مجله کشاورزی، دوره 9، شماره 2، پاییز 1386، صص 21-11

جداسازی *Aspergillus flavus* از خوراک دام و تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 به روش HPLC در شیر گاوداری‌های تهران

محمود سندگل [*]، حشمت ا.. امینیان [**]، حسن رضا اعتباریان [***]، گیتی ابوحسین [****] و امید سبزواری [*****]

چکیده

در سال 1383 جدایه‌هایی از قارچ *Aspergillus flavus* از مواد غذایی مورد مصرف در نه گاوداری اطراف تهران (نظیر ذرت، جو، گندم، تخم پنبه، نان خشک، سویا، یونجه، سبوس، آرد جو، کنجاله کلزا، کنجاله پنبه، سیلوی ذرت و تفاله چغندر) جدا شد. توانایی تولید سختینه به وسیله جدایه‌های حاصل بررسی و مشخص گردید که 62/9 درصد از جدایه‌ها بر روی محیط CzA سختینه تولید نمودند. درضمن 68/5 درصد از جدایه‌ها تولیدکننده آفلاتوکسین بودند. دامنه تغییرات در دامداری‌ها از نظر آلودگی خوراک دام به قارچ *A. flavus* از 20/4 تا 3/7 درصد بود. درضمن 16/7 درصد جدایه‌ها مربوط به تفاله چغندر و این خوراک آلوده‌ترین آنها بود. میانگین درصد جدایه در هر یک از مواد غذایی یونجه، کنجاله کلزا و آرد ذرت 1/8 و کمترین آلودگی به قارچ را داشتند. آزمایش شیر تولیدی گاوداری‌ها به روش HPLC نشان داد که دامنه آفلاتوکسین M_1 در آنها از 0/0009 تا 0/5269 ppb بود. ضریب رگرسیون کالیبراسیون برای این آزمایش‌ها از 0/99 تا 0/998 و ریکاوری حاصل در این آزمایش‌ها نیز از 70/3 تا 9/104 درصد تعیین گردید.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B و M، خوراک دام، شیر، *Aspergillus flavus*، HPLC

[*] - کارشناس ارشد، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران - ایران

[**] - استادیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران - ایران (نویسنده مسئول مکاتبات : haminian@ut.ac.ir)

[***] - استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران - ایران

[****] - بخش سم‌شناسی، اداره کنترل دارو و غذا، تهران - ایران

[*****] - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران

مقدمه

حدود 40 سال است که پژوهش درباره آلودگی مواد غذایی و محصولات گیاهی با کپک‌های تولیدکننده زهرابه در کشورهای جهان در حال انجام است. بیشترین این تحقیقات مربوط به آفلاتوکسین‌ها است که متابولیت‌های ثانویه قارچ آسپرژیلوس فلاووس می‌باشند. آفلاتوکسین‌ها شاید از بیشترین نوع زهرابه‌های قارچی شناخته شده می‌باشند که به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این سموم قارچی از زمان تولید مواد خوراکی، عمل‌آوری، حمل و نقل و ذخیره‌سازی تولید می‌شوند (2 و 5).

قارچ *Aspergillus flavus* یکی از قارچ‌هایی است که دامنه میزبانی آن گسترده است. لذا سویه‌های تولیدکننده سم این قارچ در میکروفلور دانه، خاک، هوا و علوفه پراکنده می‌باشد. این قارچ می‌تواند بر روی مواد مختلفی نظیر بادام زمینی، تخم پنبه، آفتابگردان، سویا، زیتون، ذرت، سورگوم، برنج، گندم، جو، ارزن، جو دوسر (یولاف)، نخود، لوبیا، عدس، پسته، خشکبار برزیل، بادام درختی، گردو، غدد سیب زمینی، سیب زمینی شیرین، انجیر، سیب، هلو و هسته‌داران رشد کند (20). جداسازی این قارچ از ذرت و پنبه دانه در آمریکا، غلات در نیجریه، گندم و ذرت در چین گزارش شده است (8 و 12). در زمینه آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین در ایران پژوهش‌هایی انجام شده است (6 و 7). آلودگی پسته رفسنجان و اصفهان به سم آفلاتوکسین و قارچ *A. flavus* گزارش شده است (7). همچنین در سال 1372 این قارچ از بذور ذرت جدا و در سال 1380 آلودگی بذر ذرت به قارچ *A. flavus* 47 درصد اعلام شده است (1 و 6).

