مطالعه آلودگی شیرهای UHT به آفلاتوکسین M_1 در شهر تهران

دکتر ابوالفضل کامکار[1]

هدف: تعیین میزان آفلاتوکسین M_1 در شیرهای UHT.
طرح: مطالعه مقطعی.
روش: در این مطالعه تعداد ۶۴ نمونه از شیرهای UHT عرضه شده در تهران به طور تصادفی انتخاب گردید و نمونه‌های مذکور از نظر میزان آفلاتوکسین M_1 با روش TLC مورد بررسی قرار گرفتند.
تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه به منظور یافتن اختلاف احتمالی بین فصول مختلف سال نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.
نتایج: نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که از تعداد ۶۴ نمونه از شیرهای UHT، تعداد ۵۳ نمونه از نظر وجودآفلاتوکسین M_1 مثبت بوده (۸۲/۶ درصد) و تعداد ۱۱ نمونه منفی بودند (۱۷/۴ درصد)، محدوده میزان آفلاتوکسین M_1 ۳۸۷-۶۹ نانوگرم در لیتر بود.
نتیجه‌گیری: ۸۲/۶ درصد نمونه‌های مورد مطالعه دارای آلودگی به آفلاتوکسین M_1 با محدوده ۳۸۷-۶۹ نانوگرم در لیتر بودند، در تمام نمونه‌های آلوده به آفلاتوکسین M_1، غلظت آلودگی بالاتر از حدود مجاز کشورهای اروپایی (۵۰ نانوگرم در لیتر) بود. لذا پیشنهاد می‌شود که اولاً از مواد غذایی سالم برای تغذیه دامها استفاده شود و در وهله بعدی استانداردهایی برای میزان آفلاتوکسینهای مواد غذایی مورد مصرف دامهای شیری و فرآوردههای آن تدوین و به مورد اجرا گذاشته شود و بالاخره در مورد احتمال استفاده از روشهای مختلف سالم سازی مواد غذایی مورداستفاده دام، شیر و فرآورده‌های مختلف شیری فکر اساسی بشود.
مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۴، ۸-۵.
واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M_1، شیر UHT، کروماتوگرافی لایه نازک.

با توجه به رشد روز افزون جمعیت دنیا هر روز نیاز به مواد غذایی بیشتر می‌گردد، شیر در بین مواد غذایی مورد استفاده انسان از اهمیت خاصی در جهت تامین نیازهای غذایی بشر مخصوصاً از بابت تامین پروتئینها، مواد معدنی، ویتامینها و غیره برخوردار است و به همین علت صنعت دامداری مخصوصاً نگهداری دامهای شیری اهمیت ویژه‌ای پیدا نموده است و هر روزه نیاز به شیر سالم افزایش پیدا می‌نماید. از طرف دیگر در صورت سالم نبودن، شیر می‌تواند به عنوان یک عامل خطرناک، سلامتی مصرف کنندگان علی‌الخصوص نوزادان و کودکان را به صورت جدی در معرض خطر قرار دهد.

شناخت مسمومیت ناشی از مصرف سموم قارچی سابقه طولانی دارد، به گونه‌ای که در سال ۱۹۶۴ بیماری با نام ایکس باعث مرگ یکصد هزار قطعه بوقلمون گردید. مطالعات بیشتر در زمینه کشف علت بیماری نشان داد که سموم به وسیله دو گروه از قارچها یعنی آسپرژیلوس فلاووس *(Aspergillus flavus)* و آسپرژیلوس پارازیتیکوس *(Aspergillus parasiticus)* تولید می‌شود (۱۹، ۱۸).

به دنبال کشف این واقعیتها مطالعات بیشتر در مورد آفلاتوکسین‌ها، قدرت سرطان زایی آنها را نشان داد و ادامه مطالعات و افزایش آگاهی بشر در مورد خطرات واقعی سموم قارچی برای سلامتی انسان و حیوان، کشورها را بر آن داشت تا قوانینی در جهت اندازه‌گیری و کنترل میزان این سموم در مورد مواد غذایی مورد مصرف انسان و دام تدوین و تصویب نمایند، به گونه‌ای که امروزه حداقل در ۵۶ کشور جهان قوانین مربوط به کنترل میزان سموم قارچی در مواد غذایی وجود دارد.

۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

Study on the contamination of "UHT" milks with aflatoxin M_1 in the city of Tehran

Kamkar, A.[1]
[1]*Departement of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

Objective: Study of aflatoxin M_1 in commercial ultra-high-temperature treated milk in Tehran.
Design: Cross - sectional.
Procedure: sixty four samples from UHT treated milk were analyzied for the presence of aflatoxin M1 by thin layer chromatography.
Statistical analysis: By one –way analysis of variance method.
Results: This study showed that from 64 samples were analyzed, a total of 53 samples (82%) were positive for aflatoxin M_1 and 11 (17.4%) were negative. The range of aflatoxin M_1 content was 69-387 ng/lit.
Conclusion: contamination rate of aflatoxin M_1 in commercial milks is around 82% with amounts ranging 69 to 387 ng/ lit. All contaminated samples had a level of aflatoxin M_1 above the european countries standard (50ng/lit). Therefore, the following suggestions are made: -Determined standard complications for aflatoxins limit value in feed and aflatoxin M_1 in milk and dairy products - Use of effective methods for treatment of contaminated feed, milk and dairy products. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 4: 5-8, 2002.***
Key words: Aflatoxin M_1, UHT milk, TLC.

ورود سموم قارچی در شیر و فرآورده‌های آن ممکن است به دو صورت انجام گیرد: ۱) آلودگی غیر مستقیم، یعنی مصرف مواد غذایی آلوده به سموم قارچی توسط دام و ورود آن به شیر که حدود ۲-۱ درصد آفلاتوکسین B_1 خورده شده به صورت آفلاتوکسین M_1 دفع می‌شود (۲۰، ۱۹، ۱۸). ۲) آلودگی مستقیم، یعنی آلودگی شیر و فرآورده‌های مختلف آن به وسیله قارچ وسپس تولید مایکوتوکسین‌ها (۱۹، ۱۸).

با توجه به اینکه آفلاتوکسین M_1 از نظر ساختمان شیمیایی شباهت زیادی به آفلاتوکسین B_1 دارد و در واقع از مشتقات ۴ هیدروکسی آفلاتوکسین B_1 می‌باشد و از طرف دیگر به دلیل خاصیت سرطان‌زایی، جهش‌زایی و تراتوژنیکی آفلاتوکسین‌ها (۲۱، ۱۷، ۱۴) و مقاومت انواع آفلاتوکسین‌ها مخصوصاً آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 در برابر عوامل فیزیکی معمول و متداول (۲۳، ۶، ۳) مطالعات گسترده‌ای در جهت تشخیص شیرهای آلوده از یک طرف (۱۸، ۱۵، ۱۳) و از طرف دیگر در جهت سالم سازی شیرهای تولیدی تاکنون در دنیا صورت گرفته است، که این بررسی نیز جهت تعیین میزان آلودگی شیرهای (Ultra-High- Temperature-Treated Milk "UHT") به آفلاتوکسین M_1 صورت می‌گیرد.

مواد و روش کار

۱) مواد و وسایل مورد استفاده: مواد شیمیایی مورد استفاده:
کلروفرم پایدار شده با ۰/۵ درصد اتانول ۹۶ درجه، تولوئن، اسید استیک گلاسیال ۹۹/۶ درصد، استونیتریل، دی‌اتیل‌اتر عاری از

جدول ۱- میزان آلودگی شیرهای استریلیزه به آفلاتوکسین M_1 برحسب نانوگرم در لیتر در فصول مختلف سال ۱۳۷۸.

فصل	تعداد نمونه	میانگین آلودگی نانوگرم در لیتر	خطای معیار میانگین	حداقل آلودگی نانوگرم در لیتر	حداکثر آلودگی نانوگرم در لیتر
بهار	۱۲	۱۷۴	۲۷/۷	۶۹	۳۸۷
تابستان	۱۳	۱۹۷	۲۲/۹	۷۰	۳۸۲
پاییز	۱۳	۲۱۳	۳۳/۹۲	۸۸	۳۸۶
زمستان	۱۵	۲۴۴	۲۸/۷	۸۳	۳۷۲

