



مقاله علمی - پژوهشی

ارزیابی تأثیر متقابل آفاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی

محسن مجتهدی^{*۱} - محسن دانش مسگران^۲ - مجید حیاتی آشتیانی^۳ - سید علیرضا وکیلی^۴ - سید مرتضی وقار سیدین^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۲

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر متقابل آفاتوکسین B1 (AFB1) و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی پژوهشی در قالب دو آزمایش انجام گرفت. در آزمایش اول ابتدا تأثیر مقادیر مختلف AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم با استفاده از روش کشت ثابت بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز، پتانسیل تولید گاز، غلظت نیروژن آمونیاکی و قابلیت هضم کاهش یافت، ولی افزودن AFB1 به محیط کشت تأثیری بر pH نداشت. در آزمایش دوم تأثیر متقابل AFB1 و سه نوع جاذب آلومینوسیلیکاته شامل مگاباند، میکوباند و میلپاند (در سطح ۶ درصد ماده خشک جیره) بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه با استفاده از روش کشت ثابت بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بر خلاف انتظار، هیچکدام از جاذب‌ها نتوانستند تأثیرات منفی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه ای در شرایط برون‌تنی را خنثی نموده و یا کاهش دهند که احتمالاً به دلیل مکانیسم جذب سطحی جاذب‌های آلومینوسیلیکاته برای جذب AFB1 باشد. نتایج این پژوهش بیان می‌کند که جاذب‌ها نمی‌توانند اثرات منفی AFB1 بر گوارش و تخمیر شکمبه را کاهش دهند و تنها راهکار پیشنهادی برای کاهش اثرات منفی AFB1 بر تخمیر، جلوگیری از ورود این سموم به خوراک دام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آفاتوکسین، برون‌تنی، تخمیر شکمبه‌ای، جاذب آلومینوسیلیکاته.

مقدمه

آفاتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات بسیار سمی از دسته میکوتوکسین‌ها هستند که دارای اثرات سمی، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی می‌باشند. آفاتوکسین B1 (AFB1) بخش عمده آفاتوکسین‌ها را تشکیل داده و به‌عنوان قوی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی شناخته می‌شود (۲۶). هنگامی که خوراک‌های آلوده به آفاتوکسین به حیوانات شیرده داده می‌شود،

متابولیتی از آفاتوکسین به نام M1 در شیر ترشح می‌شود. از آنجا که پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و فرآوری شیر بر بقا و کاهش سمیت AFM1 تأثیر زیادی ندارد، این سم سرانجام به فرآورده‌های مختلف لبنی انتقال می‌یابد و سلامت مصرف‌کنندگان را به خطر می‌اندازد. در کنار تأثیرات منفی میکوتوکسین‌ها بر سلامتی و محصولات تولیدی دام، این ترکیبات احتمالاً بر هضم، متابولیسم و جمعیت‌های میکروبی شکمبه نیز موثر خواهند بود. حد مجاز AFB1 در خوراک برابر ۵ میکروگرم در کیلوگرم و مقدار آفاتوکسین‌های مخلوط (B1، B2، G1 و G2) ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم عنوان شده است (۲۰). از طرفی حد مجاز آفاتوکسین M1 در ایالات متحده آمریکا ۵۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم است، که در ایران نیز همین میزان به‌عنوان مقدار استاندارد این توکسین در شیر در نظر گرفته می‌شود (۲۰).

در نشخوارکنندگان (به‌ویژه گاوهای شیرده) تغذیه شده با خوراک آلوده به AFB1 مشکلات سلامتی از قبیل سرطان کبد، تضعیف سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های تولیدمثلی، ناقص‌الخلقه‌زایی، کاهش مصرف خوراک و تولید شیر بروز می‌کند همچنین مشخص شده است

۱-استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲-استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳-استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه کاشان

۴-انتشار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۵-دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه بیرجند

*- ایمیل نویسنده مسئول:

mojtahedi@birjand.ac.ir

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75843

گاز با افزودن AFB1 کاهش یافت و این ممانعت از تولید گاز را بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه تحت تأثیر AFB1 عنوان نمودند. تاکنون مطالعه جامعی امکان کاهش اثرات منفی AFB1 بر تخمیر و هضم میکروبی شکمبه را بررسی نکرده است. بنابراین هدف از این آزمایش ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: تأثیر آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

در آزمایش اول تأثیر سطوح مختلف AFB1 شامل صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم با استفاده از روش کشت ثابت بررسی شد. برای تهیه محلول AFB1 ویال حاوی ۵ میلی‌گرم AFB1 خالص (کد ۶۶۳۶ شرکت Sigma-Aldrich) را با استفاده از متانول را با استفاده از متانول و آب مقطر دوبار تقطیر رقیق کرده تا محلول‌هایی به غلظت‌های ۱۵/۳، ۳۰/۶ و ۴۵/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر از AFB1 بدست آید.

مایع شکمبه قبل از خوراک وعده صبح از ۳ راس گاو نر هلهستاین دارای فیستولای شکمبه ای (تغذیه دو بار در روز و در سطح نگهداری با جیره حاوی ۷۰ درصد علوفه و ۳۰ درصد کنسانتره) گرفته شد و بلافاصله توسط ۴ لایه پارچه متقال صاف گردید و به سرعت در فلاسک‌های حاوی آب گرم (حدود ۳۸ درجه سانتی‌گراد)، به آزمایشگاه منتقل شد. سپس مایع شکمبه گرفته شده از سه گاو به نسبت مساوی با هم مخلوط شده و تا قبل از شروع انکوباسیون، در داخل حمام آب گرم ۳۹ درجه و در زیر جریان مداوم گاز دی اکسید کربن قرار گرفت.

در این آزمایش انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۵) انجام شد. تولید گاز بر اساس روش تئودور و همکاران (۳۹) و با استفاده از بطری‌های شیشه‌ای میلی‌لیتری مخصوص و فشارسنج اندازه‌گیری گردید. بدین منظور ۵۰۰ میلی‌گرم از خوراک پایه (جدول ۱) به داخل شیشه‌ها ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۱:۲) اضافه شد. لازم به ذکر است که خوراک پایه و مایع شکمبه مورد استفاده فاقد آفلاتوکسین بود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول‌های AFB1 مختلف تهیه شده در مرحله قبل به هر ویال افزوده شد تا غلظت‌های ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم AFB1 در میلی‌لیتر محیط کشت، بدست آید. همچنین یک میلی‌لیتر از متانول رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر به شیشه‌های تیمار صفر AFB1،

که آفلاتوکسین در نشخوارکنندگانی مثل گاو و گوساله باعث کوری، راه رفتن چرخشی و دایره وار، دندان قروچه، دهان کف آلود، التهاب قریبه و پلک چشم، بیقراری، راه رفتن روی مفصل خرگوشی، اسهال، سقط جنین، تشنج و به دنبال آن زمین‌گیر شدن و در نهایت باعث مرگ می‌شود و از علائم کالبد شکافی می‌توان به افزایش آنزیم‌های کبدی اشاره کرد (۱۵، ۲۷). شدت بروز سمیت و بیماری ناشی از آفلاتوکسین‌ها به مقادیر سم، مدت تغذیه و وجود دیگر تنش‌های اثرگذار بر حیوان، بستگی دارد. با این وجود تشخیص بیماری‌های ناشی از مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسیکوزیس به دلیل نداشتن علائم اختصاصی، مشکلات و هزینه‌های خاص نمونه‌گیری و آنالیز خوراک و برهم کنش با دیگر فاکتورهای تنش، مشکل می‌باشد.