آفلاتوکسین‌ها، مایکوتوکسین‌هایی هستند که به وسیله چندین گونه از قارچ‌های جنس *Aspergillus* شامل *A. flavus* و *A. parasiticus* و *A. nomius* تولید می‌شوند (10 و 11). چهار آفلاتوکسین که به‌طور طبیعی تولید می‌شوند به نام‌های آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 شناخته می‌شوند. هنگامی‌که مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 توسط گاوهای شیری مصرف می‌شوند هیدوکسیله شده و به آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 تبدیل می‌شوند که در شیر آنها قابل ردیابی می‌باشد. میزان سمی بودن آفلاتوکسین M_1 نسبت به مولکول‌های مادر کمتر است ولی به علت مصرف شیر گاو به وسیله انسان، اهمیت بیشتری دارند. به علت زیاد بودن آفلاتوکسین‌ها در غذاهای انسان و حیوانات به وسیله بیشتر کشورها محدودیت‌هایی اعمال می‌شود (11 و 20). میزان این محدودیت‌ها متفاوت است و باتوجه به شرایط آب و هوایی متغیر می‌باشد. به‌طوری‌که در کشورهای گرمسیری به علت تولید محصولات کشاورزی حساس، بیشتر

و در کشورهای با آب و هوای معتدل و سرد کمتر می‌باشد. کمیسیون اروپا محدودیت‌های قانونی برای بادام زمینی و غلات را برای مصرف مستقیم انسان برای همه آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 (4 µg/kg) و برای B_1 به تنهایی (2 µg/kg) و برای AFM_1 در شیر (0/05 µg/kg) درنظر گرفته است (11 و 15).

برای تعیین میزان آلودگی شیر به آفلاتوکسین M_1 در سال 2000 در استان سئول کره جنوبی از روش HPLC استفاده شده و میزان آلودگی 15 تا 342 pg/g اعلام شد (17). همچنین در آرژانتین از روش ELISA برای تعیین مقدار آفلاتوکسین شیر استفاده شده است (18). در ایران نیز در سال 1378 میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر گاوداری‌های اطراف شیراز به روش کروماتوگرافی و ELISA و همچنین با روش اسپکتروفتومتری میزان شیر مادران شیرده به آفلاتوکسین M_1 تعیین شده است (7).

این پژوهش به منظور بررسی میزان آلودگی خوراک دام (شامل ذرت، جو، گندم، تخم پنبه، نان خشک، سویا، یونجه، سبوس، آرد جو، کنجاله کلزا، کنجاله پنبه، سیلوی ذرت و تفاله چغندر) مورد استفاده در گاوداری‌های اطراف تهران به قارچ *A. flavus* انجام شد. چون وجود آفلاتوکسین M_1 در شیر بسیار خطرناک می‌باشد و اثرات سرطان‌زایی و عوارض زیادی دارد لذا برای مشخص شدن مقدار این سم در شیر گاوداری‌های منطقه تهران شیر خام این گاوداری‌ها از نظر آلودگی به آفلاتوکسین آزمایش شد.

مواد و روشها

در ابتدا از دامداری‌های موردنظر در منطقه نمونه‌برداری شد. سپس 50 عدد از نمونه‌های شمارشی (مانند پنبه دانه و ذرت) به مدت 30 ثانیه با آب ژاول (هیپوکلریت سدیم دو درصد) در زیر هود ضدعفونی شد (6 و 8). سعی شد تا از دانه‌های آسیب‌دیده، شکسته شده و دانه‌های دارای اثرات ناشی از خسارت حشرات بر روی آنها استفاده شود. سپس30 ثانیه با آب مقطر سترون شستشو داده و در پایان نمونه برای خشک شدن روی کاغذ صافی سترون گذاشته شد. پس از آن تعداد 50 عدد از دانه‌ها بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) منتقل شد (9). نمونه‌های کشت شده به انکوباتور منتقل و در دمای 25 تا 28 درجه سانتی‌گراد به مدت سه تا چهار روز نگهداری و برای خالص‌سازی از روش تک اسپور استفاده گردید (9).

