

سنجش حضور آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های آغوز گاوی خشک شده با لیوفیلیزاسیون و اسپری دراینگ

ابوالفضل کامکار^{۱*} محمد ربانی^۲ اشکان جیلی جوان^۳ محمد رضا مخبر دزفولی^۴ فریدون رضازاده^۵

- ۱) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
- ۲) بخش زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان - ایران.
- ۳) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان - ایران.
- ۴) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
- ۵) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۷ آذر ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۲ مهر ماه ۱۳۸۸)

چکیده

آفلاتوکسین M_1 در مقایسه با سایر میکوتوکسین‌ها به میزان بیشتری در شیر و فرآورده‌های شیری یافت می‌شود. فرآورده‌های شیری از جمله آغوز نیز در صورت تغذیه دام‌های شیری از جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین B_1 به این سم آلوده می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین وضعیت حضور و میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های آغوز لیوفیلیزه و اسپری دراینگ تهیه شده از یکی از گاوداری‌های اطراف تهران صورت گرفت. در این مطالعه از آزمایش‌های رقابتی جهت تشخیص آفلاتوکسین M_1 بر روی ۲۵ نمونه آغوز استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که ۷۶ درصد نمونه‌های آغوز به آفلاتوکسین M_1 آلوده بوده و محدوده آلودگی بین ۱۶ تا ۱۱۷۶ نانوگرم در لیتر قرار داشت. میانگین آفلاتوکسین M_1 آغوز در این مطالعه ۲۱۳/۳۷ نانوگرم در لیتر بود. در ۹۲ درصد از نمونه‌های آلوده، میزان سم بالاتر از حد استاندارد ۵۰ نانوگرم در لیتر (استاندارد اتحادیه اروپا) و ۴۰ درصد بالای حد استاندارد ۵۰۰ نانوگرم در لیتر (آمریکا) بود. با توجه به مخاطرات مهم ناشی از آفلاتوکسین برای سلامتی انسان و آلودگی درصدی از نمونه‌های آغوز مورد مطالعه، انجام مطالعات گسترده جهت تشخیص آلودگی به آفلاتوکسین در نمونه‌های آغوز در کشور توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M_1 ، آغوز، الیزا.

آن‌ها آفلاتوکسین B_1 از همه خطرناکتر می‌باشد (۲۴).

اگر حیوان از غذای آلوده به آفلاتوکسین B_1 مصرف کند در بدن دام به نوع M_1 تبدیل و در شیر دام ظاهر می‌شود. این تغییر و تبدیل در کبد دام صورت می‌گیرد. این آفلاتوکسین از غدد پستانی گاوهای شیری به درون شیر ترشح می‌شود. اثرات M_1 از نوع B_1 کمتر ولی تقریباً شبیه آن می‌باشد. در مقالات زیادی گزارش شده که بین میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر و آفلاتوکسین B_1 در غذای دام ارتباط مستقیم یا خطی وجود دارد (۱).

از جمله ترکیبات مهم با منشأ گاوی که در سالیان اخیر استفاده از آن برای مصارف انسانی نیز توسعه پیدا کرده است کلستروم می‌باشد. کلستروم گاو ماده‌ای غنی از عوامل ایمنی بخش، عوامل رشد و ترمیم بافتی است که استفاده از آن در پیشگیری یا درمان عفونت‌های ناشی از عوامل عفونی مختلف (۲۶، ۱۸، ۱۷، ۴، ۶)، اختلالات گوارشی (۲۲)، تقویت رشد و غیره (۶) مورد مطالعات گسترده قرار گرفته و بعضاً به صورت فرآورده‌های تجاری نیز به بازار راه یافته است.

با توجه به این‌که امروزه این فرآورده به‌طور اسپری دراینگ یا لیوفیلیزه مورد مصرف قرار می‌گیرد و در فرآورده‌های لبنی وجود آفلاتوکسین M_1 ، محتمل است در این تحقیق حضور این سم قارچی در نمونه‌های کلستروم لیوفیلیزه و اسپری دراینگ برای اولین بار در ایران مورد مطالعه قرار گرفته است.

مقدمه

آشنا نبودن اکثریت کشاورزان و صاحبان دام به شرایط رشد و نمو میکروارگانیسم‌ها، بخصوص قارچ‌ها، سالانه به‌طور مشهود خسارات مالی قابل توجهی و به شکل غیر معمول صدمات جسمی و جانی قابل تأملی را به جمعیت انسان و دام در کشور ما وارد می‌کند.

