

اثر سطوح مختلف خاک دیاتومه بر فرآسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B₁ با استفاده از میکروارگانیسم‌های جداشده از شکمبه در شرایط برون‌تنی

رشید صفری^۱، ذبیح اله نعمتی^{۲*}، نامدار کامرانی^۳، امیر کریمی^۱

۱- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، تبریز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، تبریز، ایران

۳- دانشجوی ارشد رشته فیزیولوژی دام و طیور دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۶

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی افزودنی خاک دیاتومه بر اثرات منفی آفلاتوکسین در تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی جیره غذایی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. آزمایش در قالب، طرح کاملاً تصادفی با ۶ گروه آزمایشی و ۴ تکرار در هر گروه در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. گروه‌های آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه (شاهد بدون متانول)، ۲- شاهد با متانول، ۳- شاهد با متانول + آفلاتوکسین به میزان ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه (جیره آلوده با آفلاتوکسین)، ۴، ۵ و ۶- جیره آلوده با آفلاتوکسین + سطوح ۷، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم دیاتومه بودند. از شیشه‌های با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر به روش کشت ثابت برای اندازه‌گیری میزان تولید گاز و قابلیت هضم استفاده شد. هر یک از شیشه‌ها با گاز دی‌اکسید کربن پر و سپس با درپوش لاستیکی پلمپ و در حمام آبی در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. کمترین مقدار تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی و بیشترین غلظت آمونیاک مربوط به گروه دارای آفلاتوکسین بود ($P < 0/05$). آفلاتوکسین سبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری تولید گاز، میزان انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب فرار در مقایسه با گروه‌های شاهد نشد. افزودن دو سطح پایین و میانی دیاتومه سبب بهبود تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در مقایسه با گروه آفلاتوکسین شد ($P < 0/05$). همچنین محیط کشت حاوی خاک دیاتومه در سطح پایین (۷ میلی‌گرم در ۲۰۰ میلی‌گرم جیره) سبب بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی و راندمان سنتز میکروبی شد ($P < 0/05$). می‌توان نتیجه گرفت که افزودنی خاک دیاتومه پتانسیل بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر کارکرد شکمبه در شرایط آزمایشگاهی را دارد و تحقیق بیشتر در خصوص ساز و کار عمل آن در اکوسیستم میکروبی شکمبه ضرورت دارد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، ضریب تفکیک، خاک دیاتومه، تولید گاز، قابلیت هضم ماده ماده آلی.

*نویسنده مسئول: ذبیح اله نعمتی

آدرس: گروه علوم دامی دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، تبریز، ایران. تلفن: ۴۴۲۳۳۷۱۷

پست الکترونیک: znemati@tabrizu.ac.ir

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متعلق به یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هاپیرتوکسیک هستند که به طور عمده توسط گونه‌های خاصی از آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکو تولید می‌شوند (۵۷). آن‌ها به لحاظ داشتن خصوصیات سرطانی، تداوم آلودگی در مواد خوراکی بعد از آلودگی اولیه و احتمال آلودگی دامنه وسیعی از مواد خوراکی به آن، جزء مهم‌ترین نوع مایکوتوکسین‌ها هستند (۱۸). بیشتر مواد خوراکی دام و طیور آلوده به انواع قارچ‌های آسپرژیلوس تولید کننده آفلاتوکسین و انواع آفلاتوکسین‌ها هستند (۱-۲). مولکول آفلاتوکسین، خیلی مقاوم به حرارت است و در دمای بالا ۲۶۸ الی ۲۶۹ درجه سانتی‌گراد تجزیه می‌شود (۴۶). بنابراین، تکنولوژی‌های معمولی خشک‌کن‌ها قادر به کاهش غلظت سم، در دانه‌های غلات انبار شده نیست و تنها دماهای بالا در طولانی مدت ممکن است، مفید باشد (۳۲). نشخوارکنندگان عموماً نسبت به تک‌معه‌ای‌ها در برابر اثرات سمی مایکوتوکسین‌ها مقاوم‌تر هستند که اساساً دلیل آن، تجزیه آفلاتوکسین B_1 و یا تبدیل زیستی آن توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه بیان شده است، اما بر خلاف آن، نتایج برخی مطالعات نشان داده است که آفلاتوکسین‌ها معمولاً به مقدار کم و تا ۱۰ درصد در شکمبه تبدیل زیستی می‌شوند (۶۱) و توانایی نشخوارکنندگان در تبدیل آفلاتوکسین B_1 به M_1 محدود بوده و در دامنه ۰/۳۵-۳ درصد در گاو، ۰/۱۸-۳/۱ درصد در بز و بین ۰/۰۸ و ۰/۳۳ درصد در گوسفند است (۵۹). مواد خوراکی آلوده به طور مستقیم با کاهش تولید و سلامتی حیوانات و به طور غیر مستقیم با ورود به شیر، گوشت، تخم مرغ تغذیه و سلامتی انسان را تهدید می‌کند (۲۰). حیوانات در

معرض آفلاتوکسین به مسمومیت حاد با علائم مرگ و میر و خسارت بالا یا مسمومیت مزمن با علائم ناهنجاری‌های بدنی همراه با کاهش عملکرد تولیدی می‌شود (۱۰،۴۷). آلودگی مواد خوراکی با این سموم، امری اجتناب‌ناپذیر است و گستره آلودگی آن جهانی است، به طوری که تنها آلودگی دانه ذرت از آرژانتین، برزیل، فرانسه، ایران و اروگوئه گزارش شده است (۱۳،۲۴،۴۸،۴۹). قارچ‌های توکسین‌زا معمولاً روی بذور کوچک از قبیل گندم، جو، چاودار، برنج، تریتیکاله، ذرت و دیگر مواد خوراکی رشد می‌کنند. از راهکارهای اصلی مبارزه با آن می‌توان به نگهداری اصولی مواد خوراکی و جلوگیری از رشد قارچ روی گیاهان زراعی در مزرعه و بعد از آن باشد. لذا اقدام مهم بعدی در کنترل سموم قارچی، جلوگیری از ورود آن‌ها به بدن دام می‌باشد (۵۲). برای کنترل آفلاتوکسین‌های جدید بکارگیری ازن (۲۹)، اشعه مادون قرمز، گاما (۵۱) و اشعه میدان پالسی (۶۰)، پلاسمای سرد (۵۰) و به کارگیری انواع جاذب‌ها در خوراک دام (۴۲،۵۸) و مخلوط ترکیبات غیر آلی و سویه‌های جدید میکروبی (۳۰) پیشنهاد شده است. خاک دیاتومه نیز یکی از جاذب‌های طبیعی می‌باشد که می‌تواند به صورت مکمل در خوراک مورد استفاده قرار گیرد. خاک دیاتومه، خاک رسوبی تشکیل شده از بدن فسیل شده یک جلبک تک یاخته‌ای به نام دیاتومه بوده و به رنگ‌های مختلف اعم از سفید، خاکستری و زرد تا قرمز است. این خاک معمولاً حاوی ۸۰ تا ۹۵ درصد دی‌اکسید سیلیسیم غیرمتبلور است (۶۲). علاوه بر سیلیس غیرمتبلور (حدود ۶۰ تا ۹۳ درصد)، عنصر اصلی آن کلسیم است، اما عناصر متعددی مانند آلومینیوم، منیزیم، سدیم، آهن، فسفر، گوگرد، نیکل، روی، منگنز و غیره وجود دارد (۵۳-۵۵). دیاتومیت