شناسایی قارچ‌ها براساس روشهای موجود انجام شد (16 و 19). برای اثبات تولید سختینه توسط جدایه‌های *A. flavus* از روش کوتی استفاده شد (12). جدایه‌ها بر روی CzA درون تشتک‌های نه میلی‌متری کشت شدند و در دمای 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 14 روز نگهداری شدند. برای

هر جدایه سه تکرار اعمال شد و این آزمایش دو بار[1] تکرار گردید و پس از گذشت 14 روز از نظر تولید سختینه بررسی شدند. تولید و عدم تولید سختینه به صورت (+) و (-) در نظر گرفته شد. برای تعیین تولید سم توسط جدایه‌ها از روشهای موجود استفاده شد (8). برای این منظور جدایه‌ها بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت شده و پنج روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری گردید. سپس پرگنه قارچ به صورت وارونه در پتری قرار داده شد. با استفاده از محلول آمونیوم 27 درصد، سطح پشتی پرگنه ها بخارپاشی شد و پس از پنج دقیقه تولید رنگدانه زرد به وسیله جدایه‌های *A. flavus* بررسی شد. این آزمایش با سه تکرار و دو بار انجام شد.

برای تعیین میزان آفلاتوکسین در شیر ابتدا گاوداری‌های مورد آزمایش کدگذاری (جدول 1) و از تانکرهای محل نگهداری شیر هر گاوداری نمونه‌گیری شد.

مقداری شیر داخل بشر 500 میلی لیتری ریخته و دمای شیر را با حمام بخار آب به 37 درجه سانتی‌گراد رسانیده و برای همگن شدن چربی هم‌زده [2] شد (13). سپس برای جدا کردن شیر از چربی، در دور 2000 x g سانتریفوژ و لایه‌رویی آن جدا نموده و دور ریخته شد (13). پس از دو مرحله گذراندن از کاغذ صافی، 50 میلی‌لیتر از آن انتخاب و این مقدار از ستون ایمونوافینیتی گذرانیده و پس از خشک نمودن، 500µl از محلول فاز متحرک به آن اضافه گردید و در پایان 20 µl از این محلول به دستگاه HPLC تزریق شد.

نتایج و بحث

در این بررسی دامنه تغییرات رنگ جدایه‌ها از سبز مایل به زرد تا سبز زیتونی بود که مطابق با گزارشات سایر محققین بود (16 و 19). قطر وزیکل نیز در جدایه‌ها از 34 تا 46/6 میکرومتر متغیر بود. در یک تحقیق قطر وزیکل از 25 تا 60 و در تحقیق دیگر از 20 تا 45 میکرومتر گزارش شده است (16 و 19). اگرچه مقایسه این گزارش نتایج حاصل را تأیید می‌نماید ولی برخی از جدایه‌ها وزیکل‌هایی بیش از 45 میکرومتر داشتند که این امر ممکن است به دلیل تفاوت در نوع میزبان قارچ یا خصوصیات خاص سویه‌های این قارچ در این منطقه باشد. قطر کنیدی 3/3 تا 5/05 میکرومتر متغیر بود که با نتایج سایر محققین (3/5 تا پنج میکرومتر) مطابقت دارد (19).

