصال تقریباً مشابه ای در محدوده ۶۶-۸۹ درصد داشتند. اوره هم بخاطر اثر متقابل آیزیمزای دارای نقش مهمی در این اتصال داشتند. نمک معمولی و کلرید کلسیم (۱-۰/۱ مولار) بخاطر اثرات متقابل الکترواستاتیک تاثیر جزئی در این اتصال داشتند (۵۴). یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر اتصال مایکوتوکسین به دیواره باکتری‌ها، درجه حرارت می‌باشد که در این مطالعه از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شده است که با توجه به مطالعات مشابه دمای ۳۷ درجه هیچگونه تاثیری در کمپلکس مایکوتوکسین/باکتری ندارد ولی دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش این اتصال می‌گردد و میزان اتصال AFB1 به مخمر ساکارومایسس سروزیه با افزایش دما از ۲۵ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، افزایش (۳۶-۷۹ درصد) می‌یابد (۵۳). براساس گزارشات، تیمار حرارتی باعث حذف بیشتر AFB1 می‌گردد (۵۵-۵۷). حرارت باعث دناتوره شدن، ایجاد محصولات واکنش میلارد و تجزیه مانان‌های

ترشحات دستگاه گوارش دارد (۳۵). براساس تحقیقات انجام شده، بهترین غلظت سلول باکتری مورد نیاز جهت کاهش یا حذف AFM<sub>1</sub> و AFB<sub>1</sub> به ترتیب، ۱۰<sup>۸</sup> و ۱۰<sup>۱۰</sup> می‌باشد که مشابه با میزان غلظت سویه باکتری استفاده شده در مطالعه حاضر می‌باشد (۲۱،۳۶). برطبق مطالعات پیشین چنین استنباط می‌شود که غلظت باکتری با میزان حذف AFM<sub>1</sub> و AFB<sub>1</sub> رابطه مستقیم وجود دارد (۳۷،۳۹-۳۲). میزان اتصال AFB<sub>1</sub> به باکتری لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس در حضور شیر کاهش می‌یابد و در صورت حذف شیر از تیمارها میزان اتصال افزایش خواهد یافت که مشابه پژوهش کابک<sup>۲</sup> (۲۰۰۴) می‌باشد (۴۰). در مطالعه دیگر AFM<sub>1</sub> در حضور شیر هیچگونه کاهش در میزان آن اتفاق نمی‌افتد (۴۱). فاکتور زمان عامل مؤثر دیگر بر میزان اتصال آفاتوکسین به باکتری می‌باشد. در این مطالعه با محدوده زمانی تقریباً ۴ ساعت، حدود ۱۳ تا ۷۰ درصد کاهش AFB<sub>1</sub> مشاهده شد. ال-خوری<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که با گذشت زمان بر میزان اتصال افزایش می‌یابد که با پژوهش‌های ال-نظامی (۱۹۹۸) و پلتون<sup>۴</sup> (۲۰۰۱) مغایرت دارد از مطالعات این دو محقق چنین می‌توان استنباط کرد که با گذشت زمان AFB<sub>1</sub>، از کمپلکس لاکتوباسیلوس/ آفاتوکسین جدا می‌گردد زیرا این اتصال بخاطر پیوند ضعیف غیرکووالانسی می‌باشد (۱۵،۲۱،۳۴). سرانونیو<sup>۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۳ به ارزیابی باکتری‌های پروبیوتیک در کاهش AFM<sub>1</sub> شیر در مدل دستگاه گوارش بصورت In vitro پرداختند و به این نتیجه رسیدند که میزان کاهش در محدوده ۲۲-۴۵ بستگی به نوع باکتری می‌باشند آن‌ها بیان کردند که بخش کمی از کمپلکس آفاتوکسین/باکتری برگشت پذیر هستند (۴۱). تیمار گروه ۳ نشان داد که ترشحات مصنوعی دستگاه گوارش باعث کاهش حدود ۲۰ درصد میزان AFB<sub>1</sub> می‌گردد که علت آن وجود شرایط اسیدی، قلیایی، آنزیم‌ها، صفرا، نمک‌ها و... موجود در ترشحات است که با مطالعات پیشین مشابهت دارد. نمک صفراوی موجود در روده کوچک انسان که میزان آن از ۰/۲ تا ۲ درصد می‌رسد تاثیر خیلی مهمی در اتصال مایکوتوکسین‌ها با میکروارگانیزم‌ها دارد زیرا صفرا دارای تاثیر مهمی در دیواره سلولی به ویژه در فسفولیپیدها، گلیکولیپید و پروتئین‌های غشا دارند (۴۲-۴۷). در پژوهشی که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در آب پنیر را در دستگاه گوارش بررسی می‌کردند، نشان دادند که باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی<sup>۶</sup> و

