نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ص. ۴۲۳-۴۱۳

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 4, Winter 2018, p. 413-423

اثر جاذب‌های آلی و معدنی آفلاتوکسین B_1 بر قابلیت هضم و متغیرهای تخمیری شکمبه در شرایط برون‌تنی

سعیده اسدزاده هروی[۱]- عبدالمنصور طهماسبی[۲*]- عباسعلی ناصریان[۲]- رضا ولی‌زاده[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۳

چکیده

مایکوتوکسین‌ها، متابولیت‌های تولید شده توسط قارچ‌ها هستند که باعث بروز مسمومیت در حیوانات و انسان می‌شوند. از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها هستند که یکی از روش‌های مؤثر برای مقابله با مسمومیت ناشی از آنها، استفاده از جاذب‌های سموم قارچی می‌باشد. هدف از این مطالعه، مقایسه توانایی جاذب‌های مختلف بنتونیت تجاری، بنتونیت فعال، کربن فعال، مخمر و فرم‌های ترکیبی بنتونیت+کربن فعال+مخمر به میزان (۱ درصد جیره)، در جذب آفلاتوکسین B_1 در سطح ۰/۵ پی پی ام در شرایط برون‌تنی و تأثیر آنها بر قابلیت هضم و فرآسنجه‌های تخمیری شکمبه بود. افزودن جاذب‌های فوق به محیط کشت حاوی آفلاتوکسین B_1 پس از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون، به طور معنی‌داری سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک نسبت به تیمار شاهد شد. فرآسنجه‌های تخمیری شکمبه از جمله نرخ و مقدار تولید گاز ، میزان pH مایع شکمبه و همچنین پارامترهای تخمینی از تولید گاز نیز در تیمارهای حاوی جاذب به طور معنی‌داری بهبود یافت. در رابطه با افزایش داده‌های حاصل از قابلیت هضم، فرآسنجه های تولید گاز، افزایش pH و پارامترهای برآورد شده از تولید گاز استفاده از بنتونیت نسبت به سایر جاذب ها مؤثرتر واقع شد. در خصوص تغییرات نیتروژن آمونیاکی افزودن جاذب‌های مختلف اثر کاهنده‌ای نسبت به تیمار شاهد داشت. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که در مقایسه بین جاذب‌های مختلف، بنتونیت بیشترین تأثیر را در بهبود قابلیت هضم و متغیرهای تخمیری شکمبه در شرایط برون‌تنی داشت.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، برون تنی، بنتونیت، کربن فعال، مخمر.

مقدمه

آلودگی مواد خوراکی توسط قارچ‌های مختلف یک مسئله ی مهم در سراسر جهان می‌باشد. مایکوتوکسین‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط قارچ‌ها، برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ میلادی با تلف شدن حدود ۱۰۰ هزار بوقلمون در انگلستان ناشی از نکروز شدید کبدی، شناخته شدند (۳). در میان سموم قارچی، آفلاتوکسین (AF) از سمی‌ترین مایکوتوکسین‌ها است و توسط گونه‌های قارچی فلاووس چون جنس‌های آسپرژیلوس و پارازیتیکوس تولید می‌شود و شامل انواع مهمی مثل AFG_2, AFG_1, AFB_2, AFB_1 می‌باشند (۲۶). آفلاتوکسین B_1 (AFB_1) فراوان‌ترین نوع آفلاتوکسین در طبیعت است و می‌تواند غذا و خوراک را آلوده کند، سپس وارد بدن حیوان و انسان شود و در نهایت منجر به بروز بیماری‌هایی چون سرطان گردد (۲۹). آفلاتوکسین B_1 به طور ناگهانی در دانه‌ها تولید می‌شود و در حین سیلو کردن و ذخیره سازی دانه‌ها تا حد زیادی تخریب می‌گردد (۴). در نشخوارکنندگان اثرات این سم شامل: آسیب‌های کبدی، کاهش راندمان رشد، کاهش تولید و کیفیت شیر و عدم مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی است (۳۱). مصرف مقدار ۲۰۰ تا ۸۰۰ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم رژیم غذایی گوساله سبب کاهش تحرک شکمبه می‌شود (۸). فهر و ویلیج (۱۳) طی آزمایشاتی بیان کردند، مصرف آفلاتوکسین B_1 در سطوحی بالاتر از ۲۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه در شرایط کشت ثابت سبب کاهش نرخ ناپدید شدن ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی می‌شود.

به منظور حفاظت حیوانات در برابر اثرات سمی آفلاتوکسین‌ها روش‌هایی وجود دارد که از جمله می‌توان به استفاده از ممانعت کننده‌ها، (۱۹)، غیر فعال سازی میکروبی (۶)، غیر فعال سازی دمایی (۷) و همچنین استفاده از انواع جاذب‌های سموم قارچی که به‌عنوان یکی از کاربردی ترین روش‌ها ست اشاره نمود (۲۶). در سال‌های

۱- دانش‌آموخته دکتری تغذیه نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: (Email: a.tahmasbi@lycos.com
DOI: 10.22067/ijasr.v4i1.43789