برای غیرفعال کردن و یا کاهش اثرات آفلاتوکسین‌ها روش‌های زیادی بررسی شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها شامل جداسازی فیزیکی، غیر فعال کردن توسط حرارت، اشعه‌دهی، استخراج توسط حلال، تخریب شیمیایی، غیر فعال کردن توسط میکرب‌ها و تخمیر می‌باشد. روش‌های فوق تاحدودی قادر به غیرفعال کردن و کاهش آفلاتوکسین‌ها می‌باشند اما عمدتاً به دلیل ایجاد باقیمانده‌ها (کاهش ایمنیت) و کاهش کیفیت مواد غذایی، روش‌هایی عملی و قابل‌قبول نبوده‌اند. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که آسان‌ترین، عملی‌ترین و ارزان‌ترین شیوه در کاهش بروز اختلالات مربوط به سموم قارچی یا جلوگیری از ورود این سموم در شیر و محصولات دامی استفاده از مواد جاذب یا مواد کمپلکس‌کننده در خوراک می‌باشد. ترکیبات جاذب مختلفی برای کاهش جذب آفلاتوکسین در خوراک و دستگاه گوارش حیوانات اهلی و به‌ویژه گاوهای شیرده استفاده شده‌اند، اما پرکاربردترین ترکیبات جاذب، ترکیبات معدنی آومینوسیلیکاتی مانند بنتونیت‌ها هستند. بنتونیت‌ها ترکیبات نانوساختار و نانوحفره رسی هستند که ساختار کریستالی لایه ای داشته و در جذب مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسین‌ها کاربرد دارند. همچنین مونتموریلونیت کانی نانو ساختار و نانو حفره‌ای آومینوسیلیکاتی (فیلولوسیلیکاتی) ۲:۱ لایه‌ای (T:O:T) است که فاز غالب تشکیل دهنده بنتونیت‌هاست و کلیه خواص و مشخصات بنتونیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هاروی و همکاران (۱۵) گزارش نمودند که افزودن مقادیر مختلف آومینوسیلیکات (HSCAS) به جیره‌های حاوی ۲۰۰ قسمت در بیلیون AFB1 منجر به کاهش ۲۴ درصدی در ترشح AFM1 شده است. استفاده از بنتونیت جهت جذب آفلاتوکسین برای اولین بار توسط ماسیمانگو و همکاران (۲۳) آزمایش شد. این محققین مشاهده کردند که افزودن ۲ درصد از چندین نوع بنتونیت در چندین محلول بافری باعث جذب ۴۰۰ میکروگرم AFB1 در دامنه ۹۴ تا ۱۰۰ درصد گردید. جیانگ و همکاران (۱۹) و همچنین هلفریچ و همکاران (۱۶ و ۱۷) با بررسی سطوح مختلف AFB1 بر تولید گاز در شرایط برون تنی گزارش کردند که فراسنجه‌های تولید

اساس کیلوپاسکال اندازه‌گیری شد و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (۱ اتمسفر و دمای صفر درجه سانتی‌گراد) تبدیل شد. این روش انکوباسیون در ۲ نوبت (و ۸ تکرار برای هر تیمار در هر نوبت) انجام شد و در هر نوبت، سه شیشه فاقد نمونه خوراک جهت تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمه و بافر، مورد انکوباسیون قرار گرفت.

افزوده شد. سپس با تزریق گاز دی‌اکسید کربن به داخل شیشه‌ها، محیط داخل شیشه بی‌هوای گردید و سپس درب شیشه‌ها فوراً با استفاده از درپوش‌های لاستیکی و کپ‌های آلومینیومی پرس گردید. سپس شیشه‌ها در بن ماری شیکردار ۱۲۰ لیتری در شرایط دمایی (دمای ۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد) و فیزیکی شبیه سازی شده بر اساس شرایط شکمه دام تحت انکوباسیون قرار گرفتند و تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و بر

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره پایه (درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredient and chemical composition of the main diet (% of Dry matter)

اجزا Ingredient	مقدار amount
علف خشک یونجه Alfalfa hay	15.0
سیلاژ ذرت Corn silage	30.0
دانه جو Barley grain	14.0
دانه ذرت Corn grain	10.0
کنجاله سویا Soybean meal	10.0
کنجاله تخم پنبه Cottonseed meal	8.0
سیوس گندم Wheat bran	7.0
پودر گوشت Meat powder	3.0
پودر چربی Fat powder	1.2
نمک salt	0.2
مکمل مواد معدنی و ویتامینی Mineral and vitamin supplements	1.6
ترکیب شیمیایی جیره	
Chemical composition of diet	
انرژی خالص شیردهی (مگا کالری در کیلوگرم) Net energy for lactation (Mcal/kg)	1.58
پروتئین خام (درصد) Crude protein	16.2
چربی خام (درصد) Crude fatty	3.8
کربوهیدرات غیر الیافی (درصد) NFC	40.8
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد) ADF	20.3
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد) NDF	33.8

مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۱:۲) اضافه شد. سپس مقدار ۳۰ میلی گرم از جاذب‌های مختلف توزین شده و به شیشه‌های مورد نظر حاوی ماده خوراکی اضافه شد. از طرف دیگر یک میلی لیتر از محلول AFB1 با غلظت ۳۰/۶ به شیشه‌های مورد نظر تزریق شد (تا غلظت ۶۰۰ نانوگرم از AFB1 در میلی لیتر محیط کشت بدست آید) و یک میلی لیتر از آب متانولی رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر به شیشه‌های تیمارهای فاقد AFB1، افزوده شد. سایر مراحل انکوباسیون و نمونه‌گیری مشابه به آزمایش اول بود.

آنالیز شیمیایی نمونه‌ها

غلظت نیتروژن آمونیاکی در نمونه‌های مایع کشت بر اساس روش رنگ سنجی و بر طبق پروتکل برودریک و کانگ (۶) اندازه‌گیری شد. اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Philips- PU4410) و بر طبق پروتکل اوتنستین و بارتلی (۲۸) آنالیز شدند. در این دستگاه از ستونی (PEG۱۰) با طول ۴۵ متر (با قطر ۰/۴۵ میلی متر) استفاده شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده شد و در دمای اولیه و پایانی به ترتیب روی ۵۵ و ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای دتکتور (FID) و انژکتور نیز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. کرونیک اسید (۷:۱ حجمی) به‌عنوان استاندارد داخلی به تمامی نمونه‌ها تزریق شد.