در این بررسی تعداد 14 جدایه *A. flavus* از ذرت و دیگر فرآورده‌های آن جدا شد که بیشترین مقدار را دارد. آلودگی دانه‌های ذرت به این قارچ در

1 - Duplicate

2 - Stir

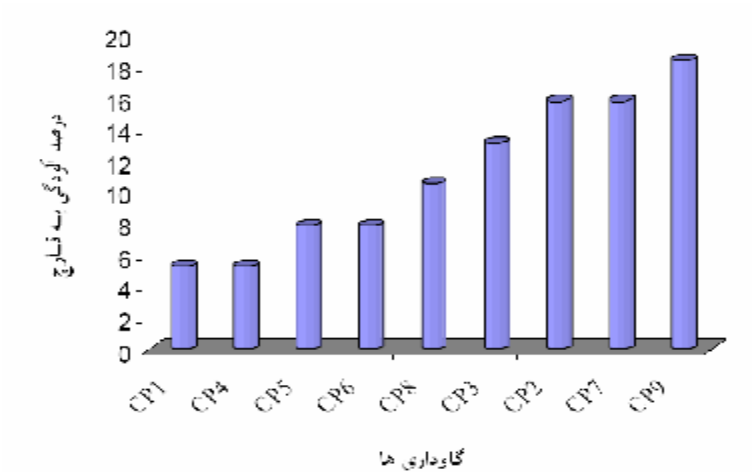
مزارع مازندران و بر روی دانه‌ها گزارش شده است (1 و 6).

چون در بیشتر گاوداری‌ها شرایط نگهداری مواد خوراکی مناسب نیست، لذا این قارچ به صورت ساپروفیت بر روی برگ‌ها، ساقه و دانه ذرت در مرحله برداشت وجود دارد و در شرایط هوازی به سرعت رشد نموده و گسترش می‌یابد. پوشانیدن سطح رویی سیلو پس از هر بار برداشت می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از گسترش قارچ داشته باشد.

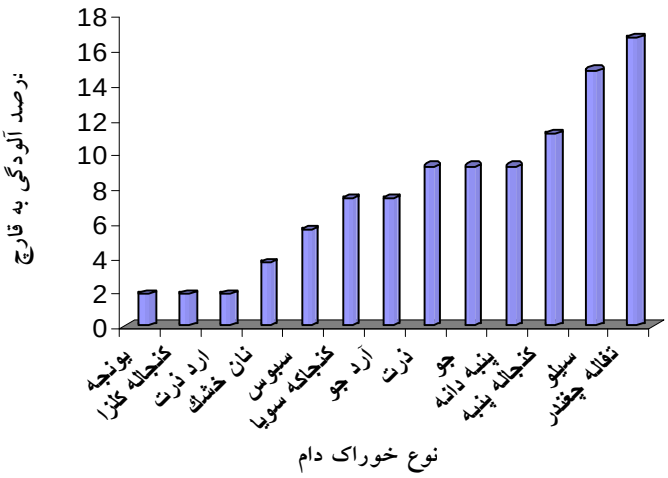
نه جدایه از این قارچ از شش نمونه تفاله چغندر جدا شد. همچنین تعداد نه جدایه از این قارچ از جو و آرد جو حاصل شد (شکل 1 و 2).

پنبه دانه و کنجاله آن سهم زیادی در تغذیه دام‌ها در گاوداری‌های مورد بررسی دارد. در این پژوهش 11 جدایه از نه نمونه پنبه دانه و کنجاله پنبه و چهار جدایه از سه نمونه سویا جدا شد.

براساس گزارش سایر محققین، حداقل باید 50 درصد جدایه‌ها سختینه تولید کنند (12). در این آزمایش بیش از 50 درصد از جدایه‌ها سختینه تولید نمودند که می‌تواند قابل قبول باشد (62/9 درصد).