برخی قارچ‌ها طی مدت رشد خود بر روی مواد غذایی، علاوه بر کاهش ارزش غذایی متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام سموم قارچی تولید مینمایند که برای سلامتی انسان و موجودات خطرناک هستند و پیامد دریافت این سموم توسط موجود زنده می‌تواند اثرات سمی، سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، جهش‌زایی و کاهش رشد باشد (۵).

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از سموم قارچی هستند که توسط گونه‌های خاصی از جنس آسپرژیلوس شامل آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*Aspergillus parasiticus*) و نومیوس (*Aspergillus nomius*) تولید می‌شوند. این گروه از سموم قارچی به‌عنوان سردسته تمامی سموم قارچی محسوب می‌شوند به همین دلیل بیش از سایر سموم قارچی مورد توجه محققان و مراجع بهداشتی قرار گرفته‌اند. تاکنون بیش از ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده است که از میان آن‌ها انواع G_1 ، A_1 و M_1 بیشترین اهمیت را دارند، که در بین



جدول ۱- وضعیت آلودگی نمونه‌های آغوز گاوی لیوفیلیزه و اسپری در اینک.

به آفلاتوکسین M ₁ (نانوگرم در لیتر)							
تعداد	درصد آلودگی	M>۵۰۰ng/l	N>۵۰ng/l	میانگین	حداکثر	حداقل	انحراف معیار
۲۵	٪۷۶	٪۴	٪۹۲	۲۱۳/۳۷	۱۱۷۶	۱۶	۲۵۰/۲۱

روش آنالیز آماری: داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش‌های آمار توصیفی (محاسبه نسبت آلودگی، میانگین و انحراف معیار) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه در جدول ۱ آمده است. ۷۶ درصد نمونه‌های مورد مطالعه از لحاظ آلودگی به آفلاتوکسین M₁ مثبت بودند و از میان ۲۵ نمونه تعداد ۱۹ نمونه آلودگی بالاتر از حد استاندارد ۵۰ نانو گرم در لیتر (استاندارد اتحادیه اروپا) را نشان می‌دادند که در واقع ۹۲ درصد از کل نمونه‌ها را شامل می‌شد. ضمناً در مقایسه با حد استاندارد ۵۰۰ نانو گرم در لیتر (استاندارد آمریکا)، غلظت آلودگی آفلاتوکسین M₁ در ۹۶ درصد نمونه‌ها در حد مجاز بود. محدوده آلودگی به طور کلی بین ۱۶ تا ۱۱۷۶ نانوگرم در لیتر در این مطالعه بدست آمد.

بحث

در کشورهایی که دارای صنعت دامداری پیشرفته هستند تحقیقاتی جهت تعیین وضعیت آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به AFM₁ انجام شده است (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵).

در ایران نیز در سال ۱۳۶۱ در مطالعه‌ای که توسط کریم و همکاران صورت گرفت با استفاده از روش کروماتوگرافی روی لایه نازک تعداد ۶۱ نمونه شیر شامل ۵۲ نمونه شیر دامداری‌های اطراف تهران که به صورت اتفاقی برداشت شده بود و ۷ نمونه مربوط به شیرهای پاستوریزه شده آزمایش شد و نتایج نشان داد که ۹۲/۳ درصد از شیرهای خام و ۱۰۰ درصد شیرهای پاستوریزه بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا آلوده به AFM₁ بودند. این محققین میزان آلودگی به AFM₁ را در شیرهای خام بین ۱۰-۶ میکروگرم در لیتر و در شیرهای پاستوریزه ۵-۱ میکروگرم در لیتر گزارش نمودند (۱۵).

همچنین کریم و خراسانی در سال ۱۳۷۵ با بررسی ۷۳ نمونه از شیرهای تحویلی به کارخانه شیر پاستوریزه تهران با استفاده از روش الیزا نشان دادند که ۸۲/۲ درصد نمونه‌ها آلوده به AFM₁ بودند که در تمامی موارد غلظت این توکسین بالاتر از حد مجاز استاندارد کشورهای اروپایی (EC) یعنی ۵۰ نانوگرم در لیتر بود. میانگین آلودگی بدست آمده ۲۵۹/۵ نانوگرم در لیتر با حدود تغییرات ۴۶۳-۵۶ نانوگرم در لیتر بوده است (۱۶).