معادلات و روش‌های آماری

از مدل نمایی با فاز تأخیر شوفیلد (۳۶) برای برآزش داده‌های تولید گاز با به کارگیری روش مقایسات گوسن - نیوتن در رویه NLIN نرم افزار آماری SAS (۳۵) به شیوه رگرسیون غیر خطی استفاده گردید.

$$P = v(1 - \exp(-k(t - lag)))$$

در این مدل P گاز تولیدی در زمان t، v گاز مرتبط با سوبسترای دارای پتانسیل تخمیر، k نرخ تولید گاز در زمان و lag با مفهوم زمان مربوط به فاز تأخیر به کار رفت.

فراسنجه‌های تولید گاز و سایر نتایج (غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار و قابلیت هضم ماده خشک) با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (۳۵) و طرح کاملاً تصادفی به‌صورت زیر مورد تجزیه آماری قرار گرفت. میانگین مشاهدات توسط Lsmeans در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفتند. مدل آماری طرح به این صورت بود:

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

که در این مدل Y_{ij} : مشاهده i در تیمار j، μ : میانگین کل مشاهدات، T_i : اثر تیمار i و e_{ij} : خطای تصادفی در نظر گرفته شد.

برای تعیین pH محیط کشت، نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار محیط کشت و همچنین محاسبه قابلیت هضم ماده خشک به روش برون‌تنی، پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۴ شیشه کشت از هر تیمار را برداشته و به منظور متوقف کردن فعالیت میکروبی، شیشه‌ها بلافاصله به داخل ظرف آب سرد منتقل گردید. سپس به ترتیب شیشه‌ها باز شدند و pH محیط کشت با استفاده از pH متر دیجیتال (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) ثبت گردید. سپس محتویات شیشه‌ها با دقت به فالکون‌های ۵۰ منتقل شد و فالکون‌ها در دمای ۴ درجه و سرعت $1000 \times g$ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲ میلی لیتر از مایع‌رویی هر فالکون با ۲ میلی لیتر از محلول ۰/۲ نرمال اسید کلریدریک مخلوط شده و جهت آنالیز نیتروژن آمونیاکی بعدی، در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند. علاوه بر این ۲ میلی لیتر دیگر از مایع‌رویی هر فالکون نمونه‌گیری و جهت آنالیز اسیدهای چرب فرار، منجمد و نگهداری شدند. در نهایت برای محاسبه قابلیت هضم ماده خشک، مایع‌رویی باقیمانده هر فالکون به آرامی تخلیه و پلت باقیمانده در کف، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید تا مقدار ماده خشک باقیمانده تعیین گردد.

آزمایش دوم: تأثیر متقابل افلاتوکسین B1 و جاذب‌های آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه

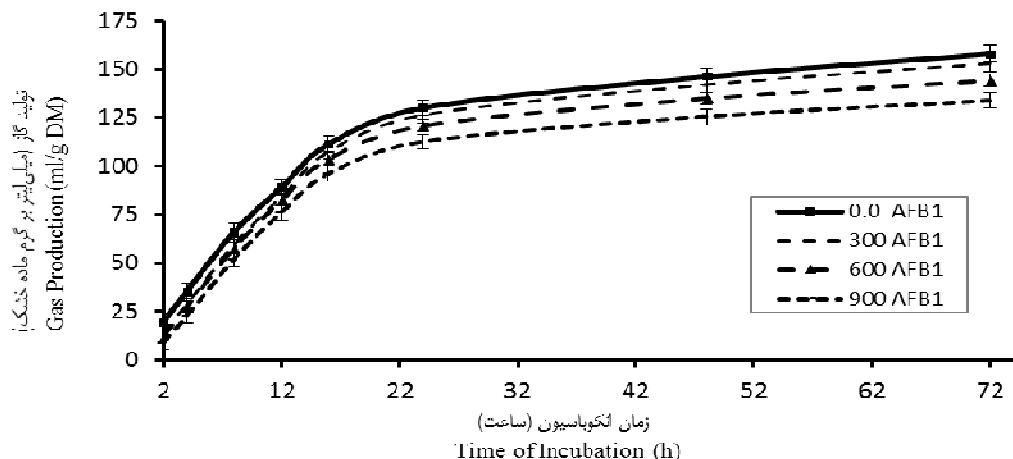
در این بخش از آزمایش کارایی سه جاذب آلومینوسیلیکاته با ساختار پایه بنتونیت سدیم بر سمیت‌زدایی AFB1 مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این مرحله از ۳ نوع جاذب با ساختار پایه آلومینوسیلیکاته، استفاده شد. جاذب میل‌باند (MilBond) به‌عنوان جاذب تجاری محصول شرکت Milwhite آمریکا انتخاب و تهیه گردید. جاذب‌های بومی با نام‌های تجاری مگا‌باند (MegaBond) و مایکوباند (MycoBond) از شرکت دانش بنیان مگافراور تهیه شدند. در ابتدا به‌منظور یکنواختی، نمونه‌های مختلف جاذب با استفاده از الک با اندازه منافذ $105 \mu m$ (الک شماره ۱۴۰) غربال شدند و ذرات کوچکتر از این اندازه برای انجام آزمایش جداسازی گردید.

در این مرحله تیمارهای آزمایشی شامل افزودن جاذب‌های آلومینوسیلیکاته (۶ درصد ماده خشک خوراک پایه)، با و بدون افزودن AFB1 (به مقدار ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت) در روش کشت ثابت بودند. در این مرحله نیز انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۵) انجام شد. بدین منظور ۵۰۰ میلی گرم از خوراک پایه داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی لیتری مخصوص، ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی لیتر از

نتایج و بحث

تأثیر مقادیر افزایشی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت اسیده‌های چرب فرار و قابلیت هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی در جدول ۲ و شکل ۱ آورده شده است. نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 به محیط کشت، نرخ تولید گاز و پتانسیل تولید گاز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$)، به‌طوری که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز از ۰/۱۳۴ به ۰/۰۹۲ میلی‌لیتر در ساعت و پتانسیل تولید گاز از ۱۶۰/۷ میلی‌لیتر به ۱۳۱/۳ کاهش یافت، ولی تفاوت معنی‌داری بین مقادیر صفر و ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. علاوه بر

این فاز تاخیر تولید گاز به‌طور معنی‌داری با افزایش AFB1، افزایش یافت ($P < 0.05$) و از ۰/۰۷ ساعت در مقدار صفر AFB1 به ۱/۳۹ ساعت در بالاترین مقدار تزریق AFB1 افزایش یافت، با این وجود تفاوت معنی‌داری بین مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 مشاهده نشد. مشابه با نتایج بدست آمده در این آزمایش، جیانگ و همکاران (۱۹) و همچنین هلفریچ و همکاران (۱۶، ۱۷) گزارش کردند که فراسنجه‌های تولید گاز با افزودن AFB1 کاهش یافت و این مانع از تولید گاز بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه تحت تأثیر AFB1 می‌باشد.