پراکساید که اتانول آن کمتر از ۰/۰۵ درصد باشد، ان هگزان، استن، متانول، سولفات سدیم خشک، سدیم کلراید، سدیم دودسیل سولفات، سلیکاژل ۶۰ مخصوص کروماتوگرافی ستونی و استاندارد آفلاتوکسین M_1 (با شماره کاتالوگ A-9276 ساخت کارخانه سیگما) لازم به یادآوری است که مواد مورد استفاده از نوع مخصوص کروماتوگرافی بودند. **وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده:** TLC- Scanner III مدل CAMAC ساخت سوئیس، تغلیظ کننده تبخیری مدل Buchi ساخت سوئیس، صفحات کروماتوگرافی شیشه‌ای ۲۰×۲۰cm آماده Whatman ساخت آمریکا، سرنگ ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری ساخت کمپانی Hamilton آمریکا، ستون شیشه‌ای برای کروماتوگرافی ستونی با طول ۳۰ سانتیمتر و قطر یک سانتیمتر و مخزنی تقریباً به حجم ۱۵ میلی‌لیتر که انتهای پایین ستون باریک شده و دایره کوچکی با قطر ۴ میلیمتر تشکیل می‌دهد که مجهز به یک شیر مناسب است، مخلوط کن، وسایل معمول آزمایشگاهی برای کروماتوگرافی لایه نازک، لامپ فرا بنفش قابل تنظیم با طول موج ۳۶۰ نانومتر، وسایل مناسب برای تبخیر کلروفرم در لوله‌های مخروطی در جریان گاز ازت و در دمای بالا (تقریباً ۵۰-۴۰ درجه سانتیگراد)، خشک کن قابل تنظیم در دمای ۱۰۵-۷۰ درجه سانتیگراد، میکروپی‌پت ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکرولیتری از نوع Eppendorf، بن ماری قابل تنظیم ۱۰۰-۰ درجه سانتیگراد ساخت شرکت ژربرسوئیس، همزن (Shaker).

۲) **روش کار:** در این مطالعه تعداد ۶۴ نمونه از شیرهای UHT تولید شده توسط کارخانجات مختلف شیر در تهران در طی یکسال به صورت ۱۶ نمونه در هر فصل در مراحل مختلف و بتدریج با فواصل زمانی مشخص خریداری و پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌ها به‌منظور آنالیز آفلاتوکسین M_1 با استفاده از روش IDF (International Dairy Federation) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۹). در این روش ابتدا ۵۰ میلی لیتر شیر به داخل یک قیف جدا کننده ml ۲۵۰ منتقل و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم کلراید اشباع سرد شده تا چهار درجه سانتیگراد اضافه شده و در مرحله بعدی ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم دودسیل سولفات ۵ درصد در دمای اطاق به مخلوط اضافه و محتوای قیف جدا کننده به آرامی تکان داده می‌شد سپس ۱۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم سرد شده تقریباً تا دمای ۴ درجه سانتیگراد روی آن ریخته و به مدت یک دقیقه به آرامی تکان داده می‌شد. به‌طوری‌که دو فاز آبی و کلروفرم کاملاً جدا شده و در ضمن از تشکیل امولسیون جلوگیری می‌شد. لایه کلروفرمی به داخل یک ارلن مخروطی منتقل و ۵ گرم سولفات سدیم بدون آب به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه آن را ثابت نگه داشته و گاهی تکان داده می‌شد، و بالاخره با استفاده از کاغذ صافی آن را صاف نموده و ۷۵ میلی‌لیتر آن برداشت می‌شد.

عصاره به دست آمده به ستون کروماتوگرافی آماده شده سلیکاژلی منتقل و پس از خارج شدن عصاره، ابتدا با ۲۵ میلی‌لیتر مخلوط تولوئن + اسید استیک گلاسیال (۱+۹) ستون شستشو داده شده تا جایی که مایع به سطح بالایی سولفات سدیم برسد، محلول شستشو را خارج و بعد از آن ستون با ۲۵ میلی‌لیتر ان‌هگزان شستشو و در مرحله بعد با ۲۵ میلی‌لیتر مخلوط استونیتریل +دی اتیل اتر+ ان هگزان (۶۰+۳۰+۱۰) شستشو داده می‌شد تا حاصل شستشو خارج شود.