اخیر برخی از مطالعات نشان داده است که انواعی از جاذب‌ها از جمله بنتونیت (جاذب رسی از دسته آلومینیوم سیلیکات‌ها)، کربن فعال و مخمر می‌توانند با آفلاتوکسین باند شود (۲۶ و ۲۸). بنتونیت با فرمول عمومی $(Na, CaO)\ (Al, Mg)\ (Si_4O_{10})_3(OH)_6nH_2O$ در دسته رس‌ها قرار دارد و کانی غالب آن منتموریلونیت بوده و دارای ظرفیت تبادل کاتیونی بالایی است (۱). سار و همکاران (۳۸) گزارش کردند جذب آفلاتوکسین توسط جاذب‌های معدنی به دلیل اتصال بین بخش ß-کربونیل آفلاتوکسین و یون‌های فلزی موجود در آنها می‌باشد. فرآیندهای شیمیایی و فیزیکی که روی بنتونیت به منظور افزایش سطح مخصوص و قدرت جذب آن انجام می‌شود چون گرمادهی و شست و شوی اسیدی باعث فعال شدن بنتونیت می‌شود (۱۵). کربن فعال با جنسی زغالی و شکل کریستالی که در ساختار آن منافذ زیادی وجود دارد، به‌عنوان یک ماده جذب کننده سموم به شمار می‌آید (۳۳). کربن فعال به‌عنوان یک ماده افزودنی شیمیایی، توانایی جذب مواد آلی، غیر آلی و ذرات کلوئیدی را دارد و در جیره نشخوارکنندگان به‌عنوان ضد سم بکار می‌رود (۵). اخیرا گزارش شده است کربن فعال قابلیت بالایی در جذب آفلاتوکسین B_1 در شرایط *in vitro* و *in vivo* دارد (۱۶). مخمر به‌عنوان یک جاذب آلی منجر به کاهش اثرات سمی مربوط به مایکوتوکسین‌ها می‌شود (۱۰). اتصال سم و جاذب از طریق پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی بین مارپیچ ß -D گلوکان در دیواره سلولی مخمر و گروه‌های لاکتون آفلاتوکسین B_1 رخ می‌دهد (۳۲). از آنجا که مطالعه امکان استفاده از انواع جاذب‌ها در تغذیه نشخوارکنندگان در کشور امری مهم و قابل توجه می‌باشد، لذا مطالعات *in vitro* اولین قدم در سنجش ظرفیت جذب سموم قارچی توسط جاذب‌ها می‌باشد. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی تأثیر جاذب‌های آلی و معدنی در جذب آفلاتوکسین B_1 و همچنین اثر آن بر قابلیت هضم ماده خشک و پارامترهای تخمیری شکمبه (pH، نیتروژن آمونیاکی و میزان تولید گاز) در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

جیره آزمایشی

جیره مورد استفاده در این آزمایش شامل مخلوطی از سیلاژ یونجه و کنسانتره به شرح جدول ۱ بود. جیره پایه با استفاده از غربال ۱ میلی‌متری آسیاب شد و به داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. هر نمونه آزمایشی شامل ۵۰۰ میلی‌گرم از جیره آزمایشی به نسبت ۱ به ۱ (۲۵۰ میلی گرم کنسانتره و ۲۵۰ میلی‌گرم سیلاژ یونجه) در شرایط کشت ثابت بود.

فعال سازی بنتونیت

بدین منظور ابتدا میزان ۵۰ گرم از بنتونیت توزین شد، سپس با افزودن ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن سوسپانسیون اولیه بنتونیت و آب تهیه شد. با توجه به این که درصد جرمی اسید به رس ۱۵ در نظر گرفته شد، مقدار ۷/۵ گرم از اسید سولفوریک ۹۵ درصد توزین و با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق گردید. قبل از افزودن اسید به رس به علت این که دمای فعال سازی ۹۰ درجه ی سانتی‌گراد در نظر گرفته شده بود، دمای سوسپانسیون اولیه به ۹۰ درجه رسانده شد و در طول مدت فعال سازی نیز این دما حفظ گردید. همچنین در طول این مدت به منظور همگن نگه داشتن محیط واکنش از همزن مغناطیسی استفاده شد. طول مدت واکنش ۲ ساعت در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فیلتراسیون خلأ فاز جامد سوسپانسیون از فاز مایع جدا گردید و رسوب حاصله چندین بار با آب مقطر شست و شو داده شد تا pH آن به حدود ۴ برسد. نمونه حاصله به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا به طور کامل خشک گردد (۱۵). پس از این مرحله، نمونه فعال شده با اسید در کوره با دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه قرار داده شده و پس از سرد شدن نمونه فعال آسیاب شد تا در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گیرد (۱۵).