گوسفند قزل فستوله گذاری شده با میانگین وزن زنده ۴۰ کیلوگرم برای تهیه مایع شکمبه استفاده شدند. جیره غذایی گوسفندان مطابق با جدول ۱ به صورت دوبار در روز و در دو وعده غذایی صبح و عصر تغذیه شد. گروه‌های آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه (شاهد بدون متانول)، ۲- جیره پایه + متانول (شاهد با متانول)، ۳- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مایع شکمبه)، ۴- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مایع شکمبه) + ۷ میلی گرم دیاتومه، ۵- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مایع شکمبه) + ۷۵ میلی گرم دیاتومه، ۶- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مایع شکمبه) + ۱۵۰ میلی گرم دیاتومه بودند.

توانایی اتصال به AFB₁ را هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن دارا می‌باشد (۴۰) و محققین نشان دادند افزودن آفلاتوکسین (نوعی خاک دیاتومه) به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی اثرات سمی آفلاتوکسین را بهبود می‌بخشد (۱۴). بر این اساس آفلاتوکسین به لحاظ خسارت اقتصادی و بهداشتی بالا، خطرات بالقوه شدید دارد و بررسی جنبه‌های مختلف آن امری ضروری است (۲۲). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی، اثر جاذب طبیعی خاک دیاتومه بر فرآسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B₁ با استفاده از میکروارگانیسم‌های جدا شده از شکمبه در شرایط برون تنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های آزمایشی

آزمایش حاضر در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تبریز انجام شد. تعداد ۳ رأس

جدول ۱. اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره پایه استفاده شده در شرایط آزمایشگاهی (درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredient and chemical composition of basal diet used in vitro conditions (% of Dry matter) (NRC, 2007)

درصد از جیره	مورد
۵۰	یونجه خشک
۳۱/۵	دانه جو
۳	دانه ذرت
۶	سیوس گندم
۶	کنجاله سویا
۱	مکمل ویتامین و مواد معدنی ^۱
۱	دی کلسیم فسفات
۰/۵	نمک
۱	کلسیم کربنات
ترکیبات شیمیایی (درصد)	
۹۲	ماده خشک
۸۹/۷۷	مواد آلی
۱۴/۹	پروتئین خام
۳۵	فیبر نامحلول در شوینده خنثی
۲۱/۳۶	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی
۱۰/۲۲	خاکستر
۵/۷۳	چربی خام

^۱ هر کیلوگرم مکمل مواد معدنی و ویتامینی حاوی ۹۹/۲- میلی گرم منگنز، ۵۰ میلی گرم آهن، ۸۴/۷ میلی گرم روی، ۱۰ میلی گرم مس، ۰/۲ میلی گرم سلنیوم، ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D و ۱۸ واحد بین المللی ویتامین E.

روش تهیه آفلاتوکسین

برای تهیه گروه‌های آزمایشی، نیاز به تولید آفلاتوکسین تولید شده در شرایط طبیعی بود، چرا که آلودگی مواد خوراکی در طبیعت با رشد طبیعی قارچ بر مواد خوراکی و تولید انواع آفلاتوکسین شکل می‌گیرد. برای تهیه محیط کشت طبیعی، ابتدا یک ویال از سویه استاندارد قارچ *Aspergillus Parasiticus* NRL 2999 تهیه و در محیط آزمایشگاهی درون شیشه‌ای و در شرایط استریل بر محیط کشت دکستروز آگار حاوی سیب زمینی (potato dextrose agar) کشت گردید. سپس به کمک شمارش میکروسکوپی سوسپانسیون اسپور با غلظت $10^6 \times 5/6$ تهیه شد.

مقدار ۲ سی سی از اسپور قارچی تهیه شده به داخل فلاسک حاوی محیط کشت استریل از برنج تلقیح شد. فلاسک حاوی محیط کشت تلقیح شده به مدت ۵ روز و در شرایط استاندارد دمایی ۲۸ درجه سانتیگراد و سایر شرایط محیطی، در داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس با حرارت دادن، قارچ‌های محیط کشت از بین برده شد و سپس خشک شد (۴۳). میزان آفلاتوکسین B_1 در پودر تهیه شده، به روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد که غلظت آفلاتوکسین تولیدی قابل توجه بوده و نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. آفلاتوکسین تولیدی در متانول حل و به میزان نیاز به ویال‌ها افزوده شد (۴۳).

جدول ۲. غلظت آفلاتوکسین B_1 و آفلاتوکسین کل در محیط کشت تولیدی (میلی گرم در کیلوگرم)

میزان آفلاتوکسین (میلی گرم بر کیلوگرم)	
آفلاتوکسین کل	آفلاتوکسین B_1
۴۰۹	۲۵۰/۸
محیط کشت	

محیط بی‌هوازی و با حضور دی‌اکسید کربن با نسبت ۱ به ۲ مخلوط شد. از آسیاب با الک به قطر منافذ ۱ میلی‌متری جهت آسیاب یکنواخت مواد خوراکی استفاده شد و در درون ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی-لیتری مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه خوراکی ریخته و گروه‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین به داخل ویال‌ها افزوده شد و در نهایت مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمبه داخل هر ویال اضافه شد. حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. میانگین گاز تولیدی در ویال‌های فاقد جیره آزمایشی به عنوان بلنک، از ویال‌های دارای گروه‌های آزمایشی کم شده و از این طریق حجم خالص گاز بدست آمد. حجم گاز تولیدی

اندازه‌گیری فرآیندهای تولید گاز در

شرایط آزمایشگاهی

با استفاده از میکروارگانیزم‌های جدا شده از شکمبه و شبیه‌سازی محیط شکمبه به روش منک، آزمون تولید گاز در محیط آزمایشگاهی انجام شد (۳۸، ۳۹). به منظور استخراج میکروارگانیزم‌ها، مایع شکمبه قبل از تغذیه صبح، از دام‌های دارای فیستوله شکمبه‌ای تهیه و با استفاده از پارچه پنبه‌ساز صاف شد. مایع شکمبه تهیه شده بلافاصله در شرایط دمایی مناسب به آزمایشگاه منتقل شد. مایع شکمبه در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد حمام بن‌ماری تحت گاز دی‌اکسید کربن قرار گرفت. بزاق مصنوعی که قبلاً به روش مکدوگال (۳۴) تهیه شده بود، دمای آن به ۳۹ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. سپس مایع شکمبه و بزاق مصنوعی در