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 (صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) بر الگوی تولید گاز
 Figure 1- Effect of different levels of aflatoxin B1 (0, 300, 600 and 900 ng/ml) on gas production pattern

در نتیجه‌ی اختلال در فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه از طریق کاهش هضم فیبر و کاهش تولید اسیده‌های چرب فرار باشد (۱۳، ۱۶، ۱۷).

نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت، به‌طوری که کمترین غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 (به ترتیب ۱۵/۲ و ۱۵/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) مشاهده شد. نتایج بدست آمده در این آزمایش درباره غلظت نیتروژن آمونیاکی، تا حدود زیادی با نتایج دیگر محققان (۱۳، ۱۹، ۳۷) مطابقت دارد. این پژوهشگران گزارش کردند که افزودن AFB1 در یک سیستم شکمبه مصنوعی موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید. آفلاتوکسین B1 ممکن است سنتز پروتئین میکروبی را مختل کرده و احتیاجات میکروب‌ها به مواد مغذی را افزایش دهد (۱۲) در شکمبه، پروتئین خوراک معمولاً توسط میکروارگانیسم‌ها هیدرولیز و آمین‌زدایی شده و

افزودن AFB1 به محیط کشت تأثیری بر pH آن نداشت، ولی قابلیت هضم ماده خشک به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) با افزایش غلظت AFB1 کاهش یافت (جدول ۲). قابلیت هضم ماده خشک در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت از ۰/۵۹۳ در تیمار فاقد AFB1 به ۰/۵۵۴ در تیمار حاوی ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 رسید ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی صفر و ۳۰۰ و همچنین بین تیمارهای حاوی ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. نتایج گزارش شده در مورد تأثیر AFB1 بر قابلیت هضم ماده خشک متناقض است. نتایج این آزمایش یافته‌های وستلیک و همکاران (۴۱) را تایید می‌نماید. فهر و دلاگ (۱۳) و اسکودامور و لایوزی (۳۷) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش هضم سلولز شد. از طرف دیگر جیانگ و همکاران (۱۹) و پترسون و کسلینگ (۳۰) گزارش کردند که افزودن AFB1 بر قابلیت هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی، تأثیری نداشت. در آزمایش حاضر کاهش مشاهده شده در قابلیت هضم ماده خشک در اثر افزودن AFB1 می‌تواند

استفاده شده توسط فهر و دلاگ (۱۳)، ۲۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه به مدت ۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت، درحالی‌که پترسون و کسلینگ (۳۰) از یک میلی‌لیتر مایع شکمبه به همراه سوبسترا و به مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون، استفاده کردند. مدت زمان انکوباسیون طولانی و مقدار کم مایع شکمبه اولیه می‌تواند منجر به جمعیت میکروبی محدود و انتخاب شده ای گردد که ممکن است نشان دهنده شرایط واقعی شکمبه نباشد. به علاوه اینکه تخمیر طولانی مدت می‌تواند موجب محو شدن نتایج بدست آمده در سیستم‌های کشت برون تنی گردد، زیرا تفاوت‌های اولیه در نرخ و مقدار هضم از بین خواهد رفت. از طرف دیگر تقریباً به‌طور قطع می‌توان گفت که برخی از دیگر عوامل ضد میکروبی و مایکوتوکسین‌ها، علاوه بر AFB1، و همچنین برخی از مایکوتوکسین‌های غیر قابل تشخیص در خوراک و یا عصاره‌های خام اسپرژیلوس فلاووس مورد استفاده، وجود دارد. این عامل می‌تواند تفاوت در اثرات مشاهده شده در مطالعات با خوراک آلوده شده طبیعی در مقایسه با آزمایشات با مایکوتوکسین‌های خالص را توضیح دهد (۲۱، ۲۲).

به‌طور کلی در این آزمایش افزودن AFB1 موجب کاهش تولید گاز (نرخ و کل تولید گاز)، کاهش قابلیت هضم خوراک و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی گردید که این نتایج می‌تواند بیانگر اثرات منفی و ممانعت کنندگی AFB1 بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد. مایر و همکاران (۲۵) مشاهده کردند که آفلاتوکسین باعث مهار کشت‌های خالص استرپتوکوکوس بویس و مخلوط باکتری‌های شکمبه می‌گردد. اگرچه که مقدار مصرفی AFB1 در این آزمایش (۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، بسیار بیشتر از مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار در شکمبه حیوانات تغذیه شده با AFB1 می‌باشد، دیگر محققان ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها در مقادیر بسیار کمتر را نیز مشاهده کرده‌اند. بورمیستر و هسلتاین (۷) از عصاره خام آفلاتوکسین شامل ۳۶ درصد کل آفلاتوکسین و ۲۴ درصد AFB1 استفاده کردند و حساسیت باکتری‌ها را نسبت به آفلاتوکسین‌ها بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که از ۳۲۹ میکروارگانیسم آزمایش شده، رشد ۱۲ گونه از باسیلوس‌ها، یک گونه از کلستریدیوم و یک گونه از استرپتومایسس تحت تأثیر آفلاتوکسین محدود می‌شود. نتایج آزمایشات دیگر ثابت کرد که AFB1 عامل اصلی تأثیرات ضد میکروبی مشاهده شده توسط عصاره خام آفلاتوکسین می‌باشد. با فرض اینکه AFB1 عامل اصلی اثرات ضد میکروبی در عصاره‌های خام آفلاتوکسین می‌باشد، بورمیستر و هسلتاین (۷) ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها را با ۷-۸ میکروگرم AFB1 بر میلی‌لیتر، مشاهده کردند. از آنجا که نشان داده شده که چندین گونه باکتریایی با غلظت‌های کمتر از ۱۰ میکروگرم AFB1 بر میلی‌لیتر، به‌صورت کامل ممانعت می‌شوند، منطقی خواهد بود اگر فرض کنیم که رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه

در نهایت پپتیدها و آمونیاک آزاد را تشکیل می‌دهد (۳۲) حال اگر هضم و متابولیسم پروتئین خوراک توسط AFB1 مهار گردد، غلظت آمونیاک آزاد در شکمبه کاهش خواهد یافت. مقدار آمونیاک آزاد در شکمبه نتیجه‌ی تعادل بین هیدرولیز پروتئین (تولید آمونیاک) و جذب و مصرف آن (توسط شکمبه و میکروب‌ها) است (۳۲). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش AFB1 در مطالعه حاضر، ممکن است به دلیل اثرات منفی AFB1 بر میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه مهار یا محدود شدن مسیر هیدرولیز یا آمین‌زدایی پروتئین (کاهش آزادسازی آمونیاک از خوراک)، باشد.