کشت ثابت آزمایشگاهی

جهت کشت ثابت مایع شکمبه از ۴ رأس گاو نر هلشتاین دارای فیستولای شکمبه (با وزن زنده ۴۵ ±۶۲۰ کیلوگرم) واقع در گاوداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. گاوها با جیره کاملا مخلوط (۵۰ درصد علوفه و ۵۰ درصد کنسانتره) در ۲ نوبت صبح (ساعت ۷) و عصر (ساعت ۱۷) و در حد احتیاجات نگهداری تغذیه شدند. مایع شکمبه قبل از خوراک وعده صبح گرفته شد و بلافاصله توسط چهار لایه پارچه متقال صاف گردید و به سرعت در فلاسک حاوی آب گرم (حدود ۳۸ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد و تا قبل از شروع کار در داخل حمام آب گرم ۳۹ درجه سانتی گراد و تحت جریان مداوم گاز دی اکسید کربن قرار گرفت. فرآیند کشت ثابت مطابق با روش منک و استینگاس (۲۸) طراحی شد. بدین منظور ۰/۵ گرم جیره آزمایشی داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری مخصوص ریخته شد سپس مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه به نسبت (۲ به ۱) به شیشه‌ها افزوده شد. پس از آن محتوی هر شیشه با ppm ۰/۵ سم آفلاتوکسین B_1 (Sigma-Aldrich, Catalog number: A6636) آلوده شد. تیمارهای آزمایشی شامل (بنتونیت تجاری، بنتونیت فعال شده، زغال فعال، دیواره سلولی مخمر (سویه ساکارومایسز سرویزیا با درجه خلوص ۷۵ درصد) و فرم ترکیبی: بنتونیت+ کربن فعال+ مخمر به ترتیب با نسبت‌های ۱) ۰/۵+۰/۴+۰/۱ و ۲) ۰/۴+۰/۴۵+۰/۱۵ و ۳) ۰/۳+۰/۵+۰/۲ درصد) به‌عنوان جاذب سم در سطح ۱ درصد خوراک

به شیشه‌ها اضافه گردید. در این آزمایش برای هر یک از تیمارها و تیمار شاهد (فاقد جاذب) سه تکرار در نظر گرفته شد. سپس با تزریق گاز دی اکسید کربن محیط داخل شیشه‌ها کاملا بی‌هوازی گردید. بعد از پرس کردن درب شیشه‌ها، نمونه‌ها در بن ماری شیکر دار برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۸/۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت و تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و با استفاده از فشار سنج کمی (PTB330, Env Company) اندازه گیری شد.

جدول ۱ –اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره (درصد ماده خشک)

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

اجزاء Composition ingredient	**مقدار** Amount
سیلاژ یونجه Alfalfa silage	50
جو آسیاب شده Barley grain, rolled	13
ذرت آسیاب شده Corn grain, ground	10
کنجاله سویا با پروتئین 44% Soybean meal, solv, 44% Crude protein	9
سبوس گندم Wheat bran	4
کنجاله تخم پنبه Cotton seed meal solvent	6
تخم پنبه Cottonseed whole with lint	7
نمک Salt	0.5
مکمل مواد معدنی و ویتامین Mineral and vitamin supplements	0.5
ترکیب شیمیایی Chemical composition	
پروتئین خام Crude protein	22.2
چربی خام Crude fatty	3.5
فیبر محلول در شوینده خنثی NDF	34.6
فیبر محلول در شوینده اسیدی ADF	23.4
کربوهیدرات غیر فیبر[۱] NFC[1]	35
انرژی قابل متابولیسم[۲] (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) Metabolizable energy[2] (MJ kg DM^{-1})	2.53

[۱] کربوهیدرات غیر فیبر: ۱۰۰– (فیبر محلول در شوینده خنثی + درصد پروتئین خام + درصد چربی خام + درصد خاکستر)

[۲] انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک): ۱۰۰–(۱/۰۶ + ۰/۱۵۷ میزان تولید گاز ((میلی‌لیتر بر ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون)+ ۰/۰۸۴ پروتئین خام (درصد) + ۰/۲۲ فیبر خام (درصد) + ۰/۰۸۱ خاکستر (درصد)).

[1] NFC= 100 – (NDF+ CP + EE + Ash)

[2] Metabolizable energy (MJ kg DM^{-1})= 1.06 + 0.157 GP + 0.084 CP + 0.22 CF - 0.081 XA

(CP = Crude protein (%), XA = Ash (%), CF= Crude fiber (%) and GP= Gas production after 24 h incubation (ml 200 mg DM^{-1})).

پس از گذشت زمان مورد نظر (۷۲ ساعت انکوباسیون) درب شیشه‌ها باز شد و pH محیط کشت با استفاده از pH متر دیجیتال ثبت گردید. بعد از این مرحله به مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از فاز مایع هر شیشه با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ نرمال اسید کلریدریک مخلوط

شد و جهت آنالیز نیتروژن آمونیاکی توسط دستگاه کلدال اتوماتیک (Kjeltec2300Autoanalyzer, Foss Tecator AB, Hongas, Sweden) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شد. سپس محتوی هر شیشه به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد و فالکون‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت برای محاسبه قابلیت هضم ماده ی خشک سوپرناتانت هر فالکون به آرامی تخلیه شد و پلت باقی مانده در کف به داخل کروزه‌های چینی انتقال داده شد. این کروزه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جهت خشک شدن کامل، قرار گرفت و پس از خشک شدن کامل نمونه، کاهش وزن نسبت به وزن اولیه جیره پایه بر اساس درصد برای تجزیه پذیری ماده خشک محاسبه گردید. فرآسنجه‌های قابل تخمین از تولید گاز شامل قابلیت هضم ماده آلی (OMD) و انرژی قابل متابولیسم (ME) نمونه‌ها با استفاده از روش منک و استینگاس (۲۸) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) نیز با استفاده از روش گتاچیو و همکاران (۱۷) و بر اساس معادله‌های زیر محاسبه شد.

$$OMD = ۱۴۸/۸ + ۸/۸۹\ GP + ۴/۵\ CP + ۰/۶۵۱\ XA \quad (۱)$$

$$ME = ۲/۲ + ۰/۱۳۶\ GP + ۰/۰۵۷\ CP + ۰/۰۰۲۹\ CP^{۲} \quad (۲)$$

$$SCFA = ۰/۰۲۳۹\ GP - ۰/۰۶۰۱ \quad (۳)$$

که در معادله‌های بالا، CP پروتئین خام (درصد)، XA خاکستر (درصد) و GP میزان تولید گاز (میلی‌لیتر بر ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در نظر گرفته شد.