اندازه گیری تجزیه پذیری آزمایشگاهی ماده خشک، ماده آلی

برای اندازه گیری تجزیه پذیری آزمایشگاهی ماده خشک، ماده آلی نیز تهیه بزاق مصنوعی و جمع آوری مایع شکمبه به روش استاندارد انجام شد. در ساعت ۲۴ انکوباسیون، بلافاصله pH چهار تکرار از هر گروه آزمایشی از بن ماری خارج شده و توسط pH متر اندازه گیری (Hi 2211-Hanna Instruments - USA) شد و محتویات هر بطری جهت خروج کامل اجرام باکتریایی و به دست آوردن مقادیر ماده خشک تجزیه نشده در هر بطری، سه بار بوسیله شوینده خنثی شسته شد و با استفاده از کاغذ صافی بدون خاکستر صاف و باقی مانده در آون و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت خشک و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک محاسبه شد. برای اندازه گیری مقادیر خاکستر مواد تجزیه نشده، از کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت استفاده شد (۵۶).

اندازه گیری نیتروژن آمونیاکی

از روش استاندارد فنل - هیپوکلریت برای اندازه گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه استفاده شد (۹). مقدار ۵ میلی لیتر نمونه با محلول استاندارد را با ۲/۵ میلی لیتر فنول و ۲ میلی لیتر محلول هیپوکلریت ترکیب و در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوباسیون شد پس از خنک شدن، جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی میزان جذب نمونه ها به کمک اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد.

تعیین شاخص تفکیک پذیری (Partitioning factor) و توده میکروبی تولیدی و راندمان

سنتر میکروبی

از روش ماکار (۳۳) برای تعیین شاخص تفکیک پذیری، استفاده گردید. شاخص تفکیک پذیری

برای یگ گرم نمونه بر اساس وزن نمونه ها در هر زمان با استفاده از رابطه زیر تصحیح شد:

$$V = (V_t - V_b) \times 1000 / W$$

در این رابطه V برابر با حجم گاز تصحیح شده بر حسب میلی لیتر به ازای هر گرم ماده خشک، V_t حجم گاز تولیدی در شیشه های حاوی نمونه ماده خوراکی بر حسب میلی لیتر، V_b حجم گاز تولید شده در شیشه های فاقد نمونه ماده خوراکی بر حسب میلی لیتر و W وزن نمونه ماده غذایی بر حسب میلی گرم ماده خشک بود. از طریق رابطه $P = b(1 - e^{-ct})$ حجم گاز تولیدی و نرخ تولید گاز بدست آمد که در این رابطه P: حجم تولید گاز در زمان t به صورت تجمعی c: ثابت نرخ تولید گاز، b: کل گاز تولید شده از بخش قابل تخمیر، t: مدت زمان انکوباسیون است (۴۴).

برای تخمین انرژی قابل متابولیسم (ME) از معادله (۳۷) و انرژی خالص شیرواری (NEL) و قابلیت هضم ماده آلی (OMD) از معادله (۳۶) و جهت برآورد میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFAs) از معادله حاصل از تحقیقات (۲۱) استفاده شد.

$$ME \text{ (MJ/kg DM)} = 0.157GP + 0.0084 CP + 0.022 EE - 0.0081 Ash + 1.06$$

$$NE_L \text{ (MJ/kg DM)} = 0.115GP + 0.0054CP + 0.014EE - 0.0054Ash - 0.36$$

$$OMD \% = 0.9991GP + 0.0595CP + 0.0181Ash + 9$$

$$SCFAs \text{ (mmol)} = -0.00425 + GP \cdot 0.0222$$

که در این معادلات GP: تولید خالص گاز در ۲۴ ساعت (میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، CP: پروتئین خام (بر حسب درصد)، Ash: مقدار خاکستر (بر حسب درصد) می باشد.

نتایج

فرآیندهای تولید گاز و تجزیه پذیری ماده خشک و آلی

نتایج افزودن سطوح مختلف خاک دیاتومه به جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین بر فرآیندهای تولید گاز و تجزیه پذیری ماده خشک و آلی در جدول ۲ نشان داده شده است. نرخ تولید گاز در گروه‌های شاهد و شاهد همراه با متانول به ترتیب برابر با ۰/۰۵۷ و ۰/۰۵۹ می‌باشد و در مقایسه با نرخ تولید گاز در گروه حاوی آفلاتوکسین (۰/۰۷۰) اختلاف معنی داری با گروه‌های شاهد و شاهد همراه با متانول نشان نداد. افزودن سطوح مختلف دیاتومه، نرخ تولید گاز را بصورت معنی داری به ترتیب به ارزش عددی ۰/۰۲۹، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۲۴ کاهش داد. چنین نتایجی نشان دهنده این می‌باشد که افزودن جاذب دیاتومه نه تنها نتوانسته تأثیر منفی آفلاتوکسین را کنترل کند بلکه سبب کاهش نرخ تولید گاز در مقایسه با گروه‌های شاهد و گروه آفلاتوکسین شد. نتایج آزمایش حاضر، همسو با نتایج تحقیق دیگری بود که (۴۱) گزارش کردند که در صورت افزودن سطح بالای جاذب بنتونیت به جیره غذایی (به میزان ۶ درصد جیره غذایی) نرخ تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد. با این در برخی از مطالعات استفاده از خاک دیاتومه و کلسیم بنتونیت هیچ تأثیری روی فراوانی پروتوزواها یا باکتری‌ها نشان ندادند (۱۶) و در شرایط آزمایشگاهی غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در لیتر خاک دیاتومه هیچ تأثیری بر فعالیت پروتوزوای شکمبه و همچنین الگوی تخمیر و نرخ تولید گاز نشان نداد (۵).

از لحاظ آنالیز آماری افزودن حلال متانول تأثیری بر میزان گاز حاصل از تخمیر شکمبه نداشت و گاز تولیدی در گروه حاوی آفلاتوکسین در مقایسه با گروه

عبارت است از میلی گرم ماده آلی تجزیه شده بر میلی لیتر گاز تولیدی که طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۵۶).

$$OMDe/IVGP=c-(a-b)/IVGP$$

در رابطه بالا: c بیانگر میلی گرم ماده آلی وزن شده در هر ویال، a میلی گرم مواد تجزیه نشده در هر ویال، b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده در هر ویال به میلی گرم، و IVGP میزان گاز تولیدی است. برای محاسبه مقادیر توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی از روش (۳۳) و طبق رابطه (۵۶) استفاده گردید.

$$MM (mg)=[c-(a-b)]-[NG_{m} \times 2/2k]$$

که در این رابطه MM، توده میکروبی تولیدی (میلی-گرم به ازای گرم ماده خشک)، NG، میلی لیتر گاز خالص تولیدی برای ۲۴ ساعت، K، ضریب استوکیومتری و مقدار آن ۲/۲ می‌باشد. راندمان سنتز میکروبی با تقسیم توده میکروبی تولید شده بر مقدار ماده آلی حقیقی قابل تخمیر در پایان زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت محاسبه شد.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل آماری زیر انجام شد که در این مدل Y_{ij} نشان دهنده مقدار هر مشاهده، μ برابر با میانگین کل، T_i اثر تیمار، e_{ij} خطای آزمایش می‌باشد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

برای آنالیز داده‌های بدست آمده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ (SAS 2002) استفاده شد و از آزمون دانکن با سطح احتمال ۰/۰۵ برای مقایسه میانگین‌ها، استفاده شد.