سرانجام آفلاتوکسین M_1 باقیمانده با ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم +استن شسته شده و حاصل شستشو داخل یک بالن ته گرد جمع‌آوری و تا زمان خشک شدن توسط تبخیر کننده چرخشی تبخیر نموده و به طور کمی باقیمانده را با استفاده از کلروفرم به لوله‌های با حجم ۴ میلی لیتر منتقل نمودیم.

لازم به ذکر است که تمامی مراحل شستشو بایستی بدون وقفه ادامه یابد و در هیچ‌یک از مراحل ستون کروماتو گرافی نباید خشک شود. محلول را در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در جریان گاز خنثی نظیر نیتروژن تبخیر نموده ضمناً از حرارت دادن زیاد عصاره خود داری شود. وقتی لوله سرد شد با استفاده از سرنگها میلتون مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه نموده و به وسیله مخلوط کن به مدت یک دقیقه مخلوط نمودیم .پس از تهیه عصاره لکه‌های مربوط به نمونه‌های مورد آنالیز و استاندارد روی صفحات TLC قرار داده شد و بلافاصله صفحه را در داخل تانک کروماتوگرافی حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط ایزوپروپانول + استن + کلروفرم (۸۵+۱۰+۵) قرار داده و نهایتاً پس از خارج کردن و آماده سازی، صفحه کروماتوگرافی را بدستگاه TLC Scanner منتقل و با توجه به سطح زیر منحنی استاندارد و نمونه‌ها و همچنین درصد باز یافت روش به کار رفته جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1، مطابق فرمول غلظت آفلاتوکسین M_1 برحسب نانوگرم محاسبه می‌شود. لازم به ذکر است که درصد بازیافت در این روش ۹۵/۳ درصد بوده و دقت آن ۰/۰۱۵ میکروگرم در لیتر می‌باشد.

$$\text{غلظت آفلاتوکسین } M_1 \text{ برحسب ppb} = \frac{\text{سطح زیر منحنی نمونه}}{\text{سطح زیر منحنی استاندارد}} \times \text{غلظت استاندارد} \times \frac{100}{\text{درصد بازیافت}}$$

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه از میان ۶۴ نمونه شیر استریلیزه مورد مطالعه تعداد ۵۳ نمونه دارای آفلاتوکسین M_1 در محدوده بین ۳۸۷-۶۹ نانوگرم بودند، و تعداد ۱۱ مورد از نظر وجود آفلاتوکسین M_1 منفی تشخیص داده شدند.

از طرف دیگر بر طبق اطلاعات موجود در جدول ۱ بالاترین میزان آلودگی مربوط به دو فصل سرد سال یعنی فصلهای زمستان و پاییز به ترتیب با میانگین غلظت ۲۴۴ و ۲۱۳ نانوگرم لیتر بوده و این در حالی است که در فصول گرم سال (بهار و تابستان) و مخصوصاً تابستان میزان آلودگی کمتر بوده و در واقع آزمون آنالیز واریانس یکطرفه این تغییرات را معنی‌دار می‌داند ولی در هر حال غلظت آلودگی بالاتر از حد مجاز مورد پذیرش آفلاتوکسین M_1 در بسیاری از کشورهای دنیا منجمله کشورهای اتحادیه اروپایی که ۰/۵-۰/۰۵میکروگرم در لیتر قرار داده شده است، می‌باشد.

بحث

از آنجایی که آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به آفلاتوکسین M_1 گستردگی جهانی دارد، (۲۴، ۲۲، ۲۱، ۱۸، ۱۶، ۱۵، ۱۳، ۱۲، ۱۱،

۱۰، ۸، ۵، ۴) کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشد به گونه‌ای که مطالعات محدود صورت گرفته در کشور ما در زمینه تعیین میزان آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به آفلاتوکسین M_1 بیانگر این واقعیت است که نه تنها شیرهای تولیدی از نظر فراوانی نسبی موارد آلودگی در سطح بالایی قرار دارند بلکه غلظت آلودگی این شیرها نیز بالاتر از استانداردهای موجود در بسیاری از کشورهای دنیا منجمله کشورهای اروپایی است که حدود مجاز آن را در شیر بین ۰/۵-۰/۰۵ میکروگرم در لیتر قرار دادند، می‌باشد. لازم به ذکر است در زمینه حدود مجاز AFM_1 در شیر و فرآورده‌های آن در ایران تاکنون استانداردی تدوین نشده و لذا استاندارد کشورهای اروپایی ذکر گردیده است.