معادلات و روش‌های آماری

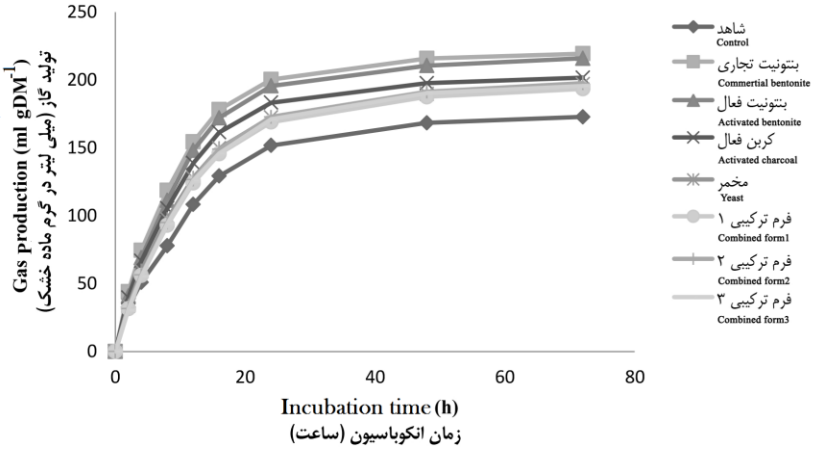
فشار گاز تولید شده در زمان‌های مختلف انکوباسیون، با استفاده از رابطه تئودورو و همکاران (۴۰) به صورت حجم گاز تولید شده در هر زمان تبدیل گردید. تولید تجمعی گاز در زمان‌های مختلف محاسبه شد و بر اساس مدل آماری اسوجی و همکاران (۳۴) {P=b(۱ $-e^{-ct}$)} و با استفاده از نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) (۳۹) ، نرخ تولید گاز (c) و مقدار تولید گاز (b) به صورت تجمعی در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون برآورد گردید. غلظت نیتروژن آمونیاکی بر اساس روش کجلدال (Kjeltec2300Autoanalyzer, Foss Tecator AB, Hongas, Sweden) تعیین شد. فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH و قابلیت هضم ماده خشک با استفاده از مدل آماری GLM نرم افزار SAS (۳۹) و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه ی آماری قرار گرفت. سپس میانگین مشاهدات بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. مدل آماری طرح به صورت زیر بود.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (۴)$$

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

نتایج و بحث

داده‌های مربوط به فرآسنجه‌های تولید گاز در جدول ۲ و الگوی تولید گاز در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. افزودن جاذب‌های مختلف به طور کلی موجب افزایش معنی دار نرخ و مقدار تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد جاذب) گردید (P<۰/۰۰۰۱). همچنین با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از بنتونیت در مقایسه با سایر جاذب‌ها در افزایش فرآسنجه‌های تولید گاز مؤثرتر بود (P<۰/۰۰۰۱). علاوه بر این، در بین تیمارهایی که از فرم‌های ترکیبی ۱، ۲ و ۳ (با نسبت‌های مختلف) به‌عنوان جاذب در آنها استفاده شد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. محققین زیادی از روش تولید گاز برای برآورد ارزش کیفی بعضی از مواد افزودنی، فرآورده‌های خوراکی دامی، گیاهان و غیره استفاده کرده اند (۳۰ و ۴۱). بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعات جیانگ و همکاران (۲۴) و هلفریچ و همکاران (۲۱)، وجود آفلاتوکسین B_1 در محیط کشت فاقد جاذب سبب کاهش فرآسنجه‌های تولید گاز شد، که این نظریه احتمالا به تأثیر آفلاتوکسین B_1 بر جمعیت میکروبی مایع شکمبه بستگی دارد. طی آزمایشات دیگر توسط جیانگ و همکاران (۲۵)، استفاده از کربن فعال و بنتونیت به عنوان جاذب‌های آفلاتوکسین B_1 سبب افزایش معنی داری نرخ تولید گاز پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، در شرایط آزمایشگاهی شد. اما بر خلاف نتایج حاصل از این آزمایش، مجتهدی و همکاران (۲۹) گزارش کردند که افزودن جاذب‌های بنتونیتی در سطح ۶ درصد جیره پایه موجب کاهش معنی دار نرخ و میزان تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد شد. کربن فعال قادر به باند شدن با چندین نوع مایکوتوکسین در شرایط کشت ثابت می‌باشد، ولی در این خصوص قدرت باند شدن بنتونیت به خصوص با آفلاتوکسین B_1 بیشتر است و اثر مطلوب‌تری بر فرآسنجه‌های تخمیری شکمبه دارد (۳۶). اگرچه براساس مطالعات راجو (۳۵) و ییلدایز (۴۶) افزودن مخمر به محیط کشت حاوی آفلاتوکسین B_1 در شرایط *in vitro* و *in vivo* مؤثر واقع شد، اما دیاز و همکاران (۱۲) دریافتند قدرت باند شدن بنتونیت با آفلاتوکسین B_1 در محیط کشت ثابت بیش از ۹۵ درصد است، از اینرو، اثرات آن بر فرآسنجه‌های تخمیری شکمبه در مقایسه با کربن فعال و مخمر بیشتر است. در آزمایشی که روی خوک انجام شد، لیندمان و همکاران (۲۷) گزارش کردند که در صورت استفاده از آفلاتوکسین B_1 در دوزهای بالاتر از ۸۰۰ ppb وجود بنتونیت به میزان ۲ درصد جیره ضروری است تا بتواند اثرات منفی آن را در بدن حیوان خنثی کند.