در این آزمایش، غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش مقدار AFB1 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$)، اما نسبت مولی اسیدهای چرب فرار شامل استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات و ایزووالرات تحت تأثیر مقدار AFB1 قرار نگرفتند ($P > 0.05$) که با نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی، تاحدی متناقض است. ادزینگتون و همکاران (۱۲) تفاوتی در غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه بره‌های در حال رشد تغذیه شده با ۲/۵ میلی‌گرم AFB1 در کیلوگرم جیره مشاهده نکردند. هلفریچ و همکاران (۱۶) نیز گزارش کردند که افزودن ۶۰-۶۰۰ میکروگرم در کیلوگرم AFB1 به جیره گوساله‌های نر، تأثیری بر تولیدی اسیدهای چرب فرار نداشت. در آزمایشی دیگر تغذیه ۰/۷۱۴ میکرومول AFB1 به بزهای شیرده، بر تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه ای تأثیری نگذاشت (۱۷). در مقابل، هضم سلولز، تولید اسیدهای چرب فرار، غلظت نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پروتئین‌ها با تغذیه ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنی AFB1 به گوساله‌های نر و در شرایط آفلاتوکسیکوز حاد گاوی، کاهش یافت (۸). اسکودامور و لایوزی (۳۷) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و حرکات شکمبه می‌گردد. فهر و دلاگ (۱۳) نیز مشاهده کردند که مقادیر آفلاتوکسین بالاتر از ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش تولید اسیدهای چرب فرار شد. همچنین نسبت اسیدهای چرب فرار تغییر کرد بگونه‌ای که استات کاهش و پروپیونات و بوتیرات افزایش یافتند اما نسبت والرات تغییری نکرد. دووراک و همکاران (۱۱) نیز با انجام آزمایشی در شرایط درون تنی مشاهده کردند که یک بار تزریق ۲۰۰ میلی‌گرم AFB1 و ۸۰ میلی‌گرم AFB2 به داخل فیستولای یک گاو موجب کاهش نسبت استات، افزایش بوتیرات و نسبت‌های متغیری پروپیونات گردید. در توجیه نتایج بدست آمده در این آزمایش می‌توان گفت که تغییر الگوی جمعیت و فعالیت میکروبی در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت، ممکن است بر جنبه‌های دیگری از ظرفیت تخمیر شکمبه مانند تولید اسیدهای چرب فرار، تأثیرگذار باشد.

اختلاف زیاد مشاهده شده بین گزارشات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت‌ها در تکنیک مورد استفاده، مقادیر مختلف AFB1 و یا منبع آلودگی آفلاتوکسین مورد استفاده باشد. به‌عنوان مثال در روش

می‌تواند با مقادیر آفلاتوکسین مشاهده شده به صورت معمول در مزرعه، مختل گردد (۲۶). بنابراین از آنجا که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند اثرات ضد میکروبی (تخریب میکروب و یا ممانعت و کاهش رشد آن‌ها) داشته باشند، ممکن است باعث تغییر نسبت‌های محصولات نهایی هضم و مختل شدن شکمبه گردیده و در نتیجه هضم، مصرف خوراک و در نهایت تولید حیوان را مختل نمایند (۲۶).

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه

Table 2- Effect of different levels of Aflatoxin B1 on gas production parameters, fermentation and rumen degradability

فراسنجه Parameters	غلظت آفلاتوکسین B1 در محیط کشت (نانوگرم در میلی لیتر) ^۱				SEM	P-Value
	Aflatoxin B1 levels in the culture (ng/ml) ¹					
	0	300	600	900		
نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت) Gas production rate (ml/h)	0.134 ^a	0.121 ^b	0.107 ^c	0.092 ^d	0.005	0.031
تولید گاز (میلی لیتر بر گرم ماده خشک) Gas production (ml/gr DM)	160.7 ^a	154.1 ^a	142.0 ^b	131.3 ^c	4.1	0.012
فاز تأخیر (ساعت) Lag time (h)	0.07 ^c	0.64 ^b	1.03 ^a	1.39 ^a	0.27	0.019
فراسنجه‌های تخمیر و هضم (در ۲۴ ساعت) Fermentation and digestion parameters (over 24 hours)						
pH	6.63	6.58	6.61	6.54	0.09	0.43
قابلیت هضم ماده خشک (گرم بر گرم ماده خشک) Dry matter digestibility (g/g DM)	0.593 ^a	0.584 ^a	0.560 ^b	0.554 ^b	0.011	0.023
غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم بر دسی لیتر) N-NH3 (mg/dL)	17.8 ^a	16.9 ^b	15.2 ^c	15.3 ^c	0.34	0.04
کل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر لیتر) Total VFA (mM/l)	83.6 ^a	77.2 ^b	71.7 ^c	60.8 ^d	2.1	0.014
استات (میلی مول بر لیتر) Acetate (mM/l)	67.5	68.1	67.4	67.8	0.52	0.17
پروپیونات (میلی مول بر لیتر) Propionate (mM/l)	18.8	18.1	19.0	18.4	0.4	0.11
بوتیرات (میلی مول بر لیتر) Butyrate (mM/l)	9.6	9.7	9.3	9.6	0.36	0.37
والرات (میلی مول بر لیتر) Valerate (mM/l)	2.44	2.51	2.59	2.47	0.081	0.16
ایزوالرات (میلی مول بر لیتر) Isovalerate (mM/l)	1.66	1.58	1.71	1.72	0.077	0.13

نتایج بدست آمده نشان داد که مشابه با یافته‌های مرحله قبل، به طور کلی افزودن AFB1 به محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار نرخ و مقدار تولید گاز، کاهش قابلیت هضم ماده خشک و غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید ($P < 0.05$)، در حالی که اثر معنی‌داری بر pH محیط کشت نداشت ($P > 0.05$). از طرف دیگر افزودن جاذب‌های آلو مینوسیلیکاته مختلف به طور کلی موجب کاهش معنی‌دار نرخ و مقدار تولید گاز، کاهش قابل توجه قابلیت هضم ماده خشک و غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید ($P < 0.05$)، و علاوه بر این موجب افزایش معنی‌دار pH محیط کشت در تمامی تیمارهای حاوی جاذب شدند ($P < 0.05$). در توفیق با نتایج این آزمایش جاسکوز و همکاران (۱۸) گزارش کردند که افزودن ۲ یا ۱۰ درصد بنتونیت سدیم به جیره

داده‌های مربوط به تأثیر متقابل AFB1 و جاذب‌های آلو مینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون تنی در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مرحله فرض بر این بود که جاذب‌های سم، مولکول‌های AFB1 را در محیط کشت شکمبه جذب کرده و بدین ترتیب اثرات منفی AFB1 بر تخمیر و هضم شکمبه را حذف نموده و یا کاهش می‌دهند. لذا در این آزمایش AFB1 و ترکیبات جاذب سم در یک زمان، به صورت جدا و یا باهم به یک سیستم کشت ثابت در شرایط برون تنی اضافه شدند. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات قبلی، مقدار ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر AFB1 و همچنین مقدار ۶ درصد جاذب‌های آلو مینوسیلیکاته، جهت انجام آزمایش انتخاب شدند.