مطالعه‌ای در سال ۱۳۶۱ توسط کریم و همکاران روی ۶۱ نمونه شیر شامل ۵۲ نمونه شیر خام مخلوط دامداریهای اطراف تهران که به کارخانجات شیر پاستوریزه تحویل می‌شد و ۹ نمونه شیر پاستوریزه، از نظر آلودگی به آفلاتوکسین M_1 با روش TLC صورت گرفت نتایج حاصله بیانگر این واقعیت بود که ۹۲/۳۱درصد شیرهای خام و تمام شیرهای پاستوریزه به آفلاتوکسین M_1 آلوده بودند. در این مطالعه حداکثر آلودگی در شیر خام ۲۳ میکروگرم در لیتر و در شیرهای پاستوریزه۲۰/۱ میکروگرم در لیتر تعیین گردید (۱). در بررسی دیگری که توسط کریم و همکاران در سال ۱۳۷۸ صورت گرفت با استفاده از روش الیزا میزان آلودگی شیرهای تحویلی به کارخانجات شیر پاستوریزه تهران به آفلاتوکسین M_1 مورد بررسی قرا گرفت. در این مطالعه ۸۲/۲ درصد نمونه‌های مورد آزمایش آلوده به آفلاتوکسین M_1 بودند که میانگین آلودگی این شیرها ۲۵۹/۵ نانوگرم در لیتر بود (۲).

در بررسی ما نیز از۶۴ نمونه شیر مورد مطالعه تعداد ۵۳ نمونه مورد بررسی با TLC Scanner آلوده به آفلاتوکسین M_1، با محدوده آلودگی ۳۸۷-۶۹ نانوگرم در لیتر بود.

با توجه به نتایج حاصله از تحقیقات قبلی و این مطالعه معلوم می‌گردد که قسمت اعظم شیرهای تولیدی در داخل کشور از نظر داشتن میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 فراتر از حدود مجاز بسیاری از کشورهای دنیا بوده و از فراوانی نسبی بالایی نیز برخوردار می‌باشند. ضمناً این مطالعه نشان دهنده آلودگی بالای شیرهای تولیدی به AFM_1 در فصول سرد سال در مقایسه با فصول گرم سال نظیر بعضی از مطالعات انجام یافته بوده (۷، ۲) در حالی‌که برخی دیگر از مطالعات این رابطه را نشان نداده است.

از آنجایی که آلودگی آفلاتوکسین شیر گستردگی جهانی دارد، لذا برای حل این مشکل تلاشهای فراوانی صورت گرفته است که از جمله این تلاشها می‌توان به آفلاتوکسین زدایی مستقیم از شیر اشاره نمود، ولی تاکنون روش مؤثر و کاملی ارایه نگردیده است.

آنچه که از مجموع مطالعات انجام شده در زمینه سالم سازی شیر از نظر آفلاتوکسین M_1 بر می‌آید، به نظر می‌رسد که بهترین روش در امان ماندن شیر از این سم همان اعمال روشهای صحیح مدیریتی در تغذیه سالم و عدم آلودگی و یا حداقل کم کردن میزان آلودگی جیره غذایی دامهای شیری به آفلاتوکسین‌ها مخصوصاً آفلاتوکسین B_1 است. زیرا از یک طرف به علت مسایل تغذیه‌ای و کمبود شیر نمی‌توان به راحتی شیرهای آلوده به آفلاتوکسین M_1 را دور ریخت و از طرف دیگر تاکنون روش کامل و مؤثری به منظور سم زادیی شیرهای آلوده به آفلاتوکسین M_1 ارایه نگردیده است.

References

۱. کریم، گ.، پروانه، و.، کردی، ج. (۱۳۶۱): بررسی آلودگی شیر پاستوریزه به آفلاتوکسین در منطقه تهران، مجله بهداشت ایران، سال یازدهم، شماره ۲-۱.