آفلاتوکسین مشاهده شد. افزودن سطوح مختلف دیاتومه سبب بهبود معنی‌دار تجزیه‌پذیری ماده خشک در مقایسه با گروه آفلاتوکسین شد اما تفاوت آن با گروه‌های شاهد، معنی‌دار نشد. همچنین افزودن دو سطح پایین دیاتومه سبب بهبود نسبی اثرات منفی آفلاتوکسین بر تجزیه‌پذیری ماده آلی شد ($P < 0/05$) ولی تفاوت آن‌ها در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار نشد. با افزایش سطوح جاذب دیاتومه میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی کاهش پیدا کرده و تفاوت میزان تجزیه‌پذیری در بین سطوح پایین و بالای دیاتومه معنی‌دار شد ($P < 0/05$). بهبود قابلیت هضم ماده خشک و آلی با افزودن خاک دیاتومه در این مطالعه بیانگر بهبود فرآیند تخمیر شکمبه است. بهبود در قابلیت هضم می‌تواند تا حدودی به خاطر اثرات منفی خاک دیاتومه بر تولید متان باشد به طوری که گزارش کردند افزودن مخلوط خاک دیاتومه و بنتونیت به محیط کشت اثر معنی‌داری بر تعداد کل جمعیت باکتریایی و قارچی نشان دادند اما در مقایسه با گروه شاهد سبب مهار ۵۹ و ۹۷ درصدی تولید متان به ترتیب در مدت ۵ و ۲ روز می‌شود (۵) و بیان داشتند که این افزودنی احتمالاً از طریق غیر مستقیم و با کاهش فعالیت‌های رونویسی تولید متان را مهار کردند و اثر مهار تولید متان آن موثرتر از سایر افزودنی‌ها از جمله تانن متراکم، ساپونین چای (۲۳،۲۷،۲۸،۳۵) و بروموکلرومتان (۱۵) است. محققین قبلاً با بررسی شاخص حضور پروتوزوا در شکمبه (18S rRNA) به کمک تانن، یونوفرها و ضد پروتوزوا، نشان دادند که کاهش جمعیت پروتوزوایی با کاهش تولید متان همراه است (۴،۲۵،۴۵) بنابراین ساز و کار احتمالی دیگر دیاتومه ممکن است همین امر باشد. اغلب گروه‌های موثر در شرایط برون‌تنی، کاهش معنی‌داری در

شاهد کاهش یافت. افزودن سطوح ۷ و ۱۷۵ میلی‌گرم دیاتومه به محیط کشت در مقایسه با گروه آفلاتوکسین تفاوت معنی‌داری بر حجم گاز تولیدی نداشت هرچند کمترین سطح دیاتومه نسبت به گروه آفلاتوکسین از لحاظ عددی افزایش تولید گاز نشان داد ($P \geq 0/05$). با افزایش سطوح دیاتومه میزان کل گاز تولیدی سیر نزولی داشته به طوری که کمترین مقدار کل گاز تولیدی در بالاترین سطح دیاتومه بوده (۱۶۴/۱۵) و در مقایسه با دو سطح دیگر آن و گروه آفلاتوکسین تفاوت معنی‌دار داشته است ($P \leq 0/05$) هرچند این یافته نشان از اثر منفی سطح بالای دیاتومه (۱۷۵ میلی‌گرم) بر محیط تخمیری شکمبه و تولید گاز داشته است اما در مطالعه قبلی افزودن خاک دیاتومه به میزان ۲ گرم در لیتر به محیط کشت بدون حضور آفلاتوکسین تأثیری بر تولید گاز نداشته است (۵). مشابه نتایج آزمایش حاضر، با توجه به اثرات ثابت شده و منفی آفلاتوکسین بر جمعیت میکروبی شکمبه، فرآسنجه تولید گاز در حضور آفلاتوکسین کاهش پیدا می‌کنند ولی بر خلاف نتایج این آزمایش با افزودن جاذب آفلاتوکسین به محیط کشت اثر مهاری آفلاتوکسین برطرف شده و این فرآسنجه‌ها افزایش می‌یابند (۲۶،۳۱).

در جدول ۲ نتایج تأثیر افزودن آفلاتوکسین و سطوح مختلف دیاتومه بر تجزیه‌پذیری ماده آلی و ماده خشک آمده است. تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در گروه شاهد (۵۸/۸۴، ۷۴/۹۶) و گروه شاهد همراه با متانول (۷۱/۸۹، ۵۵/۵۰) مشابه هم بوده اما در گروه آفلاتوکسین در مقایسه با گروه شاهد، تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی (۲۹/۱۷، ۴۴/۸۷) شدیداً کاهش معنی‌دار پیدا کرد ($P < 0/05$). کمترین مقدار تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در گروه دارای

اثر گذاری در شرایط درون تنی دارد (۱۹) بنابراین انجام آزمایش بر روی خود حیوان ضروری است.

جدول ۲. اثر سطوح مختلف خاک دیاتومه بر میزان کل گاز تولیدی، نرخ تولید گاز، تجزیه پذیری ماده خشک و آلی جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B₁

Table 2- Effect of different level of diatom on total gas production and gas production rate, DMD and OMD in contaminated diet with aflatoxin B₁

معنی داری	خطای استاندارد	تیمارهای آزمایشی ^۱				شاهد با متانول	شاهد بدون متانول
		آفلاتوکسین + سطح بالای دیاتوم	آفلاتوکسین + سطح میانی دیاتومه	آفلاتوکسین + سطح پایین دیاتومه	آفلاتوکسین		
<۰/۰۰۱	۰/۰۰۴۴	^b ۰/۰۲۴	^b ۰/۰۲۵	^b ۰/۰۲۹	^a ۰/۰۷۰	^a ۰/۰۵۹	^a ۰/۰۵۷
<۰/۰۰۱	۱۵/۲۵	^c ۱۶۴/۱۵	^b ۲۰۹/۹۰	^b ۲۳۴/۳۸	^b ۲۲۸/۴۸	^a ۲۹۴/۳۸	^a ۲۹۵/۰۵
<۰/۰۰۱	۲/۳۱	^{cd} ۴۹/۹۱	^{bc} ۵۵/۳۱	^b ۶۱/۲۶	^d ۴۴/۸۷	^a ۷۱/۸۹	^a ۷۴/۹۶
<۰/۰۰۱	۲/۶۰	^c ۳۷/۳۳	^b ۴۸/۱۷	^a ۵۶/۵	^d ۲۹/۱۷	^{ab} ۵۵/۵۰	^a ۵۸/۸۴

^۱ تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه)، آفلاتوکسین + سطح پایین دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح بالای دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷۵ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، تیمارها با حروف متفاوت به لحاظ آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی دار دارند.