این طریق باعث افزایش راندمان استفاده از آمونیاک و پروتئین در شکمبه می‌شوند. گروهی از محققان در دانشگاه تگزاس گزارش کردند که مکانیسم اصلی جذب مولکول AFB1 توسط مونتموریلینیت‌ها از طریق واکنش‌های گیرنده/دهندگی الکترون می‌باشد (۳۱،۱۰) به طوری که گروه کربونیل مولکول AFB1 یک سیستم غنی از الکترون بوده و می‌تواند با کاتیون‌های قابل تبادل در ساختار مونتموریلینیت تشکیل کمپلکس پایدار دهد. از طرف دیگر این محققان بیان نمودند که مولکول‌های AFB1 عمدتاً در لبه‌ها و سطح پایه و همچنین فضاهای بین لایه‌های ذرات مونتموریلینیت جذب می‌گردند. مقایسه بین جاذب‌های آلومینوسیلیکات مختلف بیان می‌کند که تیمار حاوی جاذب میلانند، قابلیت هضم ماده خشک، نرخ و مقدار تولید گاز بالاتر ($P < 0.05$) و غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری ($P < 0.05$) نسبت به تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند و مایکوباند داشت، ولی بین تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند و مایکوباند، اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P > 0.05$)، با این وجود از نظر عددی، تیمارهای حاوی جاذب مایکوباند، قابلیت هضم ماده خشک، نرخ و مقدار تولید گاز بالاتر و غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری نسبت به تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند داشتند. در عین حال هیچ‌گونه اختلاف معنی داری در pH محیط کشت، بین جاذب‌های مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$). تفاوت‌های مشاهده شده در تأثیر نمونه‌های مختلف جاذب‌های بنتونیتی بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه می‌تواند به دلیل نوع بنتونیت مورد استفاده، خلوص و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت آن‌ها باشد (۲۹).

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز، پتانسیل تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم کاهش می‌یابد، ولی pH محیط کشت تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. همچنین، هیچکدام از جاذب‌های آلومینوسیلیکات نتوانستند تأثیرات منفی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه‌ای در شرایط برون تنی را خنثی نموده و یا کاهش دهند که می‌تواند به دلیل مکانیسم جذب سطحی جاذب‌های آلومینوسیلیکات برای جذب AFB1 باشد. نتایج این پژوهش بیان می‌کند که احتمالاً جاذب‌ها نمی‌توانند اثرات منفی AFB1 بر گوارش و تخمیر شکمبه را کاهش دهند و تنها راهکار پیشنهادی، جلوگیری از ورود این سموم به خوراک دام می‌باشد.

گاوهای شیرده، باعث کاهش تجزیه پذیری ماده خشک گردید، اما، صالح (۳۳) گزارش کرد که استفاده از ۲/۵ درصد جاذب آلومینوسیلیکات در جیره، باعث افزایش معنی دار ناپدید شدن ماده خشک می‌گردد.

نتایج گزارش شده قبلی در ارتباط با تأثیر جاذب آلومینوسیلیکات بنتونیت بر pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه، تا حدودی متناقض است. مشابه با نتایج بدست آمده در این آزمایش، آیتچیسون و همکاران (۴) با بررسی تأثیر بنتونیت بر تخمیر شکمبه و قابلیت هضم، گزارش کردند که افزودن بنتونیت به جیره موجب افزایش pH نسبت به گروه شاهد گردید. از طرف دیگر، برخی محققان گزارش کردند که افزودن مقادیر مختلف بنتونیت سدیم به جیره، تأثیری بر pH شکمبه نداشت (۳۷،۹،۳). افزایش معنی دار pH محیط کشت با افزودن جاذب‌های بنتونیتی می‌تواند به این دلیل باشد که بنتونیت به دلیل داشتن کاتیون‌های قابل تعویض با یون هیدروژن، به عنوان تعدیل کننده یون هیدروژن در محیط عمل نموده و از کاهش شدید pH شکمبه جلوگیری می‌نماید.

عبدالرحمان و هلال (۱) گزارش کردند که افزودن ۴ درصد بنتونیت به جیره میش‌های شیرده موجب کاهش معنی دار غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه گردید. عبدالله و همکاران (۲) نیز بیان کردند که اضافه کردن بنتونیت به میزان ۲ درصد به کنجاله خرمای روغنی سبب کاهش جمعیت پروتوزوایی و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه شد. صالح و بنف (۳۴) گزارش کردند که بنتونیت سدیم قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالاست، آن را جذب کرده و پس از کاهش غلظت آن در محیط، شروع به آزادسازی مجدد آن می‌کند. بنابراین افزودن بنتونیت سدیم به جیره می‌تواند تا حدودی دسترسی میکروارگانیسم‌ها به نیتروژن را متعادل ساخته و همچنین به عنوان یک ماده افزودنی با ارزش در جهت بهبود ارزش غذایی خوراک مورد توجه قرار بگیرد (۱۴). همچنین والاس و نیوبولد (۴۰) گزارش کردند که افزودن بنتونیت سدیم به جیره، موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد گردید. ویلیامز و ویتز (۴۲) بیان کردند که احتمالاً بنتونیت سدیم از طریق کاهش جمعیت پروتوزوایی (۴۱) و به تبع آن افزایش جمعیت باکتری‌های شکمبه، موجب برداشت بیشتری از نیتروژن آمونیاکی توسط میکروارگانیسم‌ها شده و در نهایت غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه کاهش می‌یابد.

اعتقاد بر این است که بنتونیت‌ها، قادر به جذب و رهاسازی دوباره پروتئین‌ها و سایر سوبستراهای نیتروژنه هستند، از این رو وقتی که تجمع آمونیاک در شکمبه بالا باشد، آن را جذب کرده و زمانی که غلظت آمونیاک کاهش یابد، مقدار زیادی از آن را آزاد می‌کنند و از

جدول ۳- تأثیر آفلاتوکسین B1 و نمونه‌های جاذب بنتونیتی بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه

Table 3. Effect of aflatoxin B1 and bentonite adsorbent on the parameters of gas production, fermentation and rumen digestion