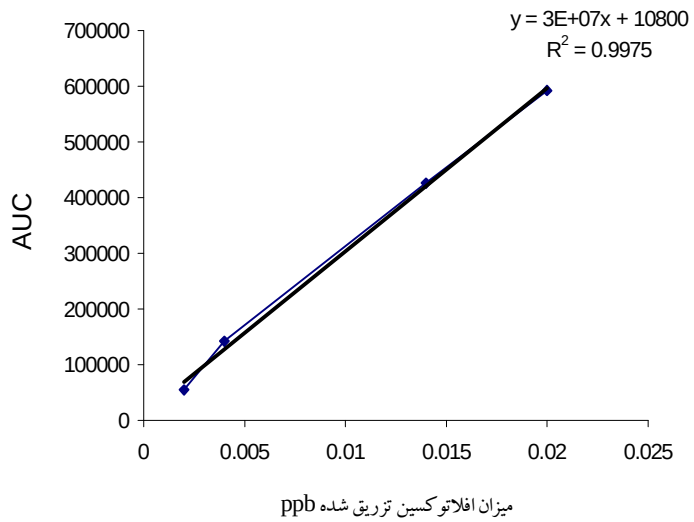


شکل 1 - درصد آلودگی (100 × کل نمونه‌ها ÷ تعداد نمونه‌های آلوده) گاوداری‌ها به قارچ *A. flavus* تولیدکننده توکسین



شکل 2 - درصد آلودگی (100 × کل نمونه‌ها ÷ تعداد نمونه‌های آلوده) خوراک‌های دام به قارچ *A. flavus*

میزان آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر مورد آزمایش بین 0/0009 تا 0/526 و میانگین آن 0/15 قسمت در بیلیون بود. ضریب رگرسیون کالیبراسیون بین 0/99 تا 0/997 در تغییر بود (شکل‌های 3، 5 و 6 و جدول 1).



شکل 3 - ضریب رگرسیون کالیبراسیون برای نمونه‌های CP1، CP6 و CP (AUC سطح زیرمنحنی می‌باشد)

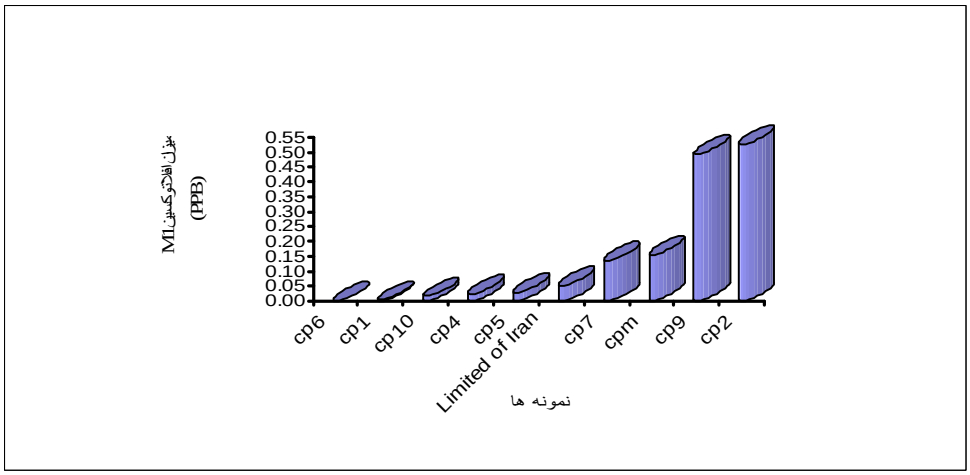
در یک تحقیق مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر پاستوریزه کشور کره با روش HPLC تعیین و ریکاوری حاصل معادل 102 تا 103 برای شیر پاستوریزه و 80 تا 90 درصد برای ماست بود (17).

ریکاوری قابل قبول برای آفلاتوکسین M_1 موجود در شیر برای غلظت 0/01 تا 0/05 µg/L حدود 60 تا 120 درصد و برای غلظت بیشتر از 0/05 µg/L حدود 70 تا 110 درصد می‌باشد. از مقایسه این ارقام با ریکاوری‌های حاصل از آزمایش حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که دقت نتایج حاصل زیاد و قابل قبول است (جدول 1).