در مطالعه کامکار در سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۸ که روی ۵۲ و ۶۴ نمونه شیر پاستوریزه انجام گرفت به ترتیب ۷۹/۹۲ و ۱۰۰ درصد نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین بوده و دارای محدوده آلودگی ۴۰ تا ۹۳/۶۰ و ۶۹ تا ۳۸۷ نانوگرم

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه‌ها: به منظور انجام این تحقیق نمونه‌های کلستروم طی ۲۴ ساعت پس از زایش از گاوهای هلشتاین ایرانی تهیه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

لیوفیلیزاسیون: این کار روی ۲۵ نمونه آغوز با استفاده از دستگاه (Epilson-۱۲D, Martin Christ, Germany) انجام شد. مدت زمان انجماد ۴ ساعت در ۳۰- درجه سانتیگراد بود و مدت زمان ایجاد خلاء نیز ۱۹ ساعت در فشار ۱/۳۰ میلی بار بود.

اسپری در اینک: تعداد ۲۵ نمونه کلستروم با استفاده از دستگاه (Mini Spray dryer-B-۱۹۱, Buchi Switzerland) خشک گردید. حداکثر دمای بکار رفته ۵۰ درجه سانتیگراد بوده و فشار برابر ۸-۵ میلی بار بود. مدت زمان مورد نیاز برای پودر کردن یک لیتر کلستروم ۵ ساعت بود.

اندازه‌گیری آفلاتوکسین M₁: بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت (R- Biopharm, Germany) نمونه‌های آغوز در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد (۵۰ درجه فارنهایت) به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰g سانتریفوژ گردیدند. پس از سانتریفوژ لایه بالایی نمونه‌ها با استفاده از پیت پاستور به طور کامل برداشته شد. از قسمت بدون چربی به طور مستقیم جهت آزمایش استفاده گردید (۱۰۰ میکرو لیتر به ازای هر گروه). به تعداد کافی از گوده‌های میکرو تیتیر برای اندازه‌گیری استانداردها و نمونه‌ها استفاده گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول‌های استاندارد یا نمونه به طور مجزا به حفره‌های دو تایی مورد نظر اضافه شده عمل مخلوط کردن به طور دستی با ملایمت و از طریق تکان دادن پلیت انجام گرفته و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) در محلی تاریک نگهداری می‌شد.

مایعات از داخل حفره‌ها خارج شده و سه مرتبه به طور محکم ظرف نگهدارنده بصورت وارونه بر روی کاغذ جذب کننده برای اطمینان از خروج کامل آن‌ها زده شد. سپس تمام گوده‌ها با ۲۵۰ میکرو لیتر از بافر شستشو پر و خالی شده این شستشو دو بار تکرار گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رقیق شده کنژوگه آنزیم به گوده‌ها اضافه شده، و به آرامی با دست تکان داده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) نگاه داشته شد. مرحله شستشومانند دفعه قبل انجام شد.

مقدار ۵۰ میکرو لیتر از سوبسترا و ۵۰ میکرو لیتر از محلول کروموزن به هر یک از گوده‌ها اضافه شده طبق همان روش دستی گفته شده عمل مخلوط کردن انجام شده و به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) نگاه داشته شد.

مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده به هر یک از گوده‌ها اضافه شده و طبق روش گفته شده مخلوط گردیده و میزان جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل شاهد اندازه گرفته شد سپس با کمک نرم افزار تهیه شده توسط شرکت سازنده کیت نهایتاً میزان آفلاتوکسین محاسبه گردید.