فراسنجه‌ها Parameters	جاذب Adsorbent t AFB1	-		مگاباند MegaBond		مایکوباند Mycobond		میلباند MilBond		SEM	P-Value
		-	AFB1	-	AFB1	-	AFB1	-	AFB1		
فراسنجه‌های تولید گاز Gas production parameters											
نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت)		0.143 ^a	0.128 ^{bc}	0.121 ^{cd}	0.110 ^e	0.124 ^c	0.115 ^{de}	0.134 ^b	0.122 ^{cd}	0.003	0.044
Gas production rate (ml/h)											
تولید گاز (میلی لیتر بر گرم ماده خشک)		163.7 ^a	146.9 ^{bc}	139.5 ^{cd}	126.4 ^e	143.2 ^c	132.1 ^{de}	152.6 ^b	140.4 ^{cd}	3.80	0.021
Gas production parameters of fermentation and digestibility (24h)											
pH		6.53 ^b	6.57 ^b	6.80 ^a	6.74 ^a	6.79 ^a	6.77 ^a	6.73 ^a	6.75 ^a	0.04	0.038
قابلیت هضم ماده خشک (گرم بر گرم ماده خشک)		0.58 ^a	0.55 ^{bc}	0.51 ^{de}	0.48 ^f	0.53 ^{cd}	0.50 ^{ef}	0.55 ^b	0.52 ^{de}	0.01	0.024
Dry matter digestibility (g/1g DM)											
غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم بر دسی لیتر)		18.3 ^a	16.7 ^b	16.9 ^b	15.8 ^{cd}	16.4 ^{bc}	15.3 ^d	15.5 ^d	15.1 ^d	0.41	0.033
N-NH3 (mg/dL)											

* تیمارهای آزمایشی بر اساس افزودن سه نوع جاذب آلومینوسیلیکاته شامل مگاباند، مایکوباند و میلباند به مقدار ۶ درصد ماده خشک خوراک پایه، و افزودن آفلاتوکسین B1 (به مقدار صفر و ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت) تنظیم شدند.

منابع

- 1- Abdel-Rahman, F. I. S, and K. A. Helal. 2010. Productive Performance of lactating ewes fed diets supplementing with dry yeast and or bentonite as feed additives. World Journal of Agricultural Sciences, 6:43-53.
- 2- Abdullah, N., H. Hanita, Y. W. Ho, H. Kudo, S. Jalaludin, and M. Ivan. 1995. The effects of bentonite on rumen protozoa population and rumen fluid characteristics of sheep fed palm kernel cake. Asian Australian Journal of Animal Science, 8:249-254.
- 3- Aghashahi, A., A. Nikkhah, S. A. Mirhadi., M. Zahedifar, and H. Mansouri. 2005. Effects of different level of unprocessed bentonite, processed bentonite, and clinoptilolite at different rumen degradable protein level, on ammonia concentration, soluble and digestible protein (*in-vitro*). Pajouhesh and Sazandegi, 70: 80-90. (In Persian).
- 4- Aitchison, E. M., J. B. Rowe, and G. S. Rix. 1986. Effect of bentonite clays on rumen fermentation and diet digestibility. Proceeding of Nutrition Society. Proceeding of Nutrition Society, 11:111-114.
- 5- Arroquy, J. I., R. C. Cochran., T. G. Nagaraja, E. C. Titgemeyer, and D. E. Johnson. 2005. Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. Animal Feed Science and Technology, 120:93-106.
- 6- Broderick, G. A, and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63:64-75.

- 7- Burmeister, H. R., and C. W. Hesseltine. 1966. Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14: 403-404.
- 8- Cook, W. O., J. L. Richard, G. D. Osweiler, and D. W. Trampel. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. *American Journal of Veterinary Research*, 47:1817-1825.
- 9- Davison, T. M., and W. K. Ehrlich. 1997. Adding bentonite to sorghum grain-based supplements has no effect on cow milk production. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37:505-508.
- 10- Deng, Y., A. L. Barrientos Velazquez, F. Billes, and J. B. Dixon. 2010. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*, 50: 92-98.
- 11- Dvorak, R., and P. Jagos. 1977. Changes of the clinico-biochemical indices in the ruminal juice and urine in experimental aflatoxicosis of dairy cows. *Veterinary Medicine*, 22:161-169.
- 12- Edrington, T. S., R. B. Harvey, and L. F. Kubena. 1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. *Journal of Animal Science*, 72:1274-1281.
- 13- Fehr, P. M., and J. Delage. 1970. Effect de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. *C.R. Academy Science Paris*, 270:550-553.
- 14- Fenn, P. D., and R. A. Leng. 1989. Wool growth and sulfur amino acid entry rate in sheep fed roughage-based diets supplemented with bentonite and sulfur amino acids. *Australian Journal of Agriculture Research*, 40:889-896.
- 15- Harvey, R. B., L. F. Kubena, T. D. Phillips, D. E. Corrier, M.H. Elissalde, and W.E. Huff. 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Journal of Veterinary Research*, 52:152-156.
- 16- Helferich, W. G., R. L. Baldwin, and D. P. H. Hsieh. 1986. [14C]-aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats. *Journal of Animal Science*, 62:697-705.
- 17- Helferich, W. G., W. N. Garrett, D. P. H. Hsieh, and R.L. Baldwin. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *Journal of Animal Science*, 62: 691-696.
- 18- Jacques, K. A., D. E. Axe., T.R. Harris, and D. L. Harmon. 1986. Effect of sodium bicarbonate and sodium bentonite on digestion, solid and liquid flow, and ruminal fermentation characteristics of forage sorghum silage-based diets fed to steers. *Journal of Animal Science*, 63:923-932.
- 19- Jiang, Y. H., H. J. Yang, and P. Lund. 2012. Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Animal Feed Science and Technology*, 175:85-89.
- 20- Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food additives and contaminants. Thirty-third session. 2001 Mar 12-16; The Netherlands 11.
- 21- Korosteleva, S. N., T. K., Smith, and H. J Boermans. 2007. Effects of feedborne *Fusarium* mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90:3867-3873.
- 22- Korosteleva, S. N., T. K. Smith, and H. J. Boermans. 2009. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92:1585-1593.
- 23- Lindemann, M. D., D. J. Blodgett, E. T. Kornegay, and G. G. Schurig. 1993. Potential ameliorations of aflatoxicosis in weanling/growing swine. *Journal of Animal Science*, 71:171-178.
- 24- Masimango, N., J. Remacle, and J. L. Ramaut. 1978. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B1 from contaminated media. *European Journal of Applied Microbiology* 6:101-105.
- 25- Mathur, C. F., and R. C. Smith. 1976. Growth and morphology of *Streptococcus bovis* and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B1, in vitro. *Journal of Dairy Science* 59:455-458.
- 26- Mertens, D. R. 1979. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In *Proc. Interaction of Mycotoxins in Animal Production*. National Academy Science, Washington, DC.
- 27- Morgavi, D., H. Boudra, and J. P. Jouany. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. In: Oswald IP, Taranu I. *Mycotoxins in Farm Animals*. Transworld Research Network, Kerala, India.
- 28- Ottenstein, D. M., and D. A. Bartley. 1971. Determination of rumen VFA. *Analytical Chemistry*, 43:952-955.
- 29- Papaioannou, D., P. D. Katsoulos, and H. Karatzias. 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: a review. *Microporous and mesoporous materials*, 84:161-170.
- 30- Pettersson, H., and K. H. Kiessling. 1976. Effect of aflatoxin B1, ochratoxin and sterigmatocystin on