جدول 1 - میزان آفلاتوکسین M_1، ضریب رگرسیون و ریکاوری حاصل با استفاده از روش HPLC در گاوداری‌های مورد مطالعه

کد گاوداری‌ها	ریکاوری (درصد)	ضریب رگرسیون کالیبراسیون	مقدار آفلاتوکسین (ppb)
CP1	70/31	0/997	0/0025
CP2	77/33	0/997	0/5260
CP4	104/93	0/990	0/0230
CP5	104/93	0/990	0/0270
CP6	70/31	0/997	0/0009
CP7	70/31	0/997	0/1350
CP9	77/32	0/997	0/4930
CP10	104/93	0/990	0/0160

مقایسه آفلاتوکسین موجود در شیر این گاوداری‌ها با استاندارد مجاز ایران (استاندارد ملی ایران، 1380) که معادل 0/05ppb می‌باشد، نشان می‌دهد که در پنج گاوداری مقدار آفلاتوکسین کمتر و در سه گاوداری بیشتر از استاندارد مجاز می‌باشد. اگر میانگین آفلاتوکسین موجود در کلیه نمونه‌ها با استاندارد مجاز ایران مقایسه شود در آن صورت مقدار مزبور سه برابر بیشتر از استاندارد مجاز ایران است. اگر استاندارد ایران 0/05 ppb در نظر گرفته شود آلودگی در 12/5 درصد نمونه‌ها بیش از استاندارد ایران است (شکل 4).



شکل 4 - میزان آلودگی شیر به آفلاتوکسین M_1 با در نظر گرفتن استاندارد ایران

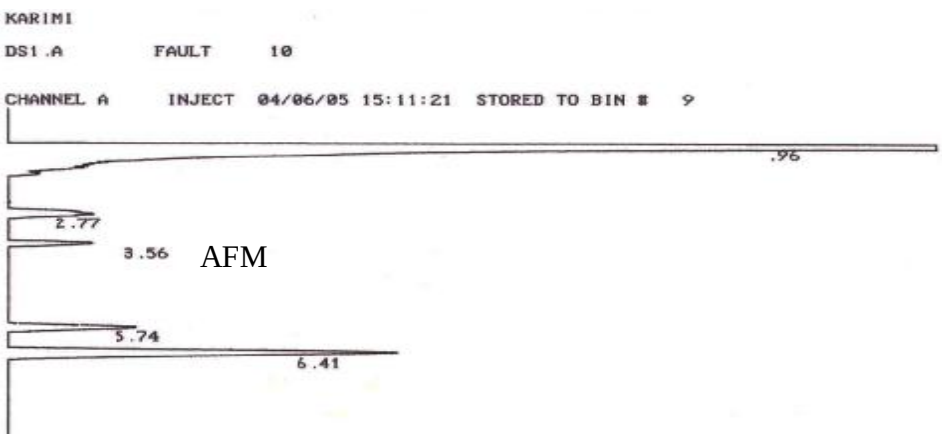
آلودگی شیر خام و پاستوریزه به آفلاتوکسین در منطقه تهران با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک 92/3 درصد گزارش شده است (4). همچنین با استفاده از روش الایزا میانگین آلودگی شیر تحویلی به کارخانجات شیر پاستوریزه تهران به آفلاتوکسین M_1 معادل 82/2 درصد تعیین شده که ارقام بیشتر از حد مجاز بوده است (3).

باتوجه به میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر گاوداری‌های ایران و میزان آفلاتوکسین حاصل در این بررسی (صفر تا 0/526 ppb) نشان می‌دهد که در مواردی مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر مصرفی بیش از حد مجاز بوده است. مؤثرترین روش جلوگیری از آلودگی شیر به آفلاتوکسین M_1، کاهش آفلاتوکسین B_1 در مواد غذایی و مکمل‌های مورد استفاده برای گاوهای شیری می‌باشد (14).