شکل ۱– الگوی تولید گاز تحت تأثیر استفاده از انواع جاذب‌های آفلاتوکسین B_1 در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در محیط کشت ثابت

فرم ترکیبی ۱: ۰/۵ درصد بنتونیت + ۰/۴ درصد کربن فعال + ۰/۱ درصد مخمر

فرم ترکیبی ۲: ۰/۴ درصد بنتونیت + ۰/۴۵ درصد کربن فعال + ۰/۱۵ درصد مخمر

فرم ترکیبی۳: ۰/۳ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد کربن فعال + ۰/۲ درصد مخمر

Figure 1– Effect of aflatoxin B_1 absorbents on extent of gas production *in vitro* after 72 h incubation

Combined form 1: 0.5 % Bentonite + 0.4 % Activated charcoal + 0.1 % Yeast

Combined form 2: 0.4 % Bentonite + 0.45 % Activated charcoal + 0.15 % Yeast

Combined form 3: 0.3 % Bentonite + 0.5 % Activated charcoal + 0.2 % Yeast

جدول ۲- تأثیر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B_1 بر نرخ و میزان تولید گاز در محیط کشت ثابت در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون[۱]

Table 2- Effect of different absorbents of aflatoxin B_1 on gas production parameters in vitro after 72 h incubation[1]

تیمار Treatment	مقدار تولید گاز (b) Cumulative gas production	نرخ تولید گاز (c) Gas production rate
شاهد Control	172.9^{c}	0.084^{d}
بنتونیت تجاری Commercial bentonite	218.6^{a}	0.0103^{a}
بنتونیت فعال Activated bentonite	215.1^{a}	0.099^{b}
کربن فعال Activated charcoal	200.5^{b}	0.097^{b}
مخمر Yeast	194.8^{b}	0.089^{c}
فرم ترکیبی ۱ [۲] Combined form 1 [2]	192.6^{b}	0.086^{cd}
فرم ترکیبی ۲ [۳] Combined form 2 [3]	197.0^{b}	0.085^{d}
فرم ترکیبی ۳ [۴] Combined form 3 [4]	195.4^{b}	0.084^{d}
P-value	<0.0001	<0.0001
SEM	4.2	0.001

[۱] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[۲] ۰/۵ درصد بنتونیت + ۰/۴ درصد کربن فعال + ۰/۱ درصد مخمر

[۳] ۰/۴ درصد بنتونیت + ۰/۴۵ درصد کربن فعال + ۰/۱۵ درصد مخمر

[۴] ۰/۳ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد کربن فعال + ۰/۲ درصد مخمر

[1] Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

[2] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.5 + 0.4 + 0.1 percent)

[3] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.4 + 0.45 + 0.15 percent)

[4] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.3 + 0.5 + 0.2 percent)

داده‌های مربوط به قابلیت هضم ماده خشک، نیتروژن آمونیاکی و pH در جدول ۳ مشخص شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که قابلیت هضم ماده خشک (IVDMD) به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع جاذب استفاده شده در محیط کشت قرار گرفت (P<۰/۰۰۰۱). به عبارتی دیگر، استفاده از جاذب‌های گوناگون سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک شد. براساس همین نتایج، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از بنتونیت در مقایسه با سایر جاذب‌ها در افزایش قابلیت هضم ماده خشک مؤثرتر بود. در مطالعه‌ای وستلیک و همکاران (۴۳) بیان کردند که در علوفه‌هایی که از آفلاتوکسین B_1 به میزان ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد، قابلیت هضم ماده خشک حدود ۵۰ درصد کاهش یافت. همچنین بر اساس مطالعه دیگری (۱۳) استفاده از آفلاتوکسین در سطوحی بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در شرایط کشت ثابت فاقد هرگونه جاذب سم میزان هضم سلولز کاهش یافت. در توافق با نتایج این آزمایش صالح و بنف (۳۷) گزارش کردند که بنتونیت به‌عنوان یک جاذب سم سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک در مقایسه با نمونه کنترل (فاقد جاذب سم) شد. همچنین هلال و عبدالرحمان (۲۰) گزارش کردند که افزودن بنتونیت به محیط کشت سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک شد. طی گزارشات جیانگ و همکاران (۲۵) هم بیان شد که، افزودن بنتونیت و کربن فعال به‌عنوان جاذب در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین B_1 به طور معنی داری میزان (IVDMD) را بهبود بخشید. ویلیامز و ویترز (۴۵) بیان نمودند که، بنتونیت سدیم از طریق افزایش جمعیت باکتریایی شکمبه موجب افزایش قابلیت هضم ماده خشک شد. اما جاسکوز و همکاران (۲۳) گزارش کردند که افزودن ۲ یا ۱۰ درصد بنتونیت سدیم به جیره گاوهای شیری باعث کاهش تجزیه پذیری ماده خشک گردید. ویلیامز (۴۴) گزارش کرد که استفاده از کربن فعال در جیره باعث افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) در ناپدید شدن ماده خشک شد. با توجه به اینکه افزودن مخمر در جیره حاوی آفلاتوکسین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های تخریب کننده آفلاتوکسین می‌شود ولی میزان سمیت و مدت زمان برخورد مخمر با سم در از بین بردن آن مؤثر است (۹). ماچینی و همکاران (۳۲) گزارش کردند که تأثیر دیواره سلولی مخمر در شرایط *in vitro* در جذب آفلاتوکسین اندک است. همچنین در این زمینه داوسون و همکاران (۱۰) اظهار داشتند که محدوده فعالیت مخمر در pH حدود ۴ است که این شرایط معمولا در محیط کشت مایع شکمبه صدق نمی‌کند.