References

1. Alcroft, R., Roberts, B.A. (1968) The relationship between AFB₁ intake by cows and excretion of AFM₁ in milk. *Vet. Rec.* 82: 116-118.
2. Aycicec, H., Abdurrahman, A. (2004) Control of AFM1 contamination in dairy products in Turkey. *Food. Cont.* 16: 263-266.
3. Bakirci, I. (2001) A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Cont.* 12: 47-51.
4. Casswall, T. (1998) Treatment of *Helicobacter pylori* infection in infants in rural Bangladesh with oral immunoglobulin from hyperimmune bovine colostrum. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12: 563-668.
5. Creppy, E. E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Letter.* 127: 19-28.
6. Ebina, T. (1983) Prevention of rotavirus infection by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. *Lancet.* 29:1029-1030.
7. Galvano, F., Glofaro, V., Ritieni, A., Bognanno, M., De Angelis, A., Galvano, G. (2001) Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy, Second year of observation. *Food Addit. Contam.* 18: 644-646.
8. Garrido, N. S. (2003) Occurrence of AFM₁ and milk commercialized in Riberio Brazil. *Food Addit. Contam.* 120: 70-73.
9. Hafez, A. H., Megalla, S. E., Mohran, M. A., Nassar, A. Y. (1985) Aflatoxin & aflatoxicosis: The kinetic behavior of dietary aflatoxins in colostrum drawn from cows postpartum. *Mycopathol.* 3: 761-764.
10. Kamkar, A. (2002) Study on the contamination of UHT milks with aflatoxin M₁ in the city of Tehran. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 57:5-8
11. Kamkar A. (2005) A study on the occurrence of AFM1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Cont.* 16: 593-599.
12. Kamkar, A. (2005) The study on the contamination of aflatoxin in White cheese marketed in Tehran by thin layer chromatography. *IJFST.* 2:71-79
13. Kamkar, A., (2006) A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. *Food Cont.* 17:768-77.

در لیتر بودند (۱۰،۱۴).

در بررسی دیگر کارمروزی شیرهای تولیدی در شهرستان سراب ۶/۶ درصد نمونه‌های شیر خام تولیدی مورد مطالعه حاوی آفلاتوکسین M₁ بود که در ۴۰ درصد آن‌ها غلظت سم بالای حد مجاز اتحادیه اروپا بود (۱۱).
در مورد حضور آفلاتوکسین در کلستروم در ایران تا کنون مطالعه‌ای صورت نگرفته و در دنیا نیز مطالعات اندکی وجود دارد. در مطالعه Hafez و همکاران در سال ۱۹۸۵ پس از آلوده‌سازی تجربی دو گاو آبستن به آفلاتوکسین در مرحله آخر آبستنی (دو هفته قبل از زایمان) حضور متابولیت‌های سمی و کنژوگه‌های آن با الکتروفورز (Electrophoresis) مورد بررسی قرار گرفت و حضور AFM₁، AFB_{2a} که از متابولیت‌های سمی می‌باشند در کلستروم نشان داده شد. متابولیت‌های دفع شده از جمله AFB_{2a} به بخش پروتئینی ایمونوگلوبولین کلستروم کنژوگه شده بود (۹).
در مطالعه حاضر که برای نخستین بار در کشور صورت گرفت حضور آفلاتوکسین M₁ در کلستروم گاوها با روش الایزا ارزیابی شد و نتایج نشان دهنده این واقعیت است که درصد بالایی از آن‌ها دارای سم بوده و در بسیاری از نمونه‌ها غلظت سم بسیار بالا می‌باشد. بنابراین با توجه به مطالبی که ذکر شد، و همچنین نتایجی که در این تحقیق بدست آمد و با توجه به اهمیت بالای آفلاتوکسین در بهداشت مواد غذایی و سلامت انسان و دام و به علت مشکلات فراوانی که در ارتباط با سم زدایی شیر و فرآورده‌های آن از AFM₁ وجود دارد. به نظر می‌رسد که در حال حاضر بهترین راه مقابله در درجه اول رعایت مسایل بهداشتی و تهیه یک جیره سالم و عاری از هرگونه آلودگی قارچی برای دام‌های شیری در دامداری‌هاست که هم سلامت عمومی دام و افزایش تولید آن حفظ می‌شود و هم سلامت جامعه تامین می‌گردد، با توجه به این‌که این روند همواره قابل انجام نیست استفاده از روش‌های زیر توصیه می‌شود:

۱- با توجه به این‌که دمای رشد مطلوب قارچ آسپرژیلوس و تولید حداکثر سم توسط کپک مذکور به ترتیب حدود ۲۵ و ۱۸ درجه سانتیگراد می‌باشد توصیه می‌شود که در دامداری‌ها (در صورت امکان) خوراک دام در دمای پایین‌تر از این محدوده نگهداری شود.