- microorganisms from sheep rumen. *Swedden Journal of Agriculture Research*, 6: 161.
- 31- Phillips, T. D., A. B. Sarr, and P. G. Grant. 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Natural Toxins*, 3:204-213.
- 32- Reynal, S. M., I. R. Ipharraguerre, M. Linheiro, A. F. Brito, G. A Broderick, and J. H. Clark. 2007. Omasal flow of soluble proteins, peptides and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradabilities. *Journal of Dairy Science*, 90:1887-1903.
- 33- Saleh, M. S. 1994. Using of feed additives for feeding farm animals, Tanta University, Egypt.
- 34- Saleh, M. S, and A. B. Bonf. 2000. Bentonite supplementation to concentrate for buffaloes. *Egyptian Journal of Nutrition and Feed*, 6:67-78.
- 35- SAS Institute Inc. 2009. *Statistical Analysis System (SAS) User's Guide*, S. I., Cary, NC, USA.
- 36- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*, 72:2980-2991.
- 37- Scudamore, K. A., and C. T. Livesey. 1998. Occurrence and Significance of Mycotoxins in Forage Crops and Silage: A Review. *Journal of Science and Food Agriculture*, 77:1-17.
- 38- Stephenson, R. G. A., J. L. Huff, G. Krebs, and C. J. Howitt. 1992. Effect of molasses, sodium bentonite and zeolite on urea toxicity. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43:301-314.
- 39- Theodorou, M. K, and B. A. Williams. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48:185-197.
- 40- Wallace, R. J, and C. J. Newbold. 1991. Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. *Animal Feed Science and Technology*, 116:163-168.
- 41- Westlake, K., R. I. Mackie, and M. F. Dutton. 1989. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Animal Feed Science and Technology*, 25:169-178.
- 42- Williams, A. G, and S. E. Withers. 1993. Changes in the rumen microbial populations and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 31:61-69.



Effect of Aflatoxin B1 and Aluminosilicate Toxin Adsorbents on the Parameters of Gas Production, Fermentation and Ruminal Digestion (*in vitro*)

M. Mojtahedi^{1*} - M. Danesh Mesgaran² - M. Hayati-Ashtiani³ - S. A. Vakili⁴ - S. M. Vaghar Seyedin⁵

Submitted: 07-10-2018

Accepted: 03-11-2019

Introduction: When aflatoxin contaminated food is given to lactating animals, the metabolite of aflatoxin, called M, is secreted in milk. Since pasteurization, sterilization, and milk processing have little effect on the survival and reduction of AFM1 toxicity, this poison ultimately transports to various dairy products and endangers consumer health. Along with the negative effects of mycotoxins on health and livestock products, these compounds can be effective in digestion, metabolism and ruminal microbial populations. In ruminants (especially lactating cows) fed with AFB1 contaminated feeds, health problems such as liver cancer, reduce immunity, reproductive disorders, malformation, decreased feed intake and milk production have also been reported. An increase in liver enzymes can be attributed to the signs of an abnormal body. In addition, previous studies aluminosilicate has been show to tightly bind aflatoxins *in vitro*. This significantly reduce mortality and morbidity in animals, decrease molecular biomarkers of aflatoxin exposure in humans and animals.

Materials and Methods: Two experiments were conducted to investigate the effect of aflatoxin B1 and aluminosilicate toxin adsorbents on the parameters of gas production contains gas production potential (b) and gas production rate (c), *in vitro* fermentation parameters includes pH, ammonia nitrogen concentration, volatile fatty acids and ruminal digestion. In the first experiment, the effects of different levels of AFB1, including 0, 300, 600 and 900 ng/ml, were investigated on the parameters of gas production, fermentation and digestion using batch culture method. In the second experiment the effectiveness of three aluminosilicate adsorbents on the AFB1 detoxification was investigated. MegaBond and MycoBond as native adsorbents and MilBond as a commercial adsorbent were used in 6% of DM. The gas produced was recorded at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 and 96 h of the incubation. The data obtained were fitted to the non-linear equation to calculate parameters of gas production. Also, at the end of 24 h incubation, four bottles were transferred to refrigerator to stop fermentation. Then, pH, ammonia nitrogen concentration and volatile fatty acid (VFA) of batch culture medium was measured, as well as the dry matter digestibility.

Results and Discussion: Results of first experiment indicated that with increasing the AFB1 from 0.0 to 900 ng/ml, the gas production rate (c) decreased from 0.134 to 0.092 ml/h and the gas production potential (b) decreased from 160.7 to 131.3, but there was no significant difference between the treatments 0 and 300 ng/ml AFB1. In addition, the gas production lag phase increased significantly with increasing level of AFB1 ($P<0.05$). Addition of AFB1 to the batch culture did not affect its pH, but the dry matter digestibility significantly decreased ($P<0.05$) with increasing AFB1. Ammonia nitrogen concentration decreased significantly ($P<0.05$) with AFB1 addition, so that the lowest concentration of ammonia nitrogen was observed at 600 and 900 ng/ml AFB1 (15.2 and 15.3 mg/dL, respectively). In this experiment the total VFA concentration decreased significantly with AFB1 ($P<0.05$), but the molar ratio of acetate, propionate, butyrate, valerate and isovalerate was not affected ($P>0.05$). In the second addition of different aluminosilicate adsorbents significantly reduced the rate and potential of gas production. Likewise, dry matter digestibility and ammonia nitrogen concentration reduced significantly ($P<0.05$). Significant increase in pH of the culture medium by addition of aluminosilicate adsorbents can be attributed to the fact that aluminosilicate acts as a modifier of hydrogen ion in the environment due to the replacement of cations with hydrogen ion and prevents a significant decrease in rumen pH. Probably lowering the ammonia nitrogen concentration is due to the fact that the protozoan population is affected by aluminosilicate adsorbent and decreases; consequently, the population of the ruminal bacteria increases, which results in the removal of more ammonia nitrogen by microorganisms, and ultimately the concentration ammonia nitrogen decreases in the rumen.

Conclusion: The results of this study showed that AFB1 reduced gas production rate (c), the gas production potential (b), the concentration of ammonia and digestibility, but the pH is not affected *in vitro*. Also, none of the adsorbents was able to neutralize or reduce the negative effects of AFB1 on the parameters of gas production,

fermentation and rumen digestion, which could be due to the absorption mechanism of aluminosilicate adsorbents for AFB1 absorption. The results of this study indicate that adsorbents cannot reduce the negative effects of AFB1 on digestion and rumen fermentation, therefore only proposed strategy is to prevent the contamination animal feed with mycotoxins.

Keywords: Adsorption aluminosilicate, Aflatoxin, *in vitro*, Ruminal fermentation.