8 El-Nezami

9 Megalla

10 Hafez

11 Rasic

12 Saccharomyces cerevisiae

13 Lactobacillus rhamnosus GG

2 kabak

3 El-Khoury

4 Peltonen

5 Serrano-Nino

6 Lactobacillus paracasei

7 Bifidobacterium animalis

سازگار شدن باکتری‌ها و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر صفرا عمل کند. بعلاوه، وجود مواد غذایی در معده و روده می‌تواند سبب ایجاد سپر حفاظتی برای میکروارگانیسم‌ها شود و برخی از پروبیوتیک‌ها بدون اینکه با صفرا و یا سم تماسی یابند، از روده و معده خارج می‌شوند. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد عوامل حذف کننده مایکوتوکسین‌ها در شرایط مختلف درون تنی و برون تنی با هم متفاوت می‌باشد. بنابراین نیاز به پژوهش‌های بیشتری جهت تعیین میزان دقیق باکتری‌های پروبیوتیک و میزان کاهش انواع مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی در محیط درون تنی می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر تأمین بودجه این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

پروتئین دیواره سلولی باکتری می‌گردد که نتیجه این واکنش‌ها، افزایش نفوذپذیری لایه خارجی دیواره سلولی و باعث ایجاد بیشتر سایت‌های اتصال در دیواره سلولی باکتری وقارچ‌ها می‌باشد (۵۸، ۵۲). یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد حضور باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و ترشحات دستگاه گوارش تأثیر مثبت در حذف سم داشتند؛ البته باید توجه داشت که مقاومت باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی در برابر ترشحات دستگاه گوارش، گویای رفتار واقعی آن‌ها در دستگاه گوارش نیست، زیرا همانند سایر شوک‌های فیزیولوژیک، شبیه‌سازی واقعی آن‌ها مشکل است. بسیار مشاهده می‌شود که عوامل محیطی باعث تقویت یا تضعیف رفتار میکروارگانیسم در برابر شرایط خاصی می‌شود. بعلاوه، برخلاف شرایط آزمایشگاهی، مقدار ترشحات دستگاه گوارش در روده و معده ثابت نیست به‌طور مثال تا زمان مصرف غذاهای پرچرب، مقدار صفرا در روده بسیار کم است، این خود عاملی است که می‌تواند در جهت

### References:

1. Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Maryam R. Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopathologia* 2006;162(4):307-11.
2. Butler W. Acute toxicity of aflatoxin B1 in rats. *British journal of cancer*. 1964;18(4):756.
3. Ciegler A. Mycotoxins: occurrence, chemistry, biological activity. *Lloydia* 1975;38(1):21-35.
4. Gabliks J, Schaeffer W, Friedman L, Wogan G. Effect of aflatoxin B1 on cell cultures. *J Bacteriol* 1965;90(3):720-3.
5. Kujawa M. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56. Herausgegeben von der International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 599 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. World Health Organization. Geneva 1993. Preis: 95,—Sw. fr; 95, 50 US\$. *Food/Nahrung* 1994;38(3):351.
6. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34(1):135-72.
7. Madrigal-Santillan E, Madrigal-Bujaidar E, Márquez-Marquez R, Reyes A. Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B1 contaminated corn. *Food Chem Toxicol* 2006;44(12):2058-63.
8. Teniola O, Addo P, Brost I, Farber P, Jany K-D, Alberts J, et al. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556 T. *Int J Food Microbiol* 2005;105(2):111-7.
9. Hua S-ST, Baker JL, Flores-Espiritu M. Interactions of Saprophytic Yeasts with anor Mutant of *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(6):2738-40.
10. Farombi OE. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: Implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *Afr J Biotechnol* 2006;5(1):1-14.