۲. کریم، گ.، بکائی، س.، خراسانی، ا. (۱۳۷۸): مطالعه میزان آلودگی شیرهای تحویلی به کارخانجات شیر پاستوریزه تهران به آفلاتوکسین M_1 با استفاده از روش ELISA، پژوهش و سازندگی، شماره ۴۲،۴۱،۴۰، صفحه: ۱۶۵- ۱۶۳.

3. Aman, I. (1995): Stability of Aflatoxin M1 milk samples. Chemie – Microbiologie – Technologie – der Lebensmittel;17, 5.6:161-163.
4. Bluethgen, A. and Heeschen, W. (1995): Aflatoxin M1 and B1 contamination of tank milk and animal feeds in north Germany in early 1994.DMZ-Labansmittelindustrie – und – Milckwirtschaft; 116, 1: 4-13.
5. Cerutti, G., and Elder, M.E. (1997): Aflatoxins in foods.Latte-; 22(11)145-47.
6. Choudhary, P.L. and Parker, F. (1998): Effect of chilling and heating on aflatoxin M1 content of contaminated Indian cow's milk.Egyptian Journal of Dairy Science; 26, 22: 223-329.
7. Flkal, L. (1991): Immunnoassay determination of afatoxin M1 in milk. Nahrrang, 37, 7: 742-748.
8. Galvano, F. and Cerutti, M. (1998): Survey of the occurrence of aflatoxins in dairy products marketed in Italy. Journal of Food Protection; 61, 6: 738-741.
9. International Dairy Federation (IDF) (1999). Milk and dried milk. determination of aflatoxin M1 content. International IDF standard: 111, A: 1991. IDF, SQure vergote 41, b-1040, Brussels.
10. Ioannoa, I. and Kakouri, E. (1999): Surveillance and control of aflatoxin B1, B2, G1, and M1 in foodstuff in the Republic of Cyprus:1992- 1996. Journal of AOAC International; (8224) 883-8920.
11. Jose, M. (1988): Mold and mycotoxin contamination. in Food. Toxicology part B:Contaminats and Additives. PP: 683- 691.
12. Kim, E.k. and Sankio, M. (2000): Occurrence of aflatoxin M_1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additive and Contaminants; 17: 4459-64.
13. Okriengsag, S. (1997): Incidence of aflatoxin M_1 in Thai milk products. Journal of Food Protection, 60, 8: 1010-1012.
14. Lafont, P. and Lander, D.E. (1989): Genotoxicity of hydroxy – aflatoxins M_1 and M_4.Microbiologie-Aliments- Nutrition; 7, 1: 1-8.
15. Markaki, P. and Melissari, E. (1997): Occurrence of aflatoxin M_1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminants;14, 5: 451-454.
16. Sylos, C.M. and Rodriguez, A. (1996): Occurrence of aflatoxin M_1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. Food

Additives and Contaminats; 13(2) 169-175.

17. Umeda, M. (1971): Cytomorphological change of cultures cells from rat liver, kidney and lung induced by several mycotoxins. Japn. J. Exp. Med. 41:195-207.
18. Van Egmond, H. (1989): Significance of mycotoxin in dairy production. Publ. by: Elsevir London ISBN 1-85 166-369-x,pp:15.
19. Van Egmond, H. (1989): Carry – over of AFB in to AFM_1 in milk. Mycotoxin in dairy production publ. by: Elsevir London ISBN 1-85 166-34-x, pp: 15.
20. Veldman, A. and Meijs, J.A.C. (1992): Carry- over of aflatoxin from cow's food to milk. Animal Production, 55, 2: 163-168.
21. Vesely, D. and Vesela, D. (1983): Comparative assessment of the aflatoxin B_1,B_2,G_1,G_2 and M_1 embryocytotoxicity in the chick embryo, Toxicol.Lett.15:297-300.
22. Weber, R. (1989): TLC determination of aflatoxin M_1 in milk and milk products, Bundesgesundheitsblatt; 32, 3: 95-100.
23. Wiseman, D.W. and Marth, E.H. (1983): Heat and acid stability of aflatoxin M_1 in naturally and artificially contaminated milk, Milchwissenchaft 38:464-466.
24. You – Min – Fu (1996): Determination of aflatoxin M_1 in milk and milk powder using immuno – affinity column and fluorescence measurment. Journal of Food and Drug Analysis, 4, 2: 175-183.