فرآسنجه‌های تخمیری شکمبه

در جدول ۳ نتایج اثر افزودن آفلاتوکسین و سطوح مختلف خاک دیاتومه بر فرآسنجه‌های تخمیری شامل انرژی متابولیکی، انرژی متابولیکی شیر، قابلیت هضم ماده آلی، میزان اسیدهای چرب فرار و ازت آمونیاکی آورده شده است. میزان انرژی متابولیکی، انرژی متابولیکی شیر و قابلیت هضم ماده آلی گروه‌های شاهد و شاهد همراه با متانول مشابه هم بوده و در بین آنها اختلاف معنی داری نداشت. حضور آفلاتوکسین در خوراک، سبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری در شرایط آزمایشگاهی شد به طوری که انرژی متابولیکی در مقایسه با گروه شاهد از ۹/۱۵ به ۷/۶۲، انرژی متابولیکی شیر از ۵/۱۹ به ۴/۵۴ و همچنین قابلیت هضم ماده آلی از ۵۷/۲۶ به ۵۰/۶۲ کاهش یافت (P<۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف خاک دیاتومه به عنوان جاذب

آفلاتوکسین، نه تنها اثری بر کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین بر این فرآسنجه‌ها نداشته بلکه سبب کاهش میزان آنها در مقایسه با گروه آفلاتوکسین و شاهد شد (P<۰/۰۵). خاک دیاتومه به خاطر فعالیت و توانایی آن در جذب لیپیدها برای کنترل انگل‌های دستگاه گوارش از قبیل هلمینت و کوکسیدیوزها در نشخوارکنندگان (۷) و مرغ تخمگذار (۱۷) استفاده می‌شود. در آزمایش حاضر خاک دیاتومه سبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری شامل انرژی متابولیسیم، انرژی متابولیکی شیر و فرآسنجه تخمینی قابلیت هضم ماده آلی شد. این یافته، مخالف گزارش دیگر محققین است به طوری که افزودنی خاک دیاتومه بدون حضور آفلاتوکسین به میزان ۲ گرم در لیتر تأثیری بر الگوی تخمیر شکمبه و فعالیت پروتوزوایی نداشت (۵).

آفلاتوکسین سبب کاهش مقدار نیتروژن آمونیاکی شد و بیشترین کاهش مربوط به سطح بالای دیاتومه بود ($P < 0/05$). برخلاف نتایج این آزمایش، نشان دادند که سطوح افزایشی خاک دیاتومه و کیتوزان تأثیری بر نیتروژن آمونیاکی ندارند (۵). در تأیید نتایج آزمایش حاضر، گزارش کردند که پروبیوتیک مخمر با افزایش مصرف لاکتات و آمونیاک شکمبه سبب تعدیل pH شکمبه و افزایش سنتز پروتئین می شود (۱۲). کاهش نیتروژن آمونیاکی بواسطه افزودن خاک دیاتومه احتمالاً به خاطر اثر ضد پروتئولیتیکی آن در حضور آفلاتوکسین می باشد و یا با تحریک باکتری های شکمبه و افزایش مصرف نیتروژن آمونیاکی و افزایش سنتز توده میکروبی می شود که داده های راندمان میکروبی و شاخص تفکیک مویید این موضوع می باشد (جدول ۴).

بنابراین احتمالاً مکانیسم عمل اثر دیاتومه در حضور آفلاتوکسین متفاوت بوده است.

بیشترین غلظت اسیدهای چرب فرار مربوط گروه های شاهد (۱/۰۴۴) و شاهد همراه با متانول (۱/۰۹) می باشند و حضور آفلاتوکسین سبب کاهش میزان آن به ۰/۸۹ شد ($P \leq 0/05$). بلومل و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که بین تولید گاز و اسیدهای چرب فرار تولیدی رابطه مستقیم وجود دارد (۸). در آزمایش حاضر همین رابطه برقرار بوده و در گروه شاهد حداکثر تولید اسید چرب فرار همراه با تولید گاز مشاهده شد درحالی که در گروه آفلاتوکسین برعکس بود. غلظت اسیدهای چرب فرار در بین گروه آفلاتوکسین و سطوح مختلف دیاتومه (۰/۵۱) اختلاف معنی دار نداشت و افزودن جاذب دیاتومه تأثیری بر کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشته است. همچنین در این آزمایش سطوح مختلف افزودنی دیاتومه در حضور آفلاتوکسین اثر معنی داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشت که مشابه آن، با ارزیابی افزودنی خاک دیاتومه گزارش کردند افزودنی دیاتومه در مقایسه با شاهد اثری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار و انواع اسیدهای چرب فرار (استات، پروپیونات، بوتیرات و اسید چرب شاخه دار) ندارد (۵). هیدروژن علاوه بر تولید متان می توانند برای تولید اسیدهای چرب فرار مانند پروپیونات و استات نیز مورد استفاده قرار گیرند. سطح اسیدهای چرب فرار موجود در شکمبه می تواند نشانه ای از راندمان خوراک دام باشد و کاهش در نسبت استات احیا شده به پروپیونات احیا شده در شکمبه همزمان با کاهش تولید CH_4 است (۱۱).

مقدار نیتروژن آمونیاکی در گروه آفلاتوکسین در مقایسه با گروه های شاهد افزایش یافت ($P < 0/05$). افزودن سطوح مختلف دیاتومه در مقایسه با گروه

جدول ۳. اثر خاک دیاتومه به عنوان توکسین بایندر بر فرآیندهای تخمیری جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B₁

Table 3- Effect of diatom as toxin binder on fermentation parameters of diet contaminated with aflatoxin B₁ in vitro