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که، افزودن جاذب‌های آفلاتوکسین سبب کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۰۰۱) در غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید (جدول ۳). براساس مطالعات انجام شده، افزودن آفلاتوکسین B_1 به محیط کشت فاقد جاذب سم، غلظت نیتروژن آمونیاکی را به طور چمشگیری کاهش داد که علت آن کاهش در آزاد شدن آمونیاک خوراک در نتیجه جلوگیری از هضم پروتئین توسط آفلاتوکسین B_1 بیان شد (۱۳ و ۲۴). صالح و بنف (۳۷) گزارش کردند که، بنتونیت سدیم قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالا است، آن را جذب کرده و پس از کاهش غلظت آن در محیط شروع به آزاد سازی مجدد آن نماید، بنابراین افزودن بنتونیت سدیم به جیره می‌تواند تا حدودی دسترسی میکروارگانیسم‌ها را به نیتروژن متعادل ساخته و همچنین به‌عنوان یک ماده افزودنی با ارزش در جهت بهبود ارزش غذایی خوراک مورد توجه قرار گیرد (۱۴). همچنین والاس و نیوبولد (۴۲) گزارش کردند که، افزودن بنتونیت سدیم به جیره موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد گردید. ویلیامز و ویترز (۴۵) بیان نمودند که، بنتونیت سدیم از طریق کاهش جمعیت پروتوزوآیی و به تبع آن افزایش جمعیت باکتریایی شکمبه موجب برداشت بیشتری از نیتروژن آمونیاکی توسط میکروارگانیسم‌ها شد و در نهایت غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه کاهش یافت. همچنین مطالعه دیگری نشان داد که، کربن فعال نیز همانند بنتونیت قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالا است آن را جذب و پس از اینکه غلظت آمونیاک در محیط کاهش یافت، شروع به آزادسازی مجدد آن نماید (۱۸).

نتایج حاصل از آزمایشات جیانگ و همکاران (۲۵) نیز نشان داد که، افزودن بنتونیت و کربن فعال درمحیط کشت حاوی آفلاتوکسین B_1 کاهش در میزان نیتروژن آمونیاکی را به همراه داشت. والاس و نیوبولد (۴۲) گزارش کردند که، افزودن کربن فعال به جیره منجر به کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به گروه شاهد گردید. در رابطه با جذب آفلاتوکسین توسط دیواره سلولی مخمر بیان شده است که، بیش از ۹۰ درصد جذب آن در شرایطی است که، دمای محیط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت آفلاتوکسین در آن محیط در محدوده ۲ تا ۱۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر باشد (۱۰ و ۱۱). بر اساس نتایجی که از این مطالعه به دست آمد، میزان pH مایع شکمبه در شرایط کشت ثابت به طور معنی‌داری تحت تأثیر انواع جاذب قرار گرفت (P<۰/۰۰۰۱). لازم به ذکر است که با توجه به نتایج جدول ۳ بیشترین و کمترین مقدار pH زمانی حاصل شد که به ترتیب از جاذب‌های بنتونیت و فرم ترکیبی ۲ استفاده گردید. از آنجایی که یکی از اثرات مهم بنتونیت علاوه بر جذب سموم، تأثیر بر pH مایع شکمبه و پایداری آن می‌باشد، لذا هر چه میزان pH بالاتر رود، هضم و تخمیر مواد خوراکی به واسطه فعالیت بیشتر میکروب‌ها بهبود می‌یابد (۲۳). بر همین اساس آیتچیسون و همکاران (۲) نیز با بررسی تأثیر بنتونیت بر تخمیر شکمبه و قابلیت هضم گزارش کردند که، افزودن بنتونیت به جیره حاوی آفلاتوکسین B_1 موجب افزایش معنی دار میزان pH نسبت به گروه شاهد گردید. مطابق با گزارشات دیگر (۲۲)، بنتونیت می‌تواند از کاهش pH مایع شکمبه در حضور خوراک