11. Mehan VK, International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics, editors. The groundnut aflatoxin problem review and literature database. India: ICRISAT; 1991.
12. Berg T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? *Food Control* 2003;14(4):219-24.
13. Kabak B, Brandon EF, Var I, Blokland M, Sips AJ. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *J Environ Sci Health B* 2009;44(5):472-80.
14. Kubena L, Harvey R, Huff W, Elissalde M, Yersin A, Phillips T, et al. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poultry Sci* 1993;72(1):51-9.
15. El Khoury A, Atoui A, Yaghi J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control* 2011;22(10):1695-9.
16. Sarimehmetoglu B, Kuplulu O. Binding ability of aflatoxin M1 to yoghurt bacteria. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2004;51(3):195-8.
17. Shetty PH, Jespersen L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Tech* 2006;17(2):48-55.
18. Sreekumar O. Amino acid pyrolysates competitive and combination binding with *Lactobacillus gasseri* cells. *Milchwissenschaft* 1998;53:73-6.
19. Hosono A. Desmutagenic properties of cell walls of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft* 1988;43:168-70.
20. Devegowda G, Aravind B, Morton M, editors. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. *Proceedings of Australian poultry science symposium Sydney*; 1996.
21. 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):321-6.
22. Lahtinen S, Haskard C, Ouwehand A, Salmin S, Ahokas J. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam* 2004;21(2):158-64.
23. Khanafari A, Soudi H, Miraboulfathi M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *J Environ Health Sci Engin* 2007;4(3):163-8.
24. Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2007;61(1):123-7.
25. Haddadin M. Effect of olive leaf extracts on the growth and metabolism of two probiotic bacteria of intestinal origin. *Pakistan J Nutr* 2010;9(8):787-93.
26. Kabak B, Ozbey F. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Food Control* 2012;28(2):338-44.
27. De Palencia PF, Lopez P, Corbi AL, Pelaez C, Requena T. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *Eur Food Res Tech* 2008;227(5):1475-84.
28. Neeff D, Ledoux D, Rottinghaus G, Bermudez A, Dakovic A, Murarolli R, et al. In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues

- in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. *Poultry Sci* 2013;92(1):131-7.
29. Shahin A. Removal of aflatoxin B1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *Int J Agric Biol* 2007;9:71-5.
  30. Bognanno M, La Fauci L, Ritieni A, Tafuri A, De Lorenzo A, Micari P, et al. Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Molecular Nutr Food Res* 2006;50(3):300-5.
  31. Peltonen KD, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT. Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *J Sci Food Agriculture* 2000;80(13):1942-5.
  32. El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J Food Protection* 1998;61(4):466-8.
  33. Thyagaraja N, Hosono A. Binding properties of lactic acid bacteria from Idly towards food-borne mutagens. *Food Chem Toxicol* 1994;32(9):805-9.
  34. Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Dairy Sci* 2001;84(10):2152-6.
  35. Boonjink CCGM, Zoetendal EG, Kleerebezem M, de Vos WM. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol* 2007;2(3):285-95.
  36. Elgerbi A, Aidoo K, Candlish A, Williams A. Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin M1 in milk and phosphate buffer. *Milchwissenschaft* 2006;61(2):197-9.
  37. Bolognani F, Rumney C, Rowland I. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem Toxicol* 1997;35(6):535-45.
  38. Hernandez-Mendoza A, Garcia H, Steele J. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol* 2009;47(6):1064-8.
  39. Pranoto Y, Amanah HZ, Utami T, Rahayu ES. Study on factors affecting aflatoxin B1 binding by *Lactobacillus acidophilus* SNP-2. Proceedings of the International Agricultural Engineering Conference, Bangkok, Thailand, 3-6 December 2007 Cutting edge technologies and innovations on sustainable resources for world food sufficiency [Internet] 2007 [cited 2018 Jul 21]; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103035223>
  40. KABAK B, VAR I. Binding of aflatoxin M1 by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Milchwissenschaft* 2004;59(5-6):301-3.
  41. Serrano-Nino J, Cavazos-Garduño A, Hernandez-Mendoza A, Applegate B, Ferruzzi M, San Martin-Gonzalez M, et al. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control* 2013;31(1):202-7.
  42. Oozeer R, Leplingard A, Mater DD, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, et al. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(8):5615-7.
  43. Hofmann AF. Enterohepatic circulation of bile acids and biliary lipid secretion. *Minerva Med* 1977;68(43):3011-7.
  44. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29(4):625-51.