سطح معنی داری	خطای استاندارد	تیمارهای آزمایشی ^۱					مورد
		آفلاتوکسین + سطح بالای دیاتومه	آفلاتوکسین + سطح میانی دیاتومه	آفلاتوکسین + سطح پایین دیاتومه	آفلاتوکسین	شاهد با متانول	
۰/۰۰۱	۰/۴۶	^c ۴/۷۸	^c ۵/۴۲	^c ۴/۹۰	^b ۷/۶۲	^{ab} ۸/۶۷	^a ۹/۱۵ انرژی متابولیکی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)
۰/۰۰۱	۰/۳۴	^c ۲/۳۴	^c ۲/۸۱	^c ۲/۴۳	^b ۴/۵۴	^a ۵/۴۷	^a ۵/۱۹ انرژی خالص شیرواری (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)
۰/۰۰۱	۲/۹۳	^c ۳۲/۴۶	^c ۳۶/۶۱	^c ۳۳/۲۹	^b ۵۰/۶۲	^a ۵۹/۶۵	^a ۵۷/۲۶ ماده آلی قابل هضم (درصد)
۰/۰۰۱	۰/۰۶	^b ۰/۴۹	^b ۰/۵۸	^b ۰/۵۱	^b ۰/۸۹	^a ۱/۰۹	^a ۱/۰۴۴ اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر گرم ماده خشک)
۰/۰۰۱	۰/۷۳	^a ۱۲/۸۳	^{cd} ۲۱/۸۲	^{bc} ۱۹/۶۰	^d ۲۳/۵۷	^{bc} ۲۰/۷۲	^b ۱۹/۰۲ نیترژن آمونیاکی (میلی گرم بر دسی لیتر)

^۱ تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه)، آفلاتوکسین + سطح پایین دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح میانی دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷۵ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح بالای دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۱۵۰ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک) تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی دار دارند.

جدول ۴. تأثیر سطوح مختلف دیاتومه به عنوان جاذب توکسین در جیره غذایی حاوی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک پذیری و توده میکروبی تولیدی میکروارگانسیمهای شکمبه در شرایط آزمایشگاهی

Table 4. Effect of different levels of diatom as toxin binder in the rations containing aflatoxin on partitioning factor and microbial mass of ruminal microorganisms in vitro

سطح معنی داری	خطای استاندارد	تیمارهای آزمایشی ^۱					مورد
		آفلاتوکسین + سطح بالای دیاتومه	آفلاتوکسین + سطح میانی دیاتومه	آفلاتوکسین + سطح پایین دیاتومه	آفلاتوکسین	شاهد با متانول	
<۰/۰۰۱	۰/۱۸	^c ۲/۷۷	^b ۳/۷۰	^a ۴/۷۸	^c ۲/۳۵	^b ۳/۲۸	^b ۳/۴۹ ضریب تفکیک (میلی گرم ماده آلی تجزیه شده بر میلی لیتر گاز)
<۰/۰۰۱	۴/۳۹	^c ۱۲/۷۲	^b ۳۸/۷۵	^a ۵۸/۵۰	^c ۴/۷۷	^a ۵۰/۳۵	^a ۵۰/۸۲ توده میکروبی (میلی گرم)
<۰/۰۰۱	۲/۳۸	^c ۶/۸۷	^b ۲۰/۹۵	^a ۳۱/۶۲	^c ۲/۵۸	^a ۲۷/۲۲	^a ۳۷/۴۷ راندمان سنتز میکروبی (درصد)

^۱ تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه)، آفلاتوکسین + سطح پایین دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح میانی دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷۵ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح بالا دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۱۵۰ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک) تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی دار دارند.

خاک دیاتومه و آفلاتوکسین برابر بوده در حالیکه راندمان سنتز میکروبی و شاخص تفکیک بیشتر از گروه آفلاتوکسین بود. در تأیید آزمایش حاضر محققین گزارش کردند افزودن مخلوط خاک دیاتومه و بنتونیت به محیط کشت در مقایسه با گروه شاهد سبب مهار ۹۷ درصدی تولید متان در مدت ۲ روز تخمیر می‌شود (۵). این افزودنی بدون تأثیر منفی بر تعداد کل جمعیت باکتریایی و قارچی احتمالاً بصورت غیر مستقیم و با کاهش فعالیت‌های رونویسی تولید متان را مهار کردند و اثر مهاری آن بر تولید متان از سایر مهارکننده‌های متان مثل تانن متراکم، ساپونین چای (۲۳، ۲۷، ۲۸، ۳۵) موثر تر است. بنابراین یکی از مکانیسم‌های احتمالی خاک دیاتومه در بهبود تخمیر محیط کشت کاهش تولید متان بوده است. تولید گاز در محیط بی‌هوازی شکمبه یک محصول تخمیر است که نوعی اتلاف انرژی محسوب می‌شود و با کاهش تولید گاز متان راندمان سنتز میکروبی افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

افزودنی خاک دیاتومه می‌تواند اثرات منفی آفلاتوکسین بر تجزیه پذیری ماده خشک و آلی، فرآسنجه‌های تخمیری از قبیل شاخص تفکیک پذیری، ازت آمونیاکی، توده میکروبی و راندمان سنتز میکروبی را بهبود بخشد. بهترین سطح استفاده از خاک دیاتومه برای جلوگیری از اثرات سمی آفلاتوکسین بر فرآیند تخمیری محیط کشت شکمبه استفاده از سطح ۷ میلی گرم و یا پایین تر از آن است. می‌توان نتیجه گرفت که افزودنی خاک دیاتومه پتانسیل بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر کارکرد شکمبه در شرایط آزمایشگاهی را دارد و تحقیق بیشتر در خصوص ساز و کار عمل آن در اکوسیستم میکروبی شکمبه ضرورت دارد.

شاخص تفکیک پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود شاخص تفکیک پذیری گروه آفلاتوکسین (۲/۳۵) در مقایسه با گروه‌های شاهد (۳/۴۹) و شاهد همراه با متانول (۳/۲۸) بطور معنی‌دار کاهش یافت. افزودن دو سطح پایین دیاتومه اثر منفی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک پذیری را جبران کرد اما بالاترین سطح دیاتوم تفاوت معنی‌داری با گروه آفلاتوکسین نداشت ($P \leq 0.05$). شاخص تفکیک همان راندمان سنتز میکروبی در شرایط آزمایشگاهی است (۶) و شاخص تفکیک بالا به این مفهوم است که نسبت بیشتری از ماده تجزیه شده صرف سنتز توده میکروبی می‌شود. با افزودن سطوح مختلف جاذب دیاتومه میزان توده میکروبی در مقایسه با گروه آفلاتوکسین بهبود یافت و در بین سه سطح دیاتومه، بیشترین و کمترین مقدار توده میکروبی مربوط به سطح پایین و بالای دیاتومه (۵۸/۵۰ و ۱۲/۷۲) بودند. میزان راندمان سنتز میکروبی نیز روندی مشابه به روند شاخص تفکیک پذیری و توده میکروبی دارد و بهترین پاسخ از لحاظ شاخص تفکیک پذیری، توده میکروبی و راندمان سنتز میکروبی مربوط به سطح پایین خاک دیاتومه بوده و در سطوح بالا پاسخ یا ضعیف بوده و اثر منفی بر فرآسنجه‌های تخمیری داشته است. بنابراین آفلاتوکسین احتمالاً فعالیت میکروارگانیزم‌های شکمبه در استفاده از نیتروژن برای تولید پروتئین میکروبی را محدود کرده و سبب افزایش تولید ازت آمونیاکی و کاهش شاخص تفکیک پذیری شده است (۳). به طوریکه با افزودن خاک دیاتومه به محیط کشت نه تنها میزان ازت آمونیاکی کاسته شده بلکه میزان شاخص تفکیک-پذیری و سنتز توده میکروبی هم افزایش یافته است. در آزمایش حاضر، میزان تولید گاز در گروه‌های افزودنی