۲- چون رشد سوبیه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس و تولید سم نیازمند رطوبت بالای ۱۴ درصد و حرارت حدود ۲۵ درجه سانتیگراد بوده و کاهش اکسیژن تولید آفلاتوکسین را کم می‌کند توصیه می‌شود که محیط نگهداری خوراک دام دارای دما و رطوبت کمتر از مقدار فوق باشد و در صورت امکان اکسیژن در این قسمت کاهش داده شود.

۳- استاندارد مربوط به حد مجاز آلودگی شیر به AFM₁ و خوراک دام به AFM₁ در کشور رعایت شود.

در پایان ادامه و تعمیق مطالعه حاضر در رابطه با سنجش آفلاتوکسین در نمونه‌های کلستروم توصیه می‌شود.



14. Kamkar, A. (2008) The study of aflatoxin M₁ in UHT milk samples by ELISA. *J. Vet. Res.* 63:7-12
15. Karim, G., Parvaneh, V., Kordi, J. (1983) Study on the contamination of milk with aflatoxin in Tehran area. *J. Iranian Pub. Healt.* 11: 75-84.
16. Karim, G., Khorasani, A. (1998) Study on the contaminatin of raw bulk milk with aflatoxin M₁ in Tehran area using ELISA method. *J. Pagouhesh-va-Sazandegi.* 4: 163-165.
17. Kelly, G. S. (2003) Bovine colostrum: A review of clinical uses. *Alt. Med. Rev.* 8: 378-394.
18. Korhonen, H., Marlina, P., Gill, H. S. (2002) Bovine milk antibodies for health. *Br. J. Nutr.* 84: 135- 146.
19. Lopez, C. E., Ramos, L. L., Romadan, S. S., Bulacio, L. C. (2003) Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Cont.*14: 31-34.
20. Martins, M. L., Martins H. M. (2000) Aflatoxin M₁ in raw and ultra high temperature - treated milk commercialized in Portugal. *Food Addit. Contam.*17: 871-874.
21. Oliveria, C. A., Germano, P. M., Bird, C., pinto, C. H. (1997) Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in Sao Paulo, Brazil. *Food Addit. Contam.*14: 7 - 10.
22. Playford, R. J., Macdonald, C. E., Johnson W. S. (2000) Colostrum and milk- derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 5-14.
23. Rostogi, S., Dwivedi, D. P., Khanna, K. S., Das, M. (2004) Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Cont.* 15:287-290.
24. Rustom, I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59:57-67.
25. Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., Celik, T. H. (2004) Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Cont.*15: 287-290.
26. Uruakpa, F. O., Ismond , M. A. H., Akobundu, E. N. T. (2002) Colostrum and its benefits; a review. *Nutr. Res.* 22: 755- 767.



DETECTION OF AFLATOXIN M₁ IN SPRAY DRIED AND LYOPHILIZED BOVINE COLOSTRUM PRODUCTS

Kamkar, A.^{1*}, Rabbani, M.², Jebelli Javan, A.³, Mokhber-Dezfuli, M.⁴, Rezazadeh, F.⁵

¹*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

²*Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan-Iran.*

³*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan-Iran.*

⁴*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

⁵*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Tabriz, Tabriz-Iran.*

(Received 7 December 2008 , Accepted 4 October 2009)

Abstract:

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is an important mycotoxin frequently found in milk and dairy products. Dairy products and colostrum may be contaminated by aflatoxin M₁ when dairy cattle have fed with aflatoxin B₁-contaminated feeds. This study was undertaken in a dairy farm around Tehran province to determine the presence and level of aflatoxin M₁ (AFM₁) in spray dried and lyophilized colostrum samples. In this study, 25 spray dried and lyophilized colostrum samples were analyzed using competitive ELISA for determining the presence and levels of AFM₁. AFM₁ was found in 76% of the colostrum samples. The range of contamination level was 16 ng/l to 1176 ng/l, (mean value was 213.37 ng/l). Ninety two percent of the contaminated samples exceeded the maximum acceptable levels (50 ng/l, EU standard) and 8% exceeded 500 ng/l. Due to human health hazard and high occurrence of AFM₁ in colostrum samples, monitoring programs should be more extensive and frequent in Iran.

Key words: aflatoxin M₁, colostrum, ELISA.

*Corresponding author's email: akamkar@ut.ac.ir, Tel: 021-61117042, Fax: 021-66933222