جلوگیری به‌عمل آورد، کـه در ایـن خصـوص بنتونیـت فـرآوری شـده نسبت به بنتونیت معمولی به دلیل افزایش سطح فعـال آن بهتـر عمـل می‌نماید. افزایش معنی‌دار pH محیط کشت با افزودن بنتونیت به ایـن دلیل می‌تواند باشد که، بنتونیت با داشتن کاتیون‌های قابل تعـویض بـا یون هیدروژن به‌عنوان تعدیل کننده این یون در محیط عمـل نمـوده و از کاهش شدید pH شکمبه جلوگیری می‌نماید. از طرفی دیگـر برخـی از محققان گزارش کردند که، افزودن مقادیر مختلف بنتونیت سدیم بـه جیـره تـأثیری بـر pH شـکمبه نداشـت (۱). بررسـی مطالعـات نشـان می‌دهد که افزودن مخمر به‌عنوان جاذب به محیط کشـت حـاوی سـم در مقایسه با بنتونیت pH محیط را کمتـر تحـت تـأثیر قـرار مـی‌دهـد (۳۲).

جدول ۳- تأثیر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B_1 بر قابلیت هضم ماده خشک، غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH مایع شکمبه در محیط کشت ثابت در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون[۱]

Table 3- Effect of different absorbents of aflatoxin B_1 on dry matter digestibility, rumen fluid pH and ammonia nitrogen concentration after 72 h incubation[1]

تیمار Treatment	قابلیت هضم Degradability	نیتروژن آمونیاکی Ammonia nitrogen	pH
شاهد Control	58.7^{f}	29.7^{a}	6.69^{e}
بنتونیت تجاری Commercial bentonite	78.7^{a}	27.7^{b}	6.79^{b}
بنتونیت فعال Activated bentonite	78.03^{a}	27.1^{b}	6.80^{a}
کربن فعال Activated charcoal	73.6^{b}	24.5^{c}	6.75^{c}
مخمر Yeast	71.4^{c}	21.7^{d}	6.74^{d}
فرم ترکیبی ۱ [۲] Combined form 1 [2]	69.2^{d}	18.7^{e}	6.69^{e}
فرم ترکیبی ۲ [۳] Combined form 2 [3]	61.5^{e}	17.6^{f}	6.67^{g}
فرم ترکیبی ۳ [۴] Combined form 3 [4]	62.2^{e}	18.2^{ef}	6.68^{f}
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001
SEM	0.62	0.23	0.003

[۱] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).
[۲] ۰/۵ درصد بنتونیت + ۰/۴ درصد کربن فعال + ۰/۱ درصد مخمر
[۳] ۰/۴ درصد بنتونیت + ۰/۴۵ درصد کربن فعال + ۰/۱۵ درصد مخمر
[۴] ۰/۳ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد کربن فعال + ۰/۲ درصد مخمر

[1] Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).
[2] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.5 + 0.4 + 0.1 percent)
[3] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.4 + 0.45 + 0.15 percent)
[4] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.3 + 0.5 + 0.2 percent)

اثـر جـاذب‌هـای مختلـف بـر میـزان OMD ، ME و SCFA در جدول ۴ نشان داده شـده اسـت. نتـایج نشـان مـی‌دهـد کـه افـزودن جاذب‌های مختلف به محیط کشت سبب افـزایش مقـادیر پارامترهـای فوق گردید. از بین جاذب‌های استفاده شده بنتونیت بـه طـور معنـی‌دار بیشـترین تـأثیر را در افـزایش ایـن پارامترهـا داشـت (P<۰/۰۰۰۱). مطالعات نشان داده است که میـزان تولیـد ME و SCFA بـا افـزودن آفلاتوکسین به میزان ۰/۲ – ۰/۸ میکروگرم بـه ازای میلـی‌لیتـر مـایع شکمبه به محیط کشت کاهش یافت (۸). اسیدهای چرب کوتاه زنجیـر (SCFAs) نتیجه تخمیر شکمبه‌ای هستند لذا می‌توان از آن به‌عنـوان یک عامل مهم در برآورد میزان تأثیر پـذیری تخمیـر شـکمبه اسـتفاده کـرد. جیانـگ و همکـاران (۲۵) نیـز گـزارش کردنـد کـه افـزودن آفلاتوکسین به میزان ۱ میکرو گـرم در میلـی‌لیتـر بـه محـیط کشـت سبب کاهش میزان تولید گاز، OMD، ME و SCFA گردید در حالی که در تیمارهایی که جاذب‌هایی چون بنتونیت و کربن فعال را دریافـت نمودند مقدار پارامترهای مذکور افزایش یافت کـه منـک و اسـتینگاس (۲۸) علت این امر را وجود همبستگی مثبت بـین میـزان تولیـد گـاز و میزان تولید SCFA گزارش کردند.