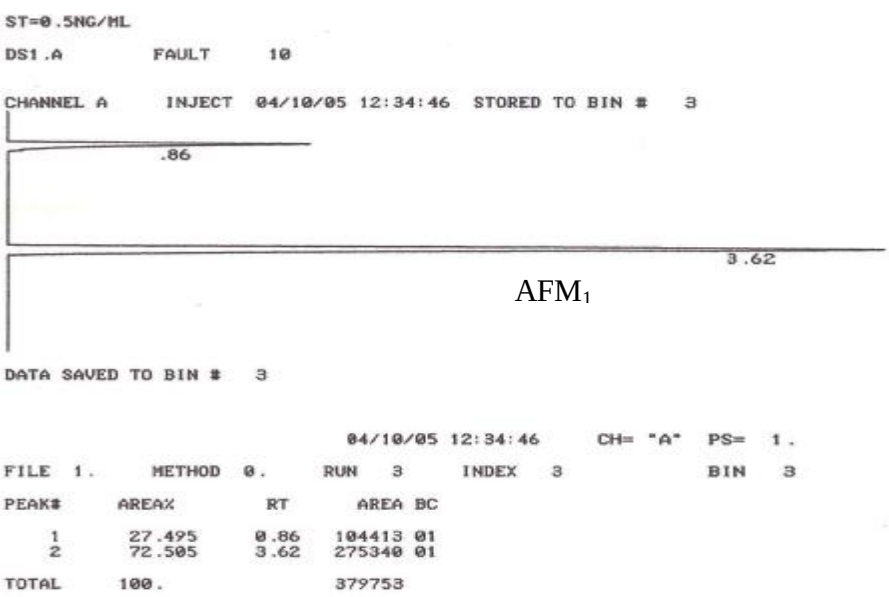
بنابراین می‌توان با کنترل رطوبت و دمای محیط نگهداری خوراک دام و نامساعد کردن شرایط رشد قارچ از تولید آفلاتوکسین جلوگیری کرد. پس برای تولید شیر با آلودگی آفلاتوکسین کمتر از 0/05 ppb باید در نگهداری غذای دام‌ها از نظر بهداشتی و تأمین شرایط نامناسب جهت رشد میکروارگانیسم‌ها دقت بیشتری به عمل آید تا از رشد قارچ‌ها و تولید آفلاتوکسین در آنها جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی

از خانم مهرنوش محمدی‌فر کارشناس گروه گیاهپزشکی و همچنین خانم مونا کامیاب کارشناس اداره کنترل غذا و دارو و همکاران ایشان که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.



HPLCدر روش CP6 شکل 5 - پیک مربوط به تزریق نمونه شیر



شکل 6 - پیک مربوط به تزریق آفلاتوکسین M_1 استاندارد 0/5 نانوگرم بر میلی‌لیتر و مساحت زیر پیک

منابع مورد استفاده

1 - بوجاری، ج. و ارشاد، ج. 1372. بررسی میکوفلور چند رقم ذرت. بیماری‌های گیاهی 29: 34-23.

2 - جهانی، ا. 1378. روشهای پیشگیری از تولید آفلاتوکسین در پسته. استاندارد. 95: 15-7.

3 - گیتی، ک. و بکایی، خ. 1377. مطالعه میزان آلودگی شیرهای تحویلی به کارخانجات شیرپاستوریزه تهران به آفلاتوکسین M_1 با استفاده از روش الیزا، مجله بهداشت ایران 42-40: 165-163.

4 - گیتی، ک. پروانه، ا. و کردی، ج. 1361. بررسی آلودگی شیر به آفلاتوکسین در منطقه تهران، مجله بهداشت ایران سال یازدهم، شماره 2-1.

5 - جولا، غ. ا. و نوذری، ن. 1378. تعیین میزان آفلاتوکسین در شیر گاوهایی که با نان خشک کپک زده به عنوان بخشی از جیره تغذیه می‌شوند. خلاصه مقالات ششمین کنگره سراسری سم‌شناسی و مسمومیت‌های غذایی ایران. صفحه 163.

6 - طیبی، ج. و میرابولفتحی، م. 1380. آلودگی تعدادی از هیبریدهای ذرت دانه‌ای به آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 و قارچ مولد آن در مزرعه. آفات و بیماری‌های گیاهی 69: 84-79.

7 - محمدی مقدم. 1378. ارزیابی حساسیت ارقام پسته به قارچ آسپرژیلوس فلاووس آفلاتوکسین‌زا و بررسی میزان تولید آفلاتوکسین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی. 140 صفحه.

8 . Abbas HK, Zablotowicz RM, Wearver MA, Horn BW, Xie W and Shier WT (2004) Comparison of cultural and analytical methods for determination of production by Mississipi Delta *Aspergillus* isolates. Can. J. Microbiol. 50: 193-199.