45. Leverrier P, Dimova D, Pichereau V, Auffray Y, Boyaval P, Jan G. Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(7):3809-18.
46. Kheadr EE. Impact of acid and oxgall on antibiotic susceptibility of probiotic *Lactobacilli*. *African Journal of Agricultural Research*. 2006;1(5):172-81.
47. Gunn JS. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect* 2000;2(8):907-13.
48. Madureira A, Pereira C, Truszkowska K, Gomes A, Pintado M, Malcata F. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *Int Dairy J* 2005;15(6):921-7.
49. Pacheco KC, del Toro GV, Martinez FR, Duran-Paramo E. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated in vitro. *Am J Agric Biol Sci* 2010;5:37-42.
50. Megalla S, Hafez A. Detoxification of aflatoxin B1 by acidogenous yoghurt. *Mycopathologia* 1982;77(2):89-91.
51. Rasic JL, Skrinjar M, Markov S. Decrease of aflatoxin B1 in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia* 1991;113(2):117-9.
52. Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol* 2004;97(5):1038-44.
53. Shetty PH, Hald B, Jespersen L. Surface binding of aflatoxin B 1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int J Food Microbiol* 2007;113(1):41-6.
54. Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact* 2000;128(1):39-49.
55. El-Nezami H, Chrevatidis A, Auriola S, Salminen S, Mykkanen H. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives Contaminants* 2002;19(7):680-6.
56. Pierides M, El-Nezami H, Peltonen K, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *J Food Protec* 2000;63(5):645-50.
57. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *App Environ Microbiol* 2001;67(7):3086-91.
58. Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol* 1984;159(3):1018-26.

## ASSESSING THE EFFICIENCY OF PROBIOTIC BACTERIA LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS IN DETOXIFICATION OF AFLATOXIN B1 BASED ON A SIMULATED MODEL OF DIGESTIVE SYSTEM SECRETIONS

Mehran Sayadi <sup>\*1</sup>, Hossein Tajik<sup>2</sup>

Received: 21 Feb, 2018; Accepted: 28 Apr, 2018

### Abstract

**Background & Aims:** Since aflatoxin contamination in food and livestock feed is considered as a serious health problem for human and animal health, this research focused on the ability of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in reducing aflatoxin B1 (AFB1) in a simulated human gastrointestinal tract containing Sterilized milk.

**Materials & Methods:** For this purpose, the bacteria count and aflatoxin concentration were adjusted to  $1 \times 10^{10}$  CfU/ml and 5 ppm, respectively. In the simulated medium, artificial oral salivary, human small intestine and gastric secretions were inoculated. This study involved 6 treatment in the presence and absence of bacteria, sterilized milk, and gastrointestinal juice suspension. The concentration of residual aflatoxin was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) and purification by Immunoaffinity column. The results were statistically analyzed by SPSS 20 software. The results indicated that reduction of aflatoxin B1 at all treatments were determined using HPLC with a detection limit of 0.25mg/ml and a quantification limit of 0.75 mg/ml. The mycotoxin recovery was 89% and 94% for AFB1 Good linearity was observed for all the analytes of interest, with correlation coefficients 0.995 within their respective linear ranges.

**Results:** The highest percentage of AFB1 removal by probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* was  $70 \pm 0.022\%$  in the absence of sterilized milk, where there was a significant difference for the six groups ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results also revealed that probiotic bacteria cell was a good biological agent for elimination or reduction of AFB1 in the human gastrointestinal tract. In addition to bacteria, gastric juice and small intestine contribute to elimination or reduction of AFB1.

**Keywords:** Probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, Aflatoxin B1, Toxin binding, Digestive System, Detoxification, High-performance liquid chromatography

**Address:** Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

**Tel:** +989179248703

**Email:** mehransayadi62@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(4): 281 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Ph.D Candidate, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran