



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ „ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА“
Катедра „Вътрешни незаразни болести,
патология и фармакология“

МАЖД ИБРАХИМ АБИ ХАЙДАР

**РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТИПОВЕ
АФЛАТОКСИНИ В СУРОВО МЛЯКО ОТ КРАВИ,
ОТГЛЕЖДАНИ ПРИ РАЗЛИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ, ХРАНЕНЕ
И СЕЗОНИ В ДОЛИНАТА БЕКАА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен „доктор“

Професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина
Научна специалност: „Патология на животните“

Научни ръководители:

доц. д-р Тони Атанасов Тодоров
проф. д-р Мона Аббуд

Рецензенти:

доц. д-р Методи Христов Петричев
проф. д-р Румен Георгиев Бинев

София, 2024

Дисертационният труд съдържа 156 страници, 20 таблици, 24 фигури и 3 приложения. Списъкът с литература включва 382 заглавия. Направени са общо 16 заключения, 6 препоръки и 5 научно-приложни приноса.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 10.01.2025 г. от 11.00 часа в зала „Акад. Мако Даков“ на Лесотехническия университет, гр. София, бул. „Климент Охридски“ №10 на открито заседание на Научно жури, утвърдено със заповед ЗПС-646/8.11.2024 г. в състав:

Председател: проф. д-р Красимира Иванова Генова

Членове: доц. д-р Методи Христов Петричев
проф. д-р Румен Георгиев Бинев
доц. д-р Антон Георгиев Русенов
доц. д-р Иван Вълчев Трифонов

Материалите по защитата (дисертационен труд, автореферат, рецензии и становища на научното жури) са на разположение в Деканата на ФВМ, гр. София, бул. Климент Охридски № 10, стая 104 и са публикувани на сайта на Лесотехническия университет (www.ltu.bg).

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Афлатоксините са микотоксини, произвеждани от някои видове *Aspergillus*, особено от *A. Parasiticus*, но рядко от *A. nominus* (Rahimi et al., 2010), които могат да растат върху няколко вида селскостопански продукти. Идентифицирани са основните видове естествено срещащи се АФ: афлатоксин В1 (AFB1), афлатоксин В2 (AFB2), афлатоксин G1 (AFG1), афлатоксин G2 (AFG2), афлатоксин М1 (AFM1) и афлатоксин М2 (AFM2). AFB1 е с най-висока степен на токсичност, следван от AFM1, AFG1, AFB2 и AFG2 (Gourama and Bullerman, 1995). AFB1 се счита от Международната агенция за изследване на рака за най-хепатокарциногенен, тератогенен и мутагенен от тази група микотоксини (Gourama and Bullerman, 1995; IARC, 2002). AFM1 (хидроксилитаните метаболити на AFB1) могат да бъдат открити в млякото, млечните продукти и месото на млекодайки говеда и бозайници, които са погълнали фуражи, замърсени с AFB1 (Creppy, 2002). Според животински модел коефициентът на превръщане на AFB1 в AFM1 варира от 0,3 до 6% (Var and Kabak, 2009).

Според Организацията по прехрана и земеделие (2004 г.) максималното допустимо количество AFB1 във фуражите е определено на 20 ppb. Администрацията по храните и лекарствата на Съединените американски щати (САЩ) наложи ограничение за афлатоксини от 20 ppb за храни, както и за повечето фуражи и фуражни съставки. От друга страна, Европейският съюз (ЕС) определи максимална граница от 20 µg/kg за AFB1 във всички фуражни суровини, пълноценни и допълващи фуражи за говеда, овце, кози, свине и птици (с изключение на млади животни) и 5 µg/kg за пълноценни фуражи за млекодайки животни (Food Standard Agency (FSA), 2004). Млякото има най-голям доказан потенциал за въвеждане на AFM1 в човешката диета и излагането на AFM1 чрез млечните продукти е сериозен проблем за общественото здраве (Ruangwises and Ruangwises, 2010).

Неотдавна в Ливан бяха проведени няколко проучвания на замърсяването с AFM1 и разпространението му в млякото и млечните продукти (ElKhoury et al., 2011; Elkak et al., 2011; Hassan and Kassaify, 2014 и Daou et al., 2020). Подобно проучване е направено в Сирия (Ghanem and Orfi, 2009), в Палестина (Al-Zuheir and Abo Omar, 2012), в Йордания (Natour et al., 1991; Sharaf, 2012), в Кувейт (Dashti et al.,

2009), в Турция (Celik et al., 2005). Поради потенциалната токсичност на AFM1 повечето държави са определили максимално допустими нива за AFM1 в млякото и млечните продукти. Максимално допустимите нива на афлатоксини M1 в млякото са 0,05 ng/g в Европейския съюз и 0,5 ng/g в Съединените щати. Проведени са и други изследвания, които показват влиянието на различните системи на отглеждане, хранене и сезони върху вариациите в нивата на AFM1 в млякото (Lopez et al., 2003). Нивото на AFM1 варира при различните животни в различни дни и доенета (Martins and Martins, 2004). Млекодобивът е един от факторите, влияещи върху общото отделяне на AFM1 (Masoero et al., 2007). Предишни изследвания са установили значителна сезонна промяна в нивата на AFM1 в млякото (Kamkar, 2005; Rahimi and Ameri, 2012; Ruangwises and Ruangwises, 2010). Установено е, че нивата на АФМ във фуражите са по-високи през влажните сезони, отколкото през сухите. Освен това използването на големи количества замърсени концентрати е по-често срещано през зимните месеци (Kamkar et al., 2011).

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на това проучване е да се определи нивото на афлатоксин M1 (АФМ1) в сурово краве мляко, произведено в три различни млечни региона в долината Бекаа, Ливан (Баалбек, Захлех и Западна Бекаа), характеризиращи се с различни типове земеделие и с различен микроклимат в продължение на една година.

Задачи

За постигане на горната цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се категоризират и изберат подходящи ферми за отглеждане на крави в трите млечни региона на долината Бекаа (Баалбек, Захлех и Западна Бекаа).
2. Да се оцени влиянието на регионалните различия върху замърсяването на суровото краве мляко с афлатоксин M1 (AFM1).
3. Да се оцени влиянието на типа земеделие и технологията върху замърсяването на суровото краве мляко с афлатоксин M1 (AFM1).

4. Да се оценят сезонните колебания в замърсяването на суровото краве мляко с афлатоксин M1 (AFM1).

5. Да се оценят появата и нивата на афлатоксин B1 (AFB1) в най-често използваните фуражи като източник на замърсяване на суровото краве мляко с афлатоксин M1 (AFM1).

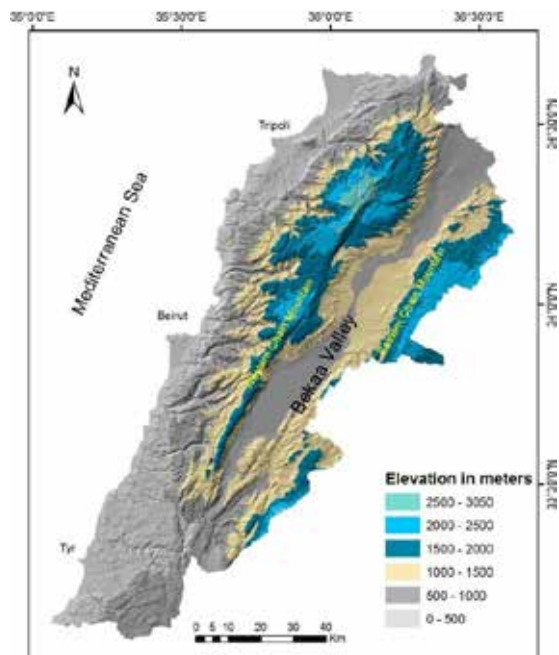
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III.1. ЛОКАЦИЯ НА ЕКСПЕРИМЕНТА

Проучването е направено в района на Бекаа. Долината Бекаа, известна в класическата древност като Куле-Сирия, е плодородна долина и основен селскостопански район в Източен Ливан. Това е най-важният земеделски регион в Ливан. В Бекаа процъфтява и промишлеността, особено тази, свързана със селското стопанство (Фиг. 2).

Бекаа се намира на около 30 km източно от столицата Бейрут. Долината е разположена между две успоредни планински вериги – планината Ливан на запад и Антиливанските планини на изток (Фиг. 1). Тя е северното продължение на Йорданската рифтова долина и по този начин е част от Голямата рифтова долина, която се простира от Сирия до Червено море. Дължината ѝ е само около 120 km, а средната ѝ ширина е около 16 km.

Трите основни млечни региона с различни стопанства, които са включени в нашето проучване на долината Бекаа (R1: Баалбек (Фиг. 3), R2: Захлех (Фиг. 4) и R3: Западна Бекаа (Фиг. 5) се характеризират с различни видове земеделие и с различен микроклимат. R1 е разположен на 1250 m надморска височина и се характеризира с полусух климат (410 mm валежи годишно), регион R2 (900 m надморска височина и средни валежи 686 mm годишно) и R3 (средни валежи 860 mm годишно) се считат за умерен климат (Wikipedia, 2023).



Фиг. 1. Карта на Ливан, показваща местоположението на долината Бекаа между двете планини (Google maps, 2022)



Фиг. 2. Изглед към долината Бекаа (снимка на автора, 2022)



Фиг. 3. Географско местоположение на района Баалбек (R1: червена линия)
(Google Maps, 2022).



Фиг. 4. Географско местоположение на Захлех (R2: червена линия)
(Google Maps, 2022)



Фиг. 5. Географско разположение на Западна Бекаа (R3: червена линия)
(Google Maps, 2022)

III.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ И ФЕРМИ

Броят на дойните крави, включени в проучването за всеки регион (R1, R2 и R3), е посочен в Таблица 1. За по-подробна информация относно броя на стопанствата, мащаба на стопанствата и броя на животните във всяко стопанство вижте приложения 1, 2 и 3.

Таблица 1. Общ брой на дойните крави във всеки регион в зависимост от мащаба на стопанството и общия брой на млечните проби

	R1: Baalbeck	R2: Zahleh	R3: West Bekaa	Total
Total milking cows included in the study	2417	1655	1285	
Small scale farm	21	9	13	
Large scale farm	9	20	16	
Milk Samples = Total farm (for 1 season)	30	29	29	
Total Milk Samples for All Seasons	120	116	116	352

По-голямата част от стадата, отглеждани във всички региони, принадлежат към местната (баладийска) порода, която се характеризира с ниска млечност; забелязват се и породите Холщайн, Холщайн х Балади и Нормандия, особено в Захлех и Баалбек (Фиг. 6).



Фиг. 6. Порода крави в експеримента (снимка на автора, 2021)

III.3. ПРАКТИКА НА ХРАНЕНЕ

В трите млечни региона концентратите, съставени от царевица, ечемични трици, соя, пшенични трици и памучни семена, представляват основната част от храната. През есента и зимата в региони R1, R2 и R3 кравите са получавали пшенична слама в допълнение към концентратите, докато стадото от R2 и R3 е получавало царевичен силаж (Фиг. 7). Въпреки това през пролетта и лятото кравите в регион R3 са получавали по-малко концентрати и са пасли повече на наличните пасища, докато в региони R1 и R2 говедата са получавали люцерна и сено през пролетния и летния сезон. Освен това повечето крави в трите различни млечни региона се отелват през пролетта и през този период се наблюдава най-висока продукция.



Фиг. 7. Съхранение на фуражи в различни ферми (снимка на автора, 2021)

III.4. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИ ОТ МЛЯКО И ФУРАЖИ

Събиране на проби от мляко. Във всеки регион R1, R2 и R3 на изследването: Бяха избрани съответно 30, 29 и 29 ферми, разделени на малки ферми – по-малко от 20 крави/ферма, и големи ферми – повече от 20 крави/ферма (Таблица 1 и приложения 1, 2, 3). Някои ферми бяха отстранени от проучването във всеки регион (B9 и B10 от R1; Z4, Z31, Z32 от R2; и WB13, WB14, WB 21 от R3), тъй като собствениците им вече не можеха да купуват фураж поради икономическата криза и ситуацията в Ливан през периода на проучването досега, така че трябваше да продадат фермите си (приложения 1, 2, 3).



Фиг. 8. Събиране на проби от мляко (снимка на автора, 2021)

Общо 352 млечни проби: 116, 120 и 116 проби бяха събрани от фермите в трите региона Баалбек (R1), Захлех (R2) и Западна Бекаа (R3) (Таблица 12). Млечните проби са събрани от резервоара на всяка ферма на сезонна основа (в средата на сезона) от октомври 2021 до август 2022 г.

Пробите бяха транспортирани до лабораторията в изолиран контейнер при температура около 4°C (Фиг. 8). Пробите бяха съхранявани при -20°C дълбоко замразяване до провеждането на тестовете. По време на анализа пробите бяха приведени към стайна температура (Richard et al., 1993).

Беше извършена инспекция на страните за съхранение на фуражите, за да се определи физическото състояние на складовете плюс наличието на външни фактори, които могат да повлияят на качеството на фуражите.

Всички проби бяха подложени на тест ELISA в лабораториите на Dairy Khoury-Ain Sendyeneh-Mont Liban.

Събиране на фуражни проби. Избрани са 15 ферми от три региона (5 ферми от Баалбек (R1), 5 от Захлех (R2) и 5 от Западна Бекаа (R3), като от всяка ферма са събрани 6 фуражни проби (общо 90 проби). Изследваните фуражи включват: ечемични трици, соя, царевича, памучни семена (внос), пшенични трици и сено (местни). Всички проби са взети от фермата, а не от източника на произход. Всички проби са събрани между края на юни 2022 г. и началото на юли 2022 г. Повечето от стопанствата, от които са събрани пробите, са дребномащабни стопанства от трите региона. Пробите (по 200 g) бяха поставени в найлонови торбички и транспортирани до лабораторията в рамките на 12 часа. Пробите бяха съхранявани при 4°C и анализирани за AFB1 в рамките на седем дни след събирането им.

III.5. ПРОЦЕДУРА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ (ELISA) НА AFM1 И AFB1

Количеството на афлатоксин M1 е определено по метода на ензимно-сорбентния анализ (ELISA), като е използван тест комплект RIDASCREEN® Aflatoxin M1 (R1121) (R-biopharm, Darmstadt, Германия), който представлява конкурентен ензимен имунен анализ, основан на реакция антиген-антитяло. Този комплект включва микротитърни плаки, покрити с улавящи антитела, стандартни разтвори на AFM1, използвани за построяване на калибрационната крива, конюгиран с пероксидаза AFM1, субстрат (карбамид пероксидаза), хромоген (тетраметилбензидин) и стоп-реагенти 1 N сярна киселина. За количествения анализ на AFM1 се използва проба от 100 µl, като се използва търговският комплект RIDASCREEN® (R-Biopharm, Германия). Млечните проби бяха центрофугирани за 10 min при 3500 об/мин. на 100°C. Горният кремообразен слой беше напълно отстранен чрез аспириране през пастърна пипета.

III.5.1. Процедура на изследване

Точното измиване е много важно. Не позволявайте на микровълновите ями да изсъхнат напълно и избягвайте продължителни интервали между работните стъпки. Възпроизводимостта на всяка ELISA до голяма степен зависи от последователността, с която се промиват микроклетките. Внимателно следвайте препоръчаната последователност на измиване, както е описано в процедурата за изпитване ELISA. Избягвайте пряка слънчева светлина по време на всички инкубации. Затова се препоръчва покриване на микротитърните плаки.

1. Поставете достатъчен брой ямки в държача за микроклетки за всички стандарти и проби, които трябва да се проведат. Запишете позициите на стандартите и пробите.
2. Пипетирайте 50 μl от стандарта или подготвената проба в отделни ямки; използвайте нов накрайник за всеки стандарт или проба.
3. Добавете 50 μl ензимен конюгат (червена капачка) във всяка ямка.
4. Добавете 50 μl разтвор на антиафлатоксин M1 антитяло (черна капачка) във всяка ямка. Разбъркайте внимателно чрез ръчно разклащане на плаката и инкубирайте в продължение на 10 min (+/- 1) при стайна температура (20-25 °C/68-77 °F).
5. Излейте течността от ямките в мивка. Почукайте държача за микроклетки с главата надолу върху чиста филтърна кърпа (3 пъти подред), за да отстраните цялата останала течност от ямките. Като използвате бутилка за промиване или многоканална пипета, напълнете ямките (250 μl на ямка) с буфер за промиване. Изпразнете ямките отново и отстранете цялата останала течност. Повторете стъпката за измиване още 2 пъти.
6. Добавете по 100 μl субстрат/хромоген (кафяво вещество) във всяка ямка. Разбъркайте внимателно чрез ръчно разклащане на плаката и инкубирайте за 5 min (+/-0,5) при стайна температура (20 – 25°C/68 – 77°F) на тъмно.
7. Добавете 100 μl стоп разтвор (жълта капачка) във всяка ямка. Разбъркайте внимателно чрез ръчно разклащане на плаката и измерете абсорбцията при 450 nm. Отчитайте в рамките на 10 min.

Относно подготовката на пробите и провеждането на изпитвания на съставките на фуражите за откриване на AFB1: Подготовката на пробата (екстракция, филтриране, разреждане) е извършена в съответствие с RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC Kit (артикулен №: R9002), който представлява конкурентен ензимно-свързан имуноабсорбентен анализ за количествен анализ на афлатоксин във фуражите. Пробите трябва да се съхраняват на хладно място, защитено от светлина. Представителна проба (в съответствие с приетите техники за вземане на проби) трябва да бъде смляна и добре разбъркана, преди да се пристъпи към процедурата за екстракция. Преди употреба всички реактиви и проби се поставят на стайна температура (20 – 25°C) и подготовката на пробите се извършва при стайна температура. 5 g смляна проба се прибавя към 25 ml 70% метанол и се разклаща енергично в продължение на три минути с автоматична клатачка. Сместа се филтрира през филтър Whatman № 1. 1 ml от получения филтрат се разрежда с 1 ml дестилирана или дейонизирана вода. Използват се 50 µl от разредения филтрат за всяка ямка в теста. Подготовката на теста и тестовата процедура се извършват съгласно инструкциите и препоръките на производителя на RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC Kit (R-Biopharm, Darmstadt, Германия).

III.5.2. Резултати от ELISA теста за AFM1 и AFB1

За AFM1 се предлага специален софтуер, RIDA®SOFT win (артикулен № Z9999), за оценка на ензимния имуноанализ RIDASCREEN. За единично определяне препоръчваме оценка по логаритмичен метод, а за двойно или многократно определяне трябва да се използва кубичен сплайн. Ходът на стандартната крива е показан в сертификата за осигуряване на качеството, приложен в теста. За AFB1 е използван специален софтуер RIDASOFT® Win.NET (артикулен № Z9996FF) за оценка на ензимния имуноанализ Ridascreeen. На тази основа софтуерната програма изчислява стандартната крива и съдържанието на афлатоксин в пробите.

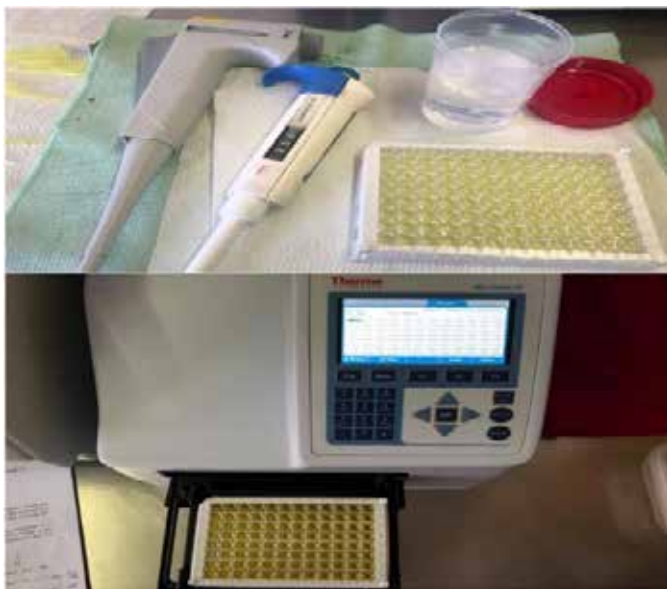
III.5.3. Бележки относно определянето на AFM1 без софтуер

Абсорбция на стандарта (или пробата)/абсорбция на нулевия стандарт $\times 100 = \% \text{ абсорбция}$. По този начин нулевият стандарт се прави равен на 100% и стойността на абсорбцията се изразява в проценти. Стойността, изчислена за стандартите, се вписва в координатна система върху полулогаритмична графична хартия спрямо концентрацията на афлатоксин M1 (ng/l) (Фиг. 9). За да се получи реално съдържашата се в пробата концентрация на афлатоксин M1 в ng/l (ppt), концентрацията, отчетена от калибрационната крива, се умножава допълнително по съответния коефициент на разреждане (Фиг. 10). Когато се работи в съответствие с посочените разпоредби, коефициентът на разреждане е следният:

Мляко	1
Мляко на прах (отнасящо се за възстановено мляко)	1
Мляко на прах (по отношение на теглото в g)	10



Фиг. 9. Анализ на млякото след центрофугиране и микроклетки за изследване с ELISA (снимка на автора, 2021)



Фиг. 10. Процедура на ELISA с използване на микроклетки и микропипети и ELISA четец, за да се видят резултатите (снимка на автора 2021).

III.6. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистическият анализ е извършен с помощта на Статистически пакет за социални науки (SPSS версия 8.0 за Microsoft Windows; SPSS, Чикаго, IL). Резултатите бяха изразени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение. Беше проведен дисперсионен анализ ANOVA, за да се определят разликите в съдържанието на AFB1 между източниците на мляко, системите и сезоните. Вероятност $<0,05$ се счита за достоверна. За AFB1 всички статистически анализи бяха извършени в GraphPad Prism 8.4.2. Приложихме едноизборен t-тест, за да сравним средната концентрация на AFB1 във фуражите със законовата граница в САЩ и Ливан ($20 \mu\text{g/kg}$) и да определим дали те се различават значително. Анализът на вариациите (ANOVA) беше използван за изследване на статистическите разлики между средните нива на AFB1 във фуражите. Вероятност $p < 0,05$ се считаше за достоверна.

IV. РЕЗУЛТАТИ

IV.1. НИВО НА АФЛАТОКСИН М1 В СУРОВО МЛЯКО В РАЗЛИЧНИ РЕГИОНИ НА ДОЛИНАТА БЕКАА

A. Ниво на афлатоксин М1 в сурово краве мляко в Baalbeck

Честотата на замърсяване с афлатоксин М1 в млякото в Баалбек е показана в Таблица 2.

Таблица 2. Ниво на афлатоксин М1 в сурово краве мляко в Баалбек през различните сезони в различни ферми (n: брой; ES: европейски стандарт)

Season	Farms	Samples Size (n)	Samples (n) > 50 ng/kg (ES)	% of Samples > 50 ng/kg (ES)	AFM1 : Concentration (ng/kg)		
					Minimum	Maximum	Mean±SD
Winter	small scale	21	0	0	6	31	22.11±8.6
	large scale	9	0	0	6	38	17.33±7.06
Spring	small scale	21	0	0	8	24	15.33±5.05
	large scale	9	0	0	10	44	20.33±10.71
Summer	small scale	21	0	0	0	47	21.95±13.47
	large scale	9	0	0	0	31	18.56±11.5
Fall	small scale	21	0	0	0	17	1.44±4.3
	large scale	9	0	0	0	16	1.76±4.6

Според Таблица 2 средните стойности на афлатоксин М1 показват минимални стойности през есента както в малките, така и в големите ферми, а максимални стойности през зимата в двете системи.

В малките и големите ферми нито една проба не показва АФМ1, по-висок от европейския стандарт (50 ng/kg), докато всички проби мляко през есента бяха по-ниски от европейските стандарти.

B. Ниво на афлатоксин М1 в суровото мляко в Zahleh (Таблица 3)

Таблица 3. Ниво на афлатоксин М1 в Zahleh през различните сезони в различните ферми (n: брой; ES: европейски стандарт)

Season	Farms	Samples Size (n)	Samples (n) > 50 ng/kg (ES)	% of Samples > 50 ng/kg (ES)	AFM1 : Concentration (ng/kg)		
					Minimum	Maximum	Mean±SD
Winter	small scale	9	0	0	0	38	13.44±12.5
	large scale	20	0	0	0	20	15.15±12.13
Spring	small scale	9	1	11.5	0	63	10.33±20.9
	large scale	20	1	5	0	71	14.60±19
Summer	small scale	9	0	0	0	26	10.22±10.8
	large scale	20	0	0	0	38	15.05±10.7
Fall	small scale	9	0	0	0	10	1.1±3.33
	large scale	20	0	0	0	16	2.7±5.1

Резултатите от това проучване в този регион в малки ферми показва, че AFM1 е открит в 11,1% от пробите мляко през пролетта, като са установени по-високи стойности от европейските стандарти през пролетта (50 ng/kg). В големите ферми в 5% от изследваните проби през пролетта са установени стойности на AFM1, по-високи от европейските стандарти. Нито една от изследваните проби през есента, лятото или зимата не показва нива на AFM1, по-високи от европейските стандарти.

С. Ниво на афлатоксин М1 в сурово мляко в Западна Бекаа

Съдържанието на афлатоксин М1 в суровото мляко в района на Западна Бекаа през четирите сезона е представено в Таблица 4. Въпреки това няма значителна разлика ($P > 0,05$) в средните стойности на AFM1 между двете системи и четирите сезона в този регион.

Таблица 4. Ниво на афлатоксин М1 в сурово краве мляко в Западна Бекаа през различните сезони в различните ферми (n: брой; ES: европейски стандарт)

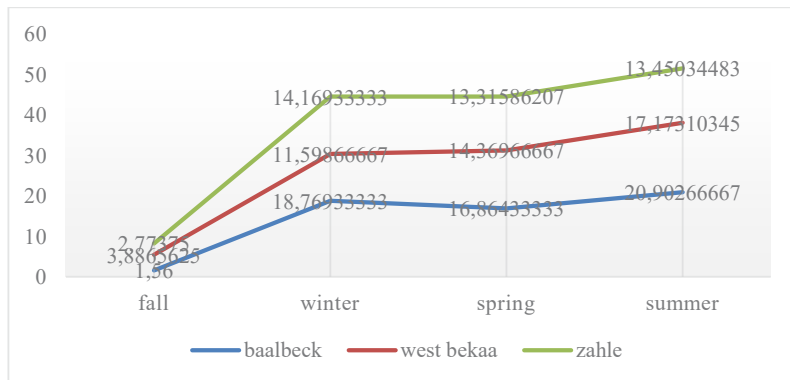
Season	Farms	Samples Size (n)	Samples (n) > 50 ng/kg (ES)	% of Samples > 50 ng/kg (ES)	AFM1 : Concentration (ng/kg)		
					Minimum	Maximum	Mean±SD
Winter	small scale	13	0	0	0	23	12.6±7.8
	large scale	16	0	0	0	38	11±10.8
Spring	small scale	13	0	0	0	26	12.3±7.3
	large scale	16	0	0	0	46	11±16.9
Summer	small scale	13	2	15.3	0	59	21.3±13.3
	large scale	16	2	15.3	0	80	18.7±11.5
Fall	small scale	13	0	0	0	13	5.38±6.1
	large scale	16	0	9	0	12	3.37±4.6

В малки ферми честотата на замърсяване с AFM1 варира от 0 през пролетта до 15,3% от млечните проби през лятото.

В големите ферми само 2 от изследваните проби са с по-високи стойности от европейските стандарти през лятото, докато нито една от изследваните проби през зимата, есента и пролетта не показва стойности на AFM1, по-високи от европейските стандарти.

IV.2. ВЛИЯНИЕ НА СЕЗОНА ВЪРХУ НИВОТО НА AFM1 В ПРОБИ ОТ СУРОВО МЛЯКО В БЕКАА

Еволюцията на замърсяването с AFM1 в млечните проби в трите региона на изследването през годината е илюстрирана на Фиг. 11.

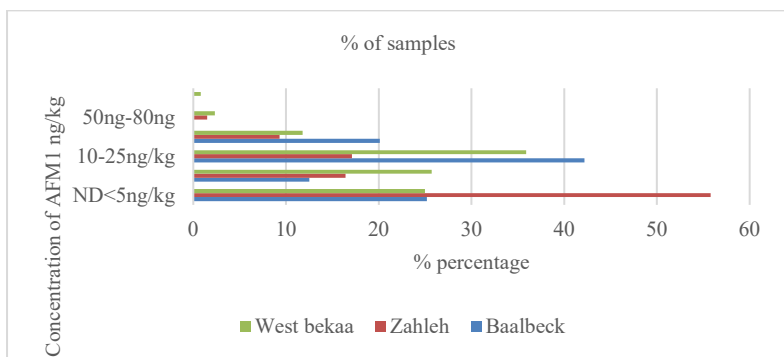


Фиг. 11. Развитие на нивата на AFM1 през годината в трите региона

През всеки сезон бяха анализирани 88 проби с конкурентна ELISA. Наличието на AFM1 в проби от сурово мляко през всеки сезон е показано в Таблица 5. От анализираните 88 проби 80% от пробите са замърсени с AFM1 през зимния сезон (AFM1 над 50 ng/kg), 22% от пробите през есента, 78,7% от пробите през пролетта и 83% от пробите през лятото. От друга страна, 5% са по-ниски от нивата за Европейския съюз и Кодекса (50 ng/kg) през зимата. Броят на положителните проби мляко с AFM1 над европейските стандарти е 2,5% от пробите през пролетта и 3,65% от пробите през лятото.

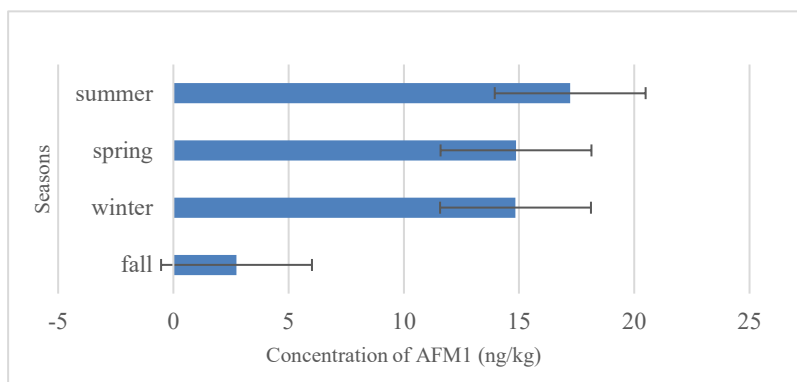
Таблица 5. Процент на замърсените с AFM1 проби през различните сезони (ND: не е открит, ES: европейски стандарт)

	Free samples	AFM1 contaminated samples				
		Below European standards			Above ES	
	ND < 5 ng/kg	5 – 10 ng/kg	10 – 25 ng/kg	25 – 50 ng/kg	50 – 80 ng/kg	80 ng/kg
Winter	18.9	20	45.5	15.6	0	0
Spring	21.3	18	47.2	11.2	2.3	0
Summer	17	18	42.3	19.3	2.6	1.05
Fall	78	18	13.5	0	0	0



Фиг. 12. Процент на замърсените проби в три региона

Според Фиг. 11 е очевидно, че през есенните и зимните месеци нивата на замърсяване на пробите от различните ферми и региони на долината Бекаа са по-ниски, отколкото през летните и пролетните месеци. Обикновено това може да се обясни с продължителното съхранение, необходимо за фуража, следователно замърсяването на млякото с афлатоксин M1 е резултат от храненето на кравите с материал, съдържащ афлатоксин B1; но по време на събирането на пробите от есенния сезон (октомври 2021 г.) температурите в долината Бекаа бяха по-високи от средните годишни стойности $\pm SD$, относителната влажност беше под средните стойности $\pm SD$ и нямаше валежи, страната преминаваше през гореща вълна. Тези фактори биха могли да променят наличието на афлатоксин във фуражите. Концентрацията на този микотоксин във фуражите за животни се влияе от вида, времето и метода на прибиране на реколтата, както и от температурата и относителната влажност на помещенията за съхранение (Tajkarimi, et al., 2007), Концентрация на AFM1 в проби от мляко (Фиг. 12) са значително по-високи през по-студените сезони (Rahimi et al., 2009). Една от причините за това е, че през зимата дойните животни се хранят с комбинирани фуражи, които са склонни към замърсяване с афлатоксин B1 (Фиг. 13).



Фиг. 13. Концентрация на AFM1 (ng/kg) в млякото през различните сезони

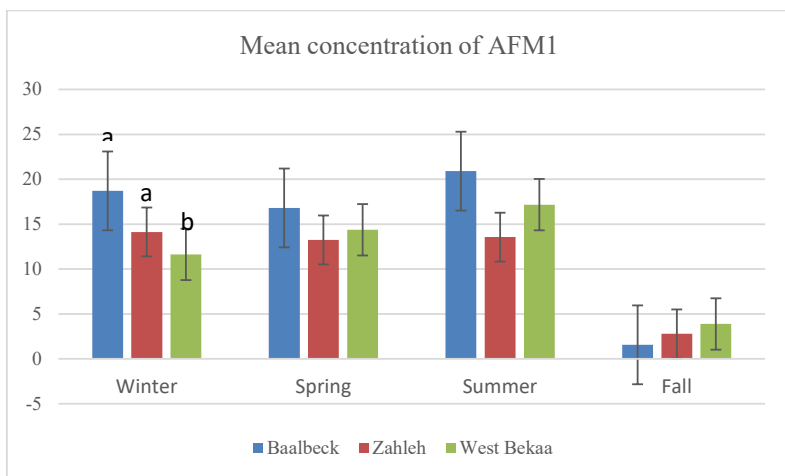
IV.3. ВЛИЯНИЕ НА РЕГИОНИТЕ И СИСТЕМИТЕ ЗА ОТГЛЕЖДАНЕ ВЪРХУ ЗАМЪРСЯВАНЕТО НА МЛЯКОТО С AFM1

Средната концентрация на AFM1 в млечните проби в трите различни региона и четирите сезона на изследването е показана в Таблица 6. Средната концентрация на AFM1 в млякото показва значителна разлика ($p < 0,05$) между различните райони на долината Бекаа, като най-високите стойности са регистрирани в Западна Бекаа, а най-ниските стойности на AFM1 са регистрирани в млечните проби от Баалбек. Трите района на изследването показват по-високо ниво на замърсяване с AFM1 през зимата.

Таблица 6. Средна концентрация на AFM1 (ng/kg) в млякото в трите различни региона и сезона

Region	Winter	Spring	Summer	Fall
Baalbeck	18.7 ± 7.78^a	16.8 ± 7.6	20.9 ± 12.8	1.56 ± 4.5
Zahleh	14.13 ± 12.14^a	13.24 ± 19.16	13.55 ± 10.8	2.78 ± 5.21
West Bekaa	11.63 ± 9.35^b	14.37 ± 10.06	17.17 ± 17.36	3.88 ± 5.23

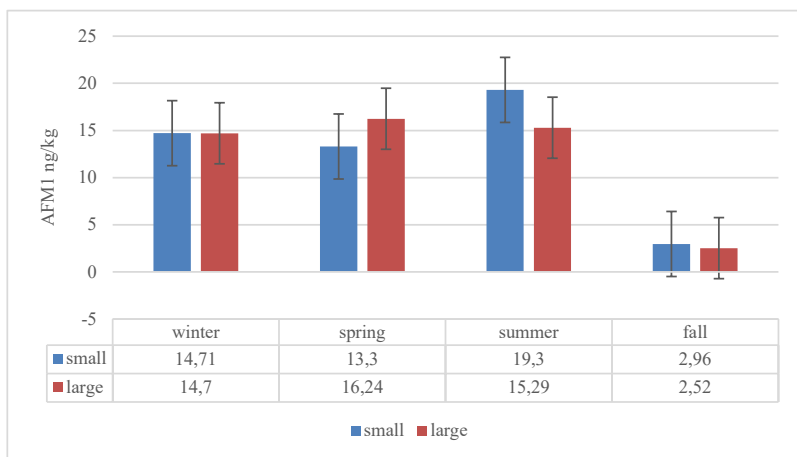
Процентното разпределение на млечните проби в зависимост от нивата на замърсяване с AFM1 е представено в Таблица 7. От всички проби, анализирани във всеки район, само 25,2% са отчетени като свободни в Баалбек, 55,8% в Захлех и 25% в Западна Бекаа. Процентите на млечните проби, които не отговарят на европейските стандарти, са както следва: 0% в Баалбек, 1,5% в Захлех и 3,1% в Западна Бекаа (Фиг. 14).



Фиг. 14. Средна концентрация на AFM1 (ос Y) в различни региони и сезони (ос X)

Таблица 7. Процент на замърсяване с AFM1 в проби от мляко (ND: не се открива, ES: европейски стандарт)

Regions	Free samples	% of Contaminated Samples				
		Below ES (< 50 ng/kg)			Above ES (> 50 ng/kg)	
	ND < 5 ng/kg	5 – 10 ng/kg	10 – 25 ng/kg	25 – 50 ng/kg	50 – 80 ng/kg	> 80 ng/kg
Baalbeck	25.2%	12.5%	42.2%	20.1%	0%	0%
Zahleh	55.8%	16.4%	17.1%	9.3%	1.5%	0%
West bekaa	25%	25.7%	35.9%	11.8%	2.34%	0.8%



Фиг. 15. Разпространение на AFM1 през различните сезони

Според Фиг. 12 и Таблица 7 честотата на замърсяване с AFM1 в млякото в това проучване е по-висока в малките стопанства в сравнение с големите стопанства, като по-високите стойности са регистрирани през лятото в двете технологии.

Като цяло нивото на замърсяване с афлатоксин M1, регистрирано в проучването, е следното (Таблица 8): 1,73% от анализираните проби в малките ферми показват ниво на AFM1 по-високо от европейските стандарти. 1,63% от анализираните млечни проби в големите ферми показват ниво на замърсяване по-високо от европейските норми от 50 ng/kg. Средното ниво на AFM1 в анализираните проби показва най-ниско ниво през есента ($2,96 \pm 5,4$ ng/kg и $2,52 \pm 4,68$ ng/kg) в двете технологии – съответно в малките и големите ферми, и най-високи стойности през лятото ($19,3 \pm 15$ ng/kg срещу $15,29 \pm 12,9$ ng/kg) съответно за двете технологии.

Таблица 8. Ниво на AFB1 през различните сезони и мащаби на стопанството (n: брой; ES: европейски стандарт)

		Samples Size (n)	Samples (n) > 50 ng/kg (ES)	% of Samples > 50 ng/kg (ES)	Mean±SD (ng/kg)
Winter	Small scale	43	0	0	14.71 ± 8.9
	large scale	45	0	0	14.7 ± 8.9
Spring	Small scale	43	1	2.33	13.3 ± 10.8
	large scale	45	1	2.14	16.24 ± 15.08
Summer	Small scale	43	2	4.6	19.3 ± 15
	large scale	45	2	4.37	15.29 ± 12.9
Fall	Small scale	43	0	0	2.96 ± 5.4
	large scale	45	0	0	2.52 ± 4.68
Overall	Small scale	172	3	1.73	12.25 ± 10.2
	large scale	180	3	1.63	12.05 ± 12.4

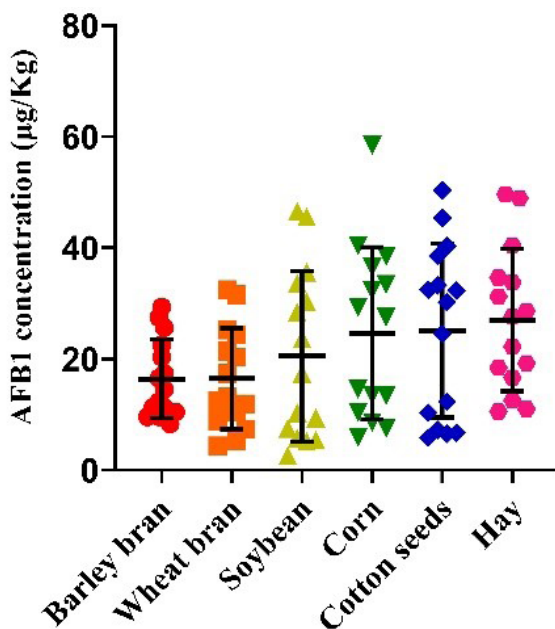
IV.4. РЕЗУЛТАТИ, СВЪРЗАНИ С ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА AFB1

След извършване на проверката на стадата резултатите се основаваха на различни параметри и критерии, включително хранене и източници на фураж, условия на съхранение. Освен това беше отчетено наличието на фактори, които влошават физическото състояние на фуража (като лоша вентилация и влажност), наличието на насекоми или гризачи, които биха могли да достигнат до мястото за съхранение на фуража, наличието на химически фактори, които подпомагат развитието на гъбички в съхранявания фураж. Ако има прилагане на мерки за контрол на вредители и гризачи, хигиена на фермата и фуражния цех и наличие на плесени (например върху царевичен силаж). Установените нива на AFB1 в пробите (събрани от 15 ферми) са променливи и са открити във всички проби. Резултатите от едноизборния t-тест, минималните, максималните и средните стойности на AFB1 са показани в Таблица 9.

Таблица 9. Средни нива на AFB1 ($\mu\text{g/kg}$) във фуражите ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

Feedstuffs	N	Number of sample above limit of 20 $\mu\text{g/kg}$	% above limit of 20 $\mu\text{g/kg}$	$\bar{X}$	SD	Min	Max	p-value
Barley bran	15	5	33.33	16.4	7.05	8.30	29.3	0.069
Wheat bran	15	6	40	16.4	9.10	4.32	32.5	0.150
Soybean	15	7	46.67	20.5	15.3	2.56	46.5	0.908
Corn	15	8	53.33	24.7	15.5	5.90	58.5	0.262
Cotton seed	15	9	60	25.1	15.6	5.81	50.3	0.229
Hay	15	9	60	27.0	12.8	10.5	49.6	0.052

N – Number of samples; ($\bar{X}$) – Mean ($\mu\text{g/kg}$); SD – Standard Deviation; Min – Minimal levels ($\mu\text{g/kg}$); Max – Maximal levels ($\mu\text{g/kg}$).



Фиг. 16. Разпределение на нивата на AFB1 по фуражи. Графиката показва средната стойност и SD на концентрациите на AFB1 (представени като точки), събрани от 15 ферми.

От 90 проби, 44 проби (48,88%) показаха замърсяване, надвишаващо допустимите граници, приети от САЩ и Ливан (20 $\mu\text{g/kg}$). Шестте вида фуражи, цитирани по-горе: ечемични трици, пшенични трици, соя, царевича, памучно семе и сено показаха съответно от 33,33 до 60% степен на замърсяване (таблица 9). Максималното ниво на AFB1 в тези проби може да бъде представено в този ред: царевича > памучно семе > сено > соя > пшенични трици > ечемични трици. Най-високото (максимално) ниво е открито в проба от царевича, а най-ниското (минимално) ниво е открито в проба от соя (Таблица 9, Фиг. 16). Най-ниската средна стойност на AFB1 е открита в ечемични и пшенични трици, докато в сеното афлатоксинът AFB1 показва най-високи средни стойности (Таблица 9). Средните концентрации на AFB1 в ечемичните и пшеничните трици са по-високи от допустимите норми на Европейския съюз (5 $\mu\text{g/kg}$), но по-ниски от допустимите норми в САЩ и Ливан (20 $\mu\text{g/kg}$). Интересно е, че средните нива на AFB1 в пробите от соя, царевича, памучни семена и сено са по-високи от допустимата норма в САЩ и Ливан (20 $\mu\text{g/kg}$), но не показват статистическа значимост при сравнение с тази норма (Таблица 9). Средната стойност на нивата на AFB1 в сеното е близо до това да бъде значително по-висока от допустимата стойност в САЩ и Ливан. Забележително е, че средните концентрации на AFB1 показват възходяща тенденция при сравняване на пробите от соя, царевича, памучни семена и сено (Фиг. 16), но не е открита достоверна разлика между средните стойности.

ДИСКУСИЯ

След като бе установено въздействието на афлатоксините върху здравето на хората и животните, много страни определиха максимални граници на тези микотоксини, които се съдържат в храните и фуражите. Тъй като наличието на нива под тази граница не означава, че те са безопасни, държавите се стремят да намалят ограниченията. Афлатоксините са както остро, така и хронично токсични за животните и хората и могат да причинят опасни заболявания, включително остър токсичен хепатит, чернодробна цироза и хепатокарцином (Park, 2002; Alborzi et al., 2006). Замърсяването с AFM1 на млечни продукти е глобален проблем, който застрашава общественото здраве

във всички райони на света. Въпреки високата консумация на млечни продукти в Ливан, съществуват малко достоверни данни за нивата на замърсяване с AFM1.

В нашето проучване от всички проби, анализирани във всеки от районите на Бекаа, само 25,2% бяха обявени за свободни в Баалбек, 55,8% – в Захлех и 25% – в Западна Бекаа. Въпреки това процентите на млечните проби, които не отговарят на европейските стандарти, са както следва: 0% в Баалбек, 1,5% в Захлех и 3,14% в Западна Бекаа. Средната годишна стойност $\pm$ SD на замърсяването с AFM1 в млечните проби варира между 14,31 ng/kg в Баалбек, 11,5 ng/kg в Западна Бекаа и 10,5 ng/kg в Захлех. Тези резултати са малко по-високи от тези, докладвани от Hassan and Kassaiy (2014), които съобщават за средно съдържание на AFM1 от $10,74 \pm 2,01$ ng/L в сурово краве мляко, събрано от различни места на ливанските пазари. В друго проучване в ливанско сурово краве мляко Elkhoury et al. (2011) съобщават за ниво на замърсяване от 40,62% (26/64 над 5 ng/L) с диапазон на нивото на AFM1 между 0,005 μ g/L и 0,05 μ g/L.

В предварителното проучване, проведено от Elkak et al. (2011) за определяне на появата на AFM1 в 77 проби от краве и козе мляко (38 проби от сурово мляко, 25 проби от пастьоризирано мляко и 14 проби от мляко на прах), получени от местни малки ферми или от пазари. За тази цел е приложен конкурентният ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), при който AFM1 е открит в 64,9% от всички изследвани млечни проби. Разкритите нива на замърсяване с AFM1 са съответно 73,6%, 68,0% и 35,7% за пробите от сурово, пастьоризирано и сухо мляко. Индивидуалните стойности в рамките на всяка категория млечни проби варират от 2,63 до 126 ng/l (средно $\pm$ SD = 60 ng/l), 3,27 – 84,4 ng/l (средно $\pm$ SD = 30,6 ng/l) и 9,18 – 16,5 ng/l (средно $\pm$ SD = 13,7 ng/l) съответно за пробите от сурово, пастьоризирано и сухо мляко. От положителните проби 29 са все още под допустимата граница (50 ng/l), определена от Европейската комисия, докато 21 превишават допустимата граница. В друго неотдавнашно проучване, проведено от Daou et al. (2020), резултатите показват замърсяване в сурово мляко, пастьоризирано и УВТ мляко и млечни продукти в диапазона съответно 0,011 – 0,440 μ g/l, 0,013 – 0,219 μ g/l и 0,015 – 7,350 μ g/l; като съответно 28%, 54,5% и 30 45,5% от пробите с AFM1 са над максимално допустимата граница (МДГ), определена от Евро-

пейската комисия. Подобни изследвания, проведени в съседни държави, също показват високо ниво на замърсяване.

В Сирия честотата на замърсяване с афлатоксин М1 (AFM1) в проби от мляко, събрани от сирийския пазар, е изследвана от Ghanem and Orfi (2009) чрез използване на техниката на конкурентния ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). Общо 126 проби, съставени от сурово краве мляко (74 проби), сурово овче мляко (23), сурово козе мляко (11), пастьоризирано краве мляко (10) и мляко на прах (8), показват, че 80% от изследваните проби са замърсени с различни нива на AFM1, вариращи от 20 до 765 ng/l. Процентите на замърсените с AFM1 проби, които превишават американските (500 ng/kg) и европейските граници на допустимост (50 ng/kg), са съответно 22% и 52%.

В Палестина AL-Zuheir and Abo Omar (2012) провеждат проучване, за да установят наличието на афлатоксин М1 в сурово мляко в Палестина, събрано във ферми от Тулкарм, Наблус и Дженин. Афлатоксин М1 е определен чрез директна конкурентна ELISA техника. 85% (34 от 40) от общо изследваните проби сурово мляко бяха положителни. Нивата на замърсяване с афлатоксин М1 са между 3 и 80 ppt, като средната стойност е 29,57 ppt. Наблюдава се висока честота на заразяване с 92% (11 от 12) и най-високи стойности на замърсяване с афлатоксин М1 в изследваните проби в град Тулкарм ($P \leq 0,05$). В 20% от анализираните проби (8 от 40) е превишена максимално допустимата граница (50 ppt) в Европейския кодекс.

В Йордания Sharaf (2012) предприема проучване за определяне на наличието на афлатоксин М1 (AFM1) в животинското мляко. През 2010 – 2011 г. са събрани общо 100 проби от прясно животинско мляко (краве, кози, камили и овце) и ферментирало мляко (мътеница). За анализ на проби от мляко е използван ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). AFM1 беше открит във всички проби от животинско мляко със средна концентрация $\pm SD$ от 56,17 ng/kg (диапазон 7,05 – 129,79 ng/kg) в проби от прясно мляко и 1079,57 ng/kg (диапазон 47,97 – 2027,11 ng/kg) във ферментирало мляко. Концентрациите на AFM1 в 70 проби от прясно и ферментирало мляко са повисоки от максималната допустима граница, приета от Европейския съюз и САЩ (50 ng/kg).

Въпреки това по-ниско ниво на замърсяване на млякото с AFM1

е докладвано в Йордания през 1991 г. от Natour et al. (1991). Тествани са общо 133 течни проби от мляко и 137 проби от съответните фуражи, събрани от 5 местни млечни ферми в Йордания. Освен това са изследвани 41 проби от вносно сухо мляко, получено от 3 млекопрееработвателни предприятия. Събраните проби са анализирани за нивото на афлатоксин М1 в млякото и афлатоксин В1 във фуражите. Резултатите от анализа показват наличието на афлатоксин М1 в 5 течни проби от мляко с честота на разпространение от 3,8% и с нива на токсини, вариращи от следи до 18,7 ppb. Афлатоксин В1 е открит в 3 фуражни проби с честота на разпространение 2,2%. Нивата на токсини бяха 66,0 и 85,2 ppb в две проби от млечни дажби и 17 ppm в пробата от царевица. От друга страна, пробите от мляко на прах не съдържат никакви откриваеми нива на афлатоксин М1.

В Кувейт 54 проби от млечни продукти са анализирани за афлатоксин М1, 28% са заразени с AFM1 (Dashti et al., 2009).

В Турция Celik et al. (2005) в проучване установяват 75 проби (88,23%) като замърсени с AFM1, а 48 проби (64%) превишиха законното ниво на AFM1 в млякото съгласно Турския хранителен кодекс и ограничението на Codex Alimentarius (50 ng/kg). Rastogi et al. (2004) съобщават, че 75% от течните проби от мляко надвишават разпоредбите на Европейския съюз и Codex.

Появата на следи от афлатоксин е критична тема поради жизненоважната ежедневна консумация на мляко в земеделските райони в долината Бекаа, особено от кърмачета и деца. Тъй като афлатоксин М1 е метаболит на афлатоксин В1, екскретиран в млякото, откриването на високи концентрации на афлатоксин М1 в проби от сурово мляко предполага наличието на много високи нива на афлатоксин В1 във фуража, особено в сеното. Много фактори могат да повлияят на нивото на афлатоксин В1 в храните за животни. Географските и климатичните промени могат да повлияят на практиките за управление на фермите и качеството на фуража. Тези ефекти могат да доведат до широки вариации в нивата на афлатоксин М1 в млякото (Zaki et al., 2012).

Това проучване показва също значителна разлика в нивото на замърсяване на млякото с AFM1 между различните райони на долината Бекаа, като най-високото замърсяване с AFM1 е регистрирано в Западна Бекаа, докато най-ниското е регистрирано в Баалбек. Тази

разлика може да се дължи на разликата в климатичните условия или на разликата в хранителните практики.

Високото ниво на замърсяване на млякото с AFM1 в Западна Бекаа може да се дължи на влажните зимни сезони, млекопроизводителите в долината Бекаа събират сено през лятото, съхраняват го до следващия сезон и хранят добитъка през годината. Това засилва растежа и производството на афлатоксин В1 от гъбичките, присъстващи в купи сено, стимулирани от висока влажност, висока температура и неподходящи условия на съхранение. Тъй като нивата на афлатоксин В1 във фуража се повишават, той ще се метаболизира в черния дроб и ще доведе до повишени нива на афлатоксин М1, екскретиран в млякото. Ето защо е важно да се намали появата на токсини афлатоксин В1 във фуража и да се вземат профилактични мерки за предотвратяване на фактори, повишаващи образуването на токсини. Управленските практики при прибиране на реколтата и съхранение могат да намалят появата на афлатоксин В1 във фуража.

Martins and Martins (2004) съобщават, че около 1 – 2% от AFB1 в храната за животни се трансформира в AFM1 в млякото с вариации от животното на животното, от ден на ден и от едно доене до следващо. Когато приемът на AFB1 бъде спрял, концентрацията на AFM1 в млякото намалява до неоткриваемо ниво след 72 часа. Освен това Galvano et al. (2005) съобщават, че 0,3 – 6% от погълнатия AFB1 е наличен като AFM1 в млякото. Много проучвания в света съобщават за появата на AFM1 в млечните продукти и доказателства за потенциален риск при хора, тъй като млякото е ключов източник на хранителни вещества за хората (Galvano et al., 1996; Heshmati and Milani, 2010).

По-ниското ниво на замърсяване с афлатоксин М1 в Захлех може да се дължи на по-добрите климатични условия в сравнение с Западна Бекаа и Баалбек и по-доброто познаване на техниките за съхранение, по-напреднали ферми и фуражни заводи, задължително добавяне на свързващи микотоксини вещества. Тези климатични условия не са оптимални за растежа на гъбичките. Ниското ниво на AFM1 в тази област може да се дължи на ниското производство на мляко от местни породи, отглеждани в този регион. Masoero et al. (2007) предполагат, че добивът на мляко е един от факторите, влияещи върху общата екскреция на AFM1. Високопродуктивните млечни крави с производство до 40 литра мляко на ден показват процент на пренася-

не до 6,2%. Ниското ниво на AFM1 в Захлех може да бъде свързано с възможността кравите да имат достъп до зелени фуражи и паша навън през летния и пролетния сезон.

Всъщност най-честите фуражи на дажбите на дойните крави, както ни информираха фермерите, са царевичен силаж, пшенична и ечемична слама, а концентратите включват предимно царевича, ечемик, пшенични трици, соево брашно, брашно от памучно семе и целодажбени смески (TMR) за много големи ферми.

Тъй като AFM1 се появява в млякото, последвано от поглъщане на замърсен с AFB1 фураж, качеството на фуража е съществен фактор за производството на замърсено мляко. Следователно, големите колебания в концентрациите на AFM1 в това могат да бъдат свързани с качеството на храната за млечни говеда. От друга страна, качеството на фуража се влияе от много фактори като географски и климатични условия, видове системи за хранене и практики за управление на фермата (Lopez et al., 2003). Всички промени в тези фактори могат да доведат до изразени колебания в нивата на AFM1 в млякото.

Замърсяването на млякото с AFM1 показва сезонни колебания с най-високо ниво на замърсяване през лятото (83% от пробите с 3,65% над европейските стандарти) и най-ниско ниво през есента (22% от пробите с 0% над европейските стандарти). Този резултат може да бъде свързан с продължително хубаво време и температури, по-високи от средногодишните $\pm$ SDs през месец октомври 2021 г., и с влошеното качество на складираните зърна за около една година в Украйна, които достигнаха Ливан през лятото на 2022 г., както и ограничените финансови възможности на фермерите да включват висококачествени продукти към фуражите като свързващи микотоксини, премикси и да поддържат складовите площи непокътнати.

По-рано е докладвано за подчертано сезонно изменение на нивата на AFM1 в млякото (Kamkar, 2005; Rahimi и Ameri, 2012; Ruangwises и Ruangwises, 2010). Докладвано е, че нивата на AF във фуражите са по-високи в дъждовни, отколкото в сухи сезони. Освен това използването на големи количества замърсени концентрати е по-често през студените месеци (Kamkar et al., 2011). Резултатите от настоящото изследване показват, че средните концентрации в проби от сурово мляко, събрани през есента, са по-високи, отколкото през други сезони. Такава промяна може да е резултат от натрупване на

токсини, когато съхранението се извършва в горещи и влажни условия. Много автори (Blanco et al., 1988; Lopez et al., 2003; Kamkar, 2005) съобщават за по-голям брой дрожди, плесени и следователно за по-висока концентрация на микотоксини в силажирани фуражи, използвани предимно през есента или зимата. Tajkarimi et al. (2008) съобщават също за по-високо ниво на AFM1 през студените сезони в сравнение с горещите сезони. Причината е, че през зимата дойните животни обикновено се хранят с комбинирани фуражи и по този начин се повишава концентрацията на AFB1, което от своя страна повишава концентрацията на AFM1 в млякото. В допълнение, влажността влияе върху присъствието на AFB1 във фуражите. *A. flavus* и *A. parasiticus* могат лесно да растат във фуражи с влажност между 13 и 18%, а след това те са в състояние да произвеждат афлатоксин при влажност на околната среда между 50 и 60% (Jay, 1992). Поради тази причина нивото на AFB1 във фуража през дъждовните месеци е по-високо, отколкото през сухите месеци, което е в съгласие с резултатите от нашето проучване през септември-ноември в сравнение с другите месеци. Това може да се дължи на горещото лято в Бекаа и дъждовете през септември, които увеличават производството на афлатоксини до края на лятото. Афлатоксините са силно токсични съединения, затова е важно да се сведе до минимум рискът за здравето от замърсяване с AFM1 в млякото, което може да се консумира от кърмачета и деца като най-рискови групи. Следователно млекопроизводителите трябва да бъдат обучени относно потенциалния риск за здравето от афлатоксините. Нивата на AFM1 трябва да се наблюдават като част от процедурите за контрол на качеството в млекопреработвателните предприятия. Поради тази причина млякото и другите млечни продукти трябва да се проверяват непрекъснато чрез точни и прецизни аналитични методи за наличие на замърсяване и количествено определяне на AFM1. Освен това, нивото на AFB1 във фуража може да бъде намалено чрез наблюдение на фазите на култивиране и практиките за съхранение за предотвратяване на растежа на плесени и производството на афлатоксини. Като цяло фуражите за млечни говеда трябва да се пазят от замърсяване колкото е възможно повече. Въпреки това, ако ограничаването на контаминирането на храната за животни не е практично, употребата на силно замърсена храна трябва да се пренасочи към нелактиращи животни.

От друга страна и по отношение на нашите резултати за откриване на AFB1, замърсяването с афлатоксин в няколко вида храни и фуражи е неизбежно. В резултат на това се провеждат много изследвания за идентифициране на този токсин в храните и фуражите (Hell and Mutegi, 2011; Farombi, 2006). В настоящото изследване максималната концентрация на AFB1 в проби от царевича е по-висока от резултатите, докладвани от Scudamore et al. (1997) в Обединеното кралство (41 $\mu\text{g/kg}$), и Oruç et al. (2006) в Турция (32,30 $\mu\text{g/kg}$ като общ афлатоксин), но по-нисък от Shetty and Bhat (1997) в Индия (109 $\mu\text{g/kg}$), и Dawlatana et al. (2002) в Бангладеш (245 $\mu\text{g/kg}$). Според Kaaya and Kyamuhangire (2006), проби от царевича, съхранявани повече от шест месеца, са наблюдавани с откриваеми нива на афлатоксин AFB1 над 20 $\mu\text{g/kg}$. В това проучване царевичата с най-високо ниво (58 $\mu\text{g/kg}$) е наблюдавана в проба от царевича в повече от половината ферми, включени в проучването (53,33% положителни проби). Това се дължи на дългото и лошо съхранение на царевичата в по-голямата част от фермата. Средното ниво на AFB1 със стандартно отклонение (SD) за царевича ($24,7 \pm 15,5 \mu\text{g/kg}$) е по-високо от законовата граница на САЩ и Ливан (20 $\mu\text{g/kg}$) и по-високо от Европейския съюз (5 $\mu\text{g/kg}$), но не показва статистически данни значимост в сравнение с тази граница. Според Kabak et al. (2006), влагата, лошите условия на съхранение и лошото управление са допринесли за повишените нива на афлатоксин, наблюдавани в конкурентни фуражи за крави, фуражни добавки и царевича. В друго проучване, проведено в Ирак, AFB1 е открит в 12 от 24 проби от царевича с нива, вариращи от 2,30 до 30 ppb, откриваеми чрез тънкослойна хроматография (TLC) и 270 до 500 ppb с помощта на ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) (Hassan et al., 2014). Добре известно е, че различни условия, включително температура, влажност, увреждане от насекоми, боравене по време на прибиране на реколтата и съхранение, влияят върху установяването на *Aspergillus* spp. и последващото образуване на афлатоксини в царевичата (Hell et al., 2003). Що се отнася до семената на памука, в това изследване 60% от пробата е замърсена и надвишава границата (20 $\mu\text{g/kg}$). Средната стойност и SD на концентрацията на AFB1 беше $25,1 \pm 15,6 \mu\text{g/kg}$ и е по-висока от допустимата граница на САЩ (20 $\mu\text{g/kg}$) и Европейския съюз (5 $\mu\text{g/kg}$), но не беше открита значителна разлика. В сравнение с друго проучване от Иран, семе-

ната на памук са имали най-високи нива на замърсяване, дори по-високи от максимално допустимите нива. Всички проби от семена от памук (100%) са замърсени с AFB1, който е открит чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) (Sadegh et al., 2013). Според Azizi et al. (2012), семената на памука показват по-високо ниво на контаминиране на AFB1 в сравнение с концентрирания фураж и цвекловата каша. В проучване на Hashemi (2016), семената на памук имат ниво на AFB1 ($2,13 \pm 0,31 \mu\text{g/kg}$) по-ниско от настоящото изследване ($25,1 \pm 4,03 \mu\text{g/kg}$). В настоящото изследване пробите от пшенични трици показват 40% замърсяване и достигат максимално ниво на AFB1 $32,5 \mu\text{g/kg}$. Средната $\pm$ SD на концентрацията на AFB1 е $16,4 \pm 9,10 \mu\text{g/kg}$, но не е открита статистически значима разлика в установените стойности. За сравнение и според някои автори (Aydin et al., 2008; Joubrane et al., 2011; Almeida-Ferreira et al., 2013) имат високи нива на замърсяване на пшеницата и нейните производни с AFB1. В индийско изследване са изследвани нивата на афлатоксин B1 (AFB1) в 1646 проби пшенични зърна. 40,3% от пробите имат нива на AFB1 под $5 \mu\text{g/kg}$, докато 16% имат концентрации над $30 \mu\text{g/kg}$, позволен регулаторен лимит за Индия (Toteja et al., 2006). Въпреки че в пшеницата имаше високо разпространение на AFB1 (44,8%), пробите от пшеница имаха най-ниските максимални граници от $6,0 \mu\text{g/kg}$ (Elbashir and Ali, 2014). В проучване на Hashemi, (2016), пшеничните трици имат ниво на афлатоксин AFB1 ($2,94 \pm 1,38 \mu\text{g/kg}$) по-ниско от нашето проучване ($16,4 \pm 2,35 \mu\text{g/kg}$). В това проучване средните нива на AFB1 в соята са $20,5 \pm 15,3 \mu\text{g/kg}$ и са по-високи от законовата граница на САЩ и Ливан ($20 \mu\text{g/kg}$) и по-висока от границата на ЕС ($5 \mu\text{g/kg}$), но не показва никаква статистическа значимост. Според Abdullah Murshed et al. (2019) 72% от пробите от соя са замърсени с афлатоксини, като 27,6% от тях надвишават европейския стандарт, а само в 6,2% от взетите проби от соя стойностите на общите афлатоксини са над максималната граница от стандартите на FDA в Йемен ($20 \mu\text{g/kg}$). В настоящото изследване най-високото ниво на AFB1 е открито в пробите от соя ($46,5 \mu\text{g/kg}$), което е по-високо от това в Обединеното кралство ($4 \mu\text{g/kg}$), докладвано от Scudamore et al. (1997) и малко по-високо от това в Турция ($46,3 \mu\text{g/kg}$), докладван от Oruç et al. (2007), и по-високо от нивото от Иран ($11,46 \mu\text{g/kg}$), докладвано от Hashemi (2016). Що се отнася до ечемичните трици, 33,33% от замърсените проби от

AFB1 надвишават допустимата граница на САЩ и Ливан (20 µg/kg). Тези резултати са по-високи в сравнение с резултата на Sadegh et al. (2013), който установи 0% замърсяване в проби от ечемик и по-високо от резултата, докладван от Hashemi (2016), където пробите от ечемик показват замърсяване с AFB1 по-малко от разпоредбите на Иран и ограниченията на Европейския съюз (5 µg/kg) ($1,31 \pm 0,33$ µg/kg). Що се отнася до откриването на афлатоксин В1 в сеното, в нашето проучване всички проби бяха открити замърсени и 60% от тях бяха със средна стойност 27,0 µg/kg и надвишаваха допустимата граница на САЩ и Ливан от 20 µg/kg. Нашите резултати са по-високи от тези, докладвани от Ceníti et al. (2021), които те откриха във всички проби от сено с нива на замърсяване с AFB1, вариращи от 2 до 7,7 µg/kg, които са в рамките на ограниченията, определени от Европейския съюз (20 µg/kg). В проучване, направено от Karademir et al. (2003), прясното сено показва средни стойности, по-ниски от разрешените граници за Турция (50 µg/kg). Средните стойности на Old Hays бяха под границата за Турция (50 µg/kg), но бяха над максималните граници (20 µg/kg). В Северна Италия Decastelli et al. (2007) съобщават, че 8,1% от изследваните фуражни проби са положителни за AFB1. В Иран концентрацията на AFB1 в Hay е по-висока от границата на Европейския съюз с 10% (Bahrami et al., 2016). Обратно, някои изследвания показват значително количество замърсени проби, които рядко достигат определената законова граница. 42% от пробите от Китай включват нива на AFB1 между 0,05 и 3,53 µg/kg, които са под законовата граница в китайските и европейските стандарти (10 µg/kg) (Han et al., 2013). В 10-годишно разследване в Португалия Martins et al. (2007) откриват 37,4% положителни проби със замърсяване, вариращи от 1 до 74 µg/kg, и само 6,2% от тези проби надхвърлят законовата граница на португалския език (5 µg/kg). Замърсяването на проби от сено с микотоксин в нашето изследване, особено с AFB1, е резултат от лоши условия на съхранение на сеното във фермите, например високия процент на влага, който не е изследван.

Всички проби в нашето изследване, събрани през този период (между края на юни и началото на юли), бяха замърсени с AFB1.

Повечето от фермите, от които бяха събрани пробите, бяха малки ферми от трите региона (R1, R2, R3). Събирането на пробите е от фермата, а не от оригиналния източник. В съответствие с наблю-

денията, които сме направили относно управлението на фуражите в различните ферми, особено съхранението, всички те са в съгласие с резултатите, получени от това проучване, след тестване на фураж, който показва замърсяване с AFB1 през този период. Според Richards et al. (2009) управлението на съхранението на фуража и условията на съхранение улесняват развитието на плесени и в резултат на това те са причина за производството на афлатоксини.

ИЗВОДИ

1. Резултатите от това проучване показват високо ниво на замърсяване с афлатоксин М1 в кравето мляко в различни райони на долината Бекаа. Всъщност от всички проби, анализирани във всеки район, само 25,2% са отчетени като свободни в Баалбек, 55,8% в Захлех и 25% в Западна Бекаа.

2. Процентът на пробите мляко, които не отговарят на европейските стандарти, е както следва: 0% в Баалбек, 1,5% в Захлех и 3,1% в Западна Бекаа.

3. Нивото на афлатоксин М1 е различно в зависимост от регионите, практиките на управление и сезона на годината.

4. Най-високото ниво на афлатоксин М1 в суровото краве мляко е регистрирано в Западна Бекаа, а най-ниското – в Баалбек.

5. По-високо ниво на афлатоксин М1 е регистрирано и в дребните животновъдни ферми (по-малко от 20 крави) в сравнение с големите ферми.

6. По-високо ниво на замърсяване с афлатоксин М1 в кравето мляко е регистрирано през зимата, пролетта и лятото в сравнение с есента. В Баалбек минималните стойности са установени през есента, а най-високите – през зимата в двете системи и всички проби са по-ниски от стандартите на ЕС.

7. В Захлех 11,1% от пробите през пролетта са били над стандартите на ЕС в малките ферми, 5% в големите ферми и няма проби над стандартите на ЕС през есента, зимата и лятото. Нивата на афлатоксин са изненадващо ниски през есенния сезон и високи през лятото.

8. В Западна Бекаа е регистрирано нулево замърсяване през пролетта и 15,3% през лятото в дребномащабните стопанства. В големите ферми 2 проби са били над стандартите на ЕС през лятото, а през останалите сезони – 0 проби над тях.

9. Средната концентрация на AFM1 в млякото показва значителна разлика ($p < 0,05$) между различните райони на долината Бекаа, като най-високите стойности са регистрирани в Западна Бекаа (> 80), а най-ниските стойности на AFM1 са регистрирани в млечните проби от Баалбек.

10. Трите района на изследването показват по-високо ниво на замърсяване с AFM1 през зимата, пролетта и лятото. Честотата на замърсяване с AFM1 в млякото е по-висока през есента и лятото в малките ферми (съответно 2,96 и 19,3), по-ниска през пролетта (13,3) и еднаква през зимата (14,7).

11. По отношение на концентрациите на AFB1, свързани с различните фуражи: концентрациите са малко по-високи от допустимата граница за консумация от едрия рогат добитък и корелират с появата на замърсяване с AFM1 в суровото мляко, което е изследвано през този период.

12. От 90 проби от фуражи (памучно семе, пшенични трици, ечемични трици, соя, сено и царевица), събрани предимно от малки ферми: в 44 проби е установено замърсяване с AFB1, надвишаващо допустимите стойности за САЩ и Ливан (48,8% от пробите).

13. Концентрациите на AFB1 в изследваните фуражи са по-високи от допустимите стойности за САЩ, Ливан и ЕС, но няма статистическа значимост при сравнение с тези допустими стойности ($p > 0,05$).

14. Най-високото ниво е установено при царевицата (58 $\mu\text{g/kg}$), в повече от половината ферми, което се свързва с лошото и продължително съхранение.

15. При средни стойности от 27 $\mu\text{g/kg}$ и r -стойност от 0,052, нивата на AFB1 в сеното са много близки до горните граници за Ливан и САЩ и са близки до значимите.

16. Констатациите от нашето проучване, особено по отношение на замърсяването на фуражите с AFB1, съвпадат с наблюденията ни върху практиките за управление на фуражите в различните ферми, особено по отношение на условията на съхранение.

ПРИНОСИ

1. Проучването е първото, което установява зависимост между контаминирането на сурово краве мляко с афлатоксин M1 (AFM1) и технологията на отглеждане, хранене и сезони в долината Бекаа, Ливан.

2. Установени са регионални вариации в различните райони на долината Бекаа. Най-високи нива на AFM1 в сурово краве мляко са открити в Западна Бекаа, докато в Баалбек са установени най-ниски нива на замърсяване, което показва географски различия в замърсяването.

3. Проучването показва както сезонни вариации, така и зависимост от технологиите на отглеждане, които оказват влияние върху нивата на AFM1. Установено е по-високо замърсяване на млякото през зимата, пролетта и лятото, в сравнение с есента.

4. В малките ферми (до 20 крави) се установяват по-високи нива на AFM1 в млечните проби, в сравнение с големите ферми.

5. Проучването установява, че афлатоксин B1 (AFB1) контаминира фуражите за едър рогат добитък, особено царевицата и сеното, в нива, надвишаващи нормите за САЩ, Ливан и ЕС. Замърсяването на фуража корелира с по-високи нива на AFM1 в млякото, което води до пряка връзка между качеството на фуража и безопасността на млякото.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Въвеждане на стриктно тестване и контрол на фуражите:

- Редовното изследване за наличие на AFB1 във фуражите трябва да бъде задължително, с акцент върху местно произведените зърно и сено.

- Следва да се насърчават подобрени практики като подходящо напояване, контрол на вредителите, навременно прибиране на реколтата и безопасни условия на съхранение, за да се минимизира контаминирането с плесени.

2. Засилване на обучението и подкрепата за малките млекопроизводители:

- Малките млекопроизводителни ферми следва да получат техническа помощ и обучение за предотвратяване на замърсяването, като се обърне специално внимание на правилното управление на фуражите, съхранението и хигиената.

- Тази подкрепа следва да включва рутинни инспекции и събиране на проби от мляко и фуражи, за да се наблюдава и намалява ефективно рискът от контаминиране, особено в отдалечените региони.

- фермерите в малките млечни ферми трябва да бъдат информирани относно значението и използването на свързващи микотоксините вещества за целодажбените смеси (TMR), за да се намали и елиминира развитието на микотоксини.

3. Прилагане на практики за безопасно съхранение:

- Осигуряване на безопасни помещения за съхранение на фуражите, с инсталиране на сензори за влажност и температура, за поддържане оптимални условия.

- Местата за съхранение трябва да отговарят на добрите практики, като редовно почистване и контрол на гризачите, за да се предотврати развитието на плесени и производството на токсини.

- Непрекъснатото наблюдение и инспектиране на тези съоръжения за съхранение от страна на властите ще спомогне за поддържане на съответствието.

4. Засилване контрола върху качеството на млякото в събирателните центрове и кооперативите:

- Оборудване на събирателните центрове и кооперативите с необходимата лабораторна апаратура и консумативи за редовно изследване на качеството на млякото за замърсяване с AFM1.

- Това ще осигури незабавен контрол, преди млякото да влезе във веригата за доставки, като по този начин ще се гарантира качеството на продукта.

5. Провеждане на непрекъснат мониторинг и анализ:

- Мониторинг на замърсяването с AFM1 в млякото и млечните продукти чрез използване на точни и последователни аналитични методи, които ще осигурят надеждни данни за нивата на замърсяване и ще помогнат за оценка на излагането на потребителите на AFM1 в различните региони на долината Бекаа.

6. Прилагане на всеобхватни политики и разпоредби:

- Властите следва да прилагат строги разпоредби и политики, насочени към намаляване на замърсяването с AFM1, включително задължителни тестове, определени стандарти за безопасност на млякото и млечните продукти.

Прилагането на тези практики би могло да доведе до намаляване на AFB1 и след това на рисковете от замърсяване с AFM1, повишаване на безопасността на фуражите за животни, млякото и млечни продукти в Ливан, особено за деца и хора от рискови категории.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ

Доклади от конференции и конгреси

Участие с доклад в Международна научна конференция „Традиции и съвременност във ветеринарната медицина“ 2022 г. – Юндола, България.:

1. Haidar, M. A., Ch. Kiwan, M. Abboud, T. Todorov. A review of aflatoxin M1 in raw milk: importance on human health and ruminants. – In: Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2022, vol. 7, No 2(13), 143 – 153, ISSN 2534-9333.

Участие с кратка устна презентация и постер в конгрес „JNGTV: Journées nationales des groupements techniques vétérinaires“ 15 – 16 май 2024 г. в Турс – Франция.

2. Haidar, M. A., T. Todorov, M. Abboud. Prevalence et détection des types d'Aflatoxines dans le lait cru des vaches laitières élevées dans différents systèmes d'élevage, nutrition et saison dans la Vallée de la Bekaa, Liban. SNGTV Journées des GTV Actualites en Sante Animale, 2024, p. 36, ISSN 3003-4221.

Публикации в научни издания

3. Haidar, M. A. Prevalence and detection of aflatoxin M1 in dairy cow raw milk raised under different breeding systems, nutrition and season in Bekaa Valley – Lebanon. – In: Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2023, vol. 8, No 2(15), 3 – 1., ISSN 2534-9333, e-ISSN 2534-9341. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7707633>.

4. Haidar, M. A., M. Abboud, T. Todorov. Detection of aflatoxin B1 in different animal feedstuffs in three regions of Bekaa Valley – Lebanon. – In: Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2023, vol. 8, No 2(15), 12 – 18, ISSN 2534-9333, e-ISSN 2534-9341. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1033>