منابع

- laying hens. *Poultry Science*, **90**: 1416-1426.
8. Blümmel, M., Makkar H., Becker K.. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, **77**: 24-34.
 9. Broderick, G., and Kang J. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, **63**: 64-75.
 10. Bryden, W. L., and Technology. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science*, **173**: 134-158.
 11. Christophersen, C., Wright A. G., and Vercoe P. 2008. In vitro methane emission and acetate: propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *Journal of animal science*, **86**: 384-389.
 12. Dawson, K. 1992. Current and future role of yeast culture in animal production: A review of research over the past six years. In: Proceedings of Alltech's 8th annual symposium, Nicholasville, Kentucky. p 1-23.
 13. del Palacio, A., Bettucci L., and Pan D. 2016. Fusarium and Aspergillus mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. *Brazilian journal of microbiology*, **47**: 1000-1005.
 14. Denli, M., Blandon J., Guynot M., Salado S., and Perez J. 2009. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poultry Science*, **88**: 1444-1451.
 15. Denman, S. E., Tomkins N. W., and McSweeney C. S. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response
- ۱- مروی ع، طیبی م، یزدان ستاد س، نادری م، خالدی م، پور شهبازی غ. و محمودی کوهی ا. ۱۳۹۷. بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه های فارچی آسپرژیلوس تولید کننده آفلاتوکسین. *تحقیقات دامپزشکی و فراورده های بیولوژیک*. ۱۲۰: ۳۸-۴۳.
 - ۲- نعمتی ذ، جانمحمدی ح، تقی زاد ا، ملکی نژاد ح. و مقدم غ. ۱۳۹۴. تاثیر جاذب طبیعی بنتونیت در کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین B₁ بر عملکرد و سیستم ایمنی در جوجه های گوشتی. *تحقیقات تولیدات دامی*. سال ۴ شماره ۳. ۶۷-۷۷.
 - ۳- نعمتی، ذ، صفری ر، بشارتی م، کامرانی ن. و شیخلو م. ۱۳۹۹. اثر آفلاتوکسین B₁ بر قابلیت هضم و فراسنجه های تخمیری شکمبه ای جیره غذایی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی. *پژوهشهای تولیدات دامی*. ۱۱(۲۸): ۷۵-۸۳.
4. Beauchemin, K., Kreuzer M., O'mara F., and McAllister T. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **48**: 21-27.
 5. Belanche, A., Ramos-Morales E., Newbold C. J., and agriculture. 2016 . In vitro screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Journal of the science of food*, **96**: 3069-3078.
 6. Benchaar, C., McAllister T., and Chouinard P. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or Yucca schidigera saponin extracts. *Journal of Dairy Science*, **91**: 4765-4777.
 7. Bennett, D., Yee A., Rhee Y.-J., and Cheng K. 201 .Effect of diatomaceous earth on parasite load, egg production, and egg quality of free-range organic

- methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, **47**: 421-426.
24. Hashemi, M., Gholampour Azizi I., Rezai Z., and Rouhi S. 2012. Mycological survey and total aflatoxin analyze in silage from Qaemshahr City (Northern Iran). *Journal of Chemical Health Risks*, **2**:51-56.
 25. Hegarty, R., Bird S. H., Vanselow B., and Woodgate R. 2008. Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. *British Journal of Nutrition*, **100**: 1220-1227.
 26. Helferich, W. G., Garrett W., Hsieh D., and Baldwin R. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *Journal of animal science*, **62**: 691-696.
 27. Hu, W.-L., Liu J.-X., Ye J.-A., Wu Y.-M., Guo Y.-Q., and Technology. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science*, **120**: 333-339.
 28. Huang, X., Liang J., Tan H., Yahya R., Ho Y., and Technology. 2011. Effects of Leucaena condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production. *Animal Feed Science*, **166**: 373-376.
 29. Isikber, A. A., and Athanassiou C. G. 2015. The use of ozone gas for the control of insects and micro-organisms in stored products. *Journal of Stored Products Research*, **64**: 139-145.
 30. Jiang, Y. et al. 2018. Effect of adding clay with or without a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on the health and performance of lactating dairy cows challenged with dietary aflatoxin B₁. *Journal of Dairy Science*, **101**: 3008-3020.
 31. Jiang, Y., Yang H., Lund P., and technology. 2012. Effect of aflatoxin B₁ on in vitro ruminal fermentation of to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS microbiology ecology*, **62**: 313-322.
 16. Eevers, N., Van Hamme J. D., Bottos E. M., Weyens N., and Vangronsveld J. 2015. Draft genome sequence of *Methylobacterium radiotolerans*, a DDE-degrading and plant growth-promoting strain isolated from Cucurbita pepo. *Genome Announc.*, **3**: e00488-00415.
 17. Fernandez, M., Woodward B., and Stromberg B. 1998. Effect of diatomaceous earth as an anthelmintic treatment on internal parasites and feedlot performance of beef steers. *Animal Science*, **66**: 635-641.
 18. Fink-Gremmels, J., and van der Merwe D. 2019. Mycotoxins in the food chain: contamination of foods of animal origin Chemical hazards in foods of animal origin. p 1190-1198. Wageningen Academic Publishers.
 19. Flachowsky, G., Lebzien P., and Technology. 2009. Comments on in vitro studies with methane inhibitors. *Animal Feed Science*, **3**: 337-339.
 20. Frazzoli, C., Gherardi P., Saxena N., Belluzzi G., and Mantovani A. 2017. The hotspot for (global) one health in primary food production: Aflatoxin M₁ in dairy products. *Frontiers in public health*, **4**: 294.
 21. Getachew, G., DePeters E., and Robinson P. 2004. In vitro gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *California Agriculture*, **58**: 54-58.
 22. Gnonlonfin, G. J. B., Hell K., Adjovi Y., Fandohan P., Koudande D., Mensah G., Sanni A., Brimer L., and nutrition. 2013. A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: a sub-Saharan African perspective. *Critical reviews in food science*, **53**: 349-365.
 23. Guo, Y., Liu J. X., Lu Y., Zhu W., Denman S., and McSweeney C. 2008. Effect of tea saponin on

- Khazraeinia P., Farkhoy M., Masoumi Z., and Agriculture. 2008. Effect of diatomaceous earth on the performance and blood variables of broiler chicks during experimental aflatoxicosis. *Journal of the Science of Food*, **88**: 626-632.
41. Mojtahedi, M., Mesgaran M. D., Vakili S. A., and Hayati-Ashtiani M. 2013. Effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen microbial fermentation responses using batch culture. *Annual Research Review in Biology*: 686-693.
 42. Nemati, Z., Janmohammadi H., Taghizadeh A., Moghaddam G., and Maleki Nejad H. 2014. Effect of bentonite supplementation to the contaminated diets with aflatoxin B1 on broiler performance. In: 6th Iranian congress on animal science, Tabriz
 43. Nemati, Z., Karimi A., and Besharati M. 2015. Impact of Aflatoxin Contaminated Feed and Yeast Cell Wall Supplementation on Immune System in Broiler Chickens. In: Proceedings of International Conference on Innovations in Chemical & Agricultural Engineering. p 8-9.
 44. Ørskov, E., and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, **92**: 499-503.
 45. Patra, A. K., and Assessment. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring*, **184**: 1929-1952.
 46. Peng, W.-X., Marchal J., and Van der Poel A. 2018. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Animal Feed Science and Technology*, **237**: 129-153.
 - rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Animal feed science technology*, **175**: 85-89.
 32. Lee, J., Her J.-Y., and Lee K.-G. 2015. Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food chemistry*, **189**: 45-51.
 33. Makkar, H. P. 2010. In vitro screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. p 107-144. Springer.
 34. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical journal*, **43**: 99.
 35. McGinn, S., Beauchemin K., Coates T., and Colombatto D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of animal science*, **82**: 3346-3356.
 36. Menke, K., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, **93**: 217-222.
 37. Menke, K., and Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro.
 38. Menke, K. H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research and development*, **28**: 7-55.
 39. Menke, K. H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research*, **28**: 7-55.
 40. Modirsanei, M., Mansoori B., Khosravi A. R., Kiaei M. M.,

- Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands.
55. Subramanyam, B., and Roesli R. 2000. Inert dusts. Bh. Subramanyam DW Hagstrum Alternatives to pesticides in stored-product IPM 2000. 321-380. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands.
 56. Vercoe, P. E., Makkar H. P., and Schlink A. C. 2010. In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer.
 57. Vijayanandraj, S., Brinda R., Kannan K., Adhithya R., Vinothini S., Senthil K., Chinta R. R., Paranidharan V., and Velazhahan R. 2014. Detoxification of aflatoxin B1 by an aqueous extract from leaves of *Adhatoda vasica* Nees. *Microbiological research*, **169**: 294-300.
 58. Vila-Donat, P., Marín S., Sanchis V., and Ramos A. 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chemical Toxicology*, **114**: 246-259.
 59. Viridis, S., Scarano C., Spanu V., Murittu G., Spanu C., Ibba I., and De Santis E. P. L. 2014. A survey on Aflatoxin M1 content in sheep and goat milk produced in Sardinia Region, Italy (2005-2013). *Italian journal of food safety*, **3**.
 60. Wang, B., Mahoney N. E., Pan Z., Khir R., Wu B., Ma H., and Zhao L. 2016. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. *Food Control*, **59**: 461-467.
 61. Westlake, K., Mackie R. I., Dutton M., and Technology. 1989. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Animal Feed Science*, **25**: 169-178.
 47. Pierron, A., Alassane-Kpembi I., and Oswald I. P. 2016. Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. *Animal nutrition*, **2**: 63-68.
 48. Richard, E., Heutte N., Bouchart V., and Garon D. 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, **148**: 309-320.
 49. Schmidt, P., Novinski C., Junges D., Almeida R., and De Souza C. 2015. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: a farm survey using infrared thermography. *Journal of Dairy Science*, **98**: 6609-6619.
 50. Sen, Y., Onal-Ulusoy B., Mutlu M., and Technologies E. 2019. Detoxification of hazelnuts by different cold plasmas and gamma irradiation treatments. *Innovative Food Science*, **54**: 252-259.
 51. Serra, M. S., Pulles M. B., Mayanquer F. T., Vallejo M. C., Rosero M. I., Ortega J. M., Naranjo L. N., and Environment. 2018. Evaluation of the use of gamma radiation for reduction of aflatoxin B1 in corn (*Zea mays*) used in the production of feed for broiler chickens. *Journal of Agricultural Chemistry*, **7**: 21-33.
 52. Shanakhat, H., Sorrentino A., Raiola A., Romano A., Masi P., Cavella S., and Agriculture. 2018. Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the science of food*, **98**: 4003-4013.
 53. Subramanyam, B. 1993. Chemical composition of Insecto. *St. Paul: MN: University of Minnesota. Report of Department of Entomology*.
 54. Subramanyam, B., and Roesli R. Inert dusts. Bh. Subramanyam DW Hagstrum Alternatives to pesticides in stored-product IPM 2000. 321-380.

62. WHO, I. A. f. R. o. C. 1986. IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Silica and Some Silicates, 42.

Effect of diatoms on the fermentation parameters and digestibility of contaminated diet with aflatoxin B₁ by microorganisms isolated from rumen in vitro condition

Rashid Safari¹ Zabihollah Nemati^{*2}, Namdar Kamrani³, Amir Karimi¹

1-Assistant Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tabriz, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tabriz, Iran.

3- MSc student of Animal science, University of Tabriz, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tabriz, Iran.

Received: 16 March 2020

Accepted: 21 October 2020

Abstract

The present study investigated the effect of different levels of diatoms on the in vitro fermentation parameters, dry matter and organic matter digestibility of contaminated diet with aflatoxin B₁. This experiment was conducted in a completely randomized design with 5 treatments and 4 replicate per treatment. The treatments were: 1. Control, 2. Control with methanol 3. Contaminated diet with methanol solution containing aflatoxin B₁ at 800 ng/ml, 4, 5 and 6. Contaminated diet treated with diatoms at 7, 75 and 150 mg/200mg, respectively. Glass bottles with a volume of 100 ml was used in a constant culture to measure gas production and digestibility. All bottles were purged with anaerobic CO₂, sealed with rubber stoppers and incubated in a water bath for 96 h at 39 °C. Culture parameters were measured at different time of incubation. The results showed that the lowest organic and dry matter digestibility value and highest ammonia concentration were related to treatment containing aflatoxin B₁ ($p < 0.05$). Aflatoxin caused reduction of gas production parameters, metabolisable energy and VFA compared to control groups. Addition of diatoms at medium and low level (7 and 75 mg/200mg) improved digestibility of dry matter and organic matter compared to aflatoxin group ($p < 0.05$). Cultures containing low level of diatoms also was improved partitioning factor, microbial mass production and efficiency of microbial mass ($p < 0.05$). In conclusion diatoms as feed additive showed promising potential in vitro to improve detrimental effect of aflatoxin on rumen function, therefore more research is guaranteed to investigate their mode of action in the ruminal microbial ecosystem.

Keywords: Aflatoxin, partitioning factor, diatoms, gas production, organic matter digestibility

*Corresponding author: Zabihollah Nemati,

Address: Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tabriz, Iran.

Tel: +984144237717

Email: znemati@tabrizu.ac.ir