9 . Bankole SA and Mabekoje OO (2004) Occurrence of aflatoxins and fumonisins in preharvest maize from south-western Nigeria. Food Additives and Contaminants 21(3): 251-255.

10 . Chao-Zong L, Guey-Yuh L and Gwo-Fang Yuan (2004) Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 61-68.

11 . Chiavaro E, Asta CD, Galaverna G, Biancardi A, Gambarelli E, Dossena A and Marchelli R (2001) New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. J. Chromatogr. A, 937: 31-40.

12 . Cotty PJ (1994) Influence of field application of an aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A.*

flavus infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. Phytopathology 84: 1270-1277.

13 . Dragacci S and Grosso F (1997) Validation of analytical methods to determine the content of Aflatoxin, Ochratoxin and Patulin in foodstuffs of vegetable orgin. (Draft of method for aflatoxin M1 analysis in raw milk in suitable format for intercomparison purposes). JAOAC Int, 76: 1249-1254.

14 . FAO. Worldwide regulations for mycotoxins (1997) A compendium. FAO Food and Nutrition Paper 64, Rome, 43 pp.

15 . Henry S, Whitaker H, Rabbani TI, Bowers J, Park D, Price W, Bosch FX, Pennington J, Verger P, Yoshizawa T, van Egmond H, Jonker MA and Coker R (2000) Aflatoxin M1 the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. 135**.**

16 . Kilch MA and Pitt J (1988) Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Trans. Br. Soc. 91: 99-108.

17 . Kim EK, Shon DH, Ryu D, Park JW, Hwang J and Kim YB (2000) Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminants 17(1): 59-64

18 . Lopez C, Ramans L, Ramadan S and Bulacio L (2003) Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. Journal Food control 14: 31-34.

19 . Pitt JI and Hocking AD (1997) Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional. 554P.

20 . Salunkhe DK, Adsule RN and Padule DN (1987) Aflatoxins in foods and feeds. B.V. Gupa. Managing Diverter Metropolition. p. 510.

21 . Summer E Paul and Deway lee (2003) Reducing aflatoxin in corn during harvest and storage. Cooperative extension service/The University of Georgia College of agricultural and environmental sciences. p 36.

Journal of Agriculture, Vol. 9, No. 2, 2007

Isolation of *Aspergillus flavus* from Feeds and Determination of Aflatoxin M_1 in Milk from some Dairy Farms of Tehran by HPLC

M. Sanadgol *, H. Aminian **, H. R. Etebarian ***, G. Abouhossin **** and O. Sabzevari ****

Abstract

Isolates of *A. flavus* obtained from different feeds such as corn, barley, wheat, cotton seed, bread waste, soybean, alfalfa, wheat bran, barley meal, canola meal, corn silage and beet pulp from nine dairy farms in Tehran province during 2004. Ability of sclerotiom production by isolates was tested. Results showed 62.9 percent of isolates produced sclerotiom on CzA medium and 68.5 percent of these isolated were aflatoxigenic. From pollution of feed by *A. flavus* point of view in dairy farms were between 20.37 - 3.7 percent. 16.67 percent of isolates obtained from beet pulp as the most contaminated feed. Alfalfa, canola meal and corn meal with medium 1.8 percent were of the least in every contaminated feeds. Analysis of milk samples by HPLC showed that the rate of AFM_1 in samples varied and ranged from 0.0009 to 0.5269 ppb. Calibration regression coefficients determined 0.99 to 0.997 for these experiments and determined recovery was between 70.31 to 1.4.93 percent in these experiments.

Key words: Aflatoxin B& M, *Aspergillus flavus,* Feed, HPLC, Milk

* - Msc., Department of Plant Protection, College of Aoureihan, University of Tehran, Tehran - Iran

** - Assistant Professor, Department of Plant Protection, Abouraihan College, University of Tehran, Tehran - Iran (Corresponding Author. Email: **haminian@ut.ac.ir**)

*** - Professor, Department of Plant Protection, Abouraihan College, University of Tehran, Tehran - Iran

**** - Food and Drug Control Center, Tehran - Iran

***** - Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical, Tehran - Iran