جدول ٤- تأثیر جاذب‌های مختلف آفلاتوکسین B_1 بر فرآسنجه‌های قابل تخمین از تولید گاز در محیط کشت ثابت در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون[۱]

Table 4- Effect of different absorbents of aflatoxin B_1 on parameters estimated from in vitro gas production after 72 h incubation[1]

تیمار Treatment	قابلیت هضم ماده آلی OMD[2]	انرژی قابل متابولیسم ME[3]	اسیدهای چرب کوتاه زنجیر SCFA[4]
شاهد Control	524.39[d]	9.07[d]	0.674[d]
بنتونیت تجاری Commercial bentonite	607.53[a]	10.34[a]	0.897[a]
بنتونیت فعال Activated bentonite	599.08[a]	10.21[a]	0.875[a]
کربن فعال Activated charcoal	577.12[b]	9.88[b]	0.816[b]
مخمر Yeast	557.91[c]	9.58[c]	0.764[c]
فرم ترکیبی ۱ [۲] Combined form 1 [5]	551. 79[c]	9.49[c]	0.748[c]
فرم ترکیبی ۲ [۳] Combined form 2 [6]	558.55[c]	9.59[c]	0.766[c]
فرم ترکیبی ۳ [۴] Combined form 3 [7]	555.38[c]	9.55[c]	0.757[c]
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001
SEM	6.1	0.27	0.07

[۱] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[۲] ۰/۵ درصد بنتونیت + ۰/۴ درصد کربن فعال + ۰/۱ درصد مخمر

[۳] ۰/۴ درصد بنتونیت + ۰/۴۵ درصد کربن فعال + ۰/۱۵ درصد مخمر

[۴] ۰/۳ درصد بنتونیت + ۰/۵ درصد کربن فعال + ۰/۲ درصد مخمر

[1] Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).
[2] Organic matter digestibility, [3] Metabolizable energy, [4] Short- chain fatty acids.
[5] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.5 + 0.4 + 0.1 percent)
[6] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.4 + 0.45 + 0.15 percent)
[7] Bentonite + Activated charcoal + Yeast (0.3 + 0.5 + 0.2 percent)

نتیجه گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است کـه آفلاتوکسـین B_1 سـبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری شـکمبه در شـرایط *in vitro* شـد. لـذا افزودن جاذب سم سبب بهبود مقادیر ایـن فرآسـنجه‌هـا (بـه اسـتثنای نیتروژن آمونیاکی) گردید. از بین جاذب‌هـای مـورد اسـتفاده، بنتونیـت تجاری و فعال شده بیشترین تأثیر را در این زمینه داشت.

منابع

1- 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).
2- Aitchison, E. M., J. B. Rowe, and Rix, G. S. 1986. Effect of bentonite clays on rumen fermentation and diet digestibility. Proceedings of the Nutrition Society of Australia, 11: 111-114.
3- Allcroft, R, and R. B. A. Carnaghan. 1963. Toxic product in groundnuts. Biological effects. Chemistry and Industry (Lond.), 9: 50-53.
4- Brown, T. 1996. Fungal diseases and Poultry Diseases. British Poultry Science, 6: 247–260.
5- Buck, W. B, and P. M. Bratich. 1986. Activated charcoal: Preventing unnecessary death by poisoning. Veterinary Medicine, 73: 73-77.
6- Ciegler, A., E. B. Lillehoj., R. E. Peterson, and H. H. Hall. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. Applied

Microbiology, 14: 934-939.
7- Conway, H. F., R. A. Anderson, and E. B. Bagley. 1978. Detoxification of aflatoxin contaminated corn by roasting. Cereal Chemistry, 55: 115-117.
8- Cook W. O., J. L. Richard., G. D. Osweiller, and D. W. Trampel. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B_1 and M_1. American Journal of Veterinary Research, 47: 1817-1825.
9- Dalvi, R. R, and C. McGowan. 1984. Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B1 and its reversal by activated charcoal, Phenobarbital and reduced glutathione. Poultry Science, 63: 485-491.
10- Dawson, K. A., J. Evans, and M. Kudupoje. 2001. Understanding the Adsorption Characteristics of Yeast Cell Wall Preparations Associated with Mycotoxin Binding. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
11- Devegowda, G., M. V. L. N. Raju., A. Nazar, and H. V. L. N. Swamy. 2000. Effect of rumen fluid on in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin. Animal Feed Science and Technology, 98: 241–255.
12- Diaz, D., W. Hagler., B. Hopkins, and L. Whitlow. 2003. Aflatoxin binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. Mycopathologia, 156: 223-226
13- Fehr, P. M, and J. Delage. 1970. Effect de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. C.R. Academia des Science (Series D), 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 Agricultural Research, 40: 889-896.
15- Frenkel, M. 1974. Surface acidity of montmorillonites. Clays Clay Miner, 22: 435-441.
16- Galvano, F., A. Pietri., T. Bertuzzi., M. Bognanno., L. Chies., A. Angelis, and M. Galvano. 1997. Activated carbons: in vitro affinity for aflatoxin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. Journal of Food Protection, 60: 985-991.
17- Greeballah, H., E. L. Obeid., A. Faisal, H. Nabil, and H. Bashir. 2005. In vitro effect of some insecticides on rumen fluid fermentation. Journal of Agricultural Science, 3: 80-89.
18- Hamilton, P. B. 1985. Factors influencing activity of fungi and anti- fungal agents in poultry feed in Tricothecenes and Other Mycotoxins. John Wiley and Sons Ltd, New York.
19- Helal, F, and K. Abdel-Rahman. 2010. Productive performance of lactating ewes fed diets supplementing with dry yeast and bentonite as feed additives. World Journal of Agricultural Sciences, 6: 489-498
20- 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.
21- Ivan, M. 1992. Effects of Bentonite and monensine on selected elements in the stomach and liver of Fauna-Free and faunated sheep. Journal of Dairy Science, 75: 201-208.
22- 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.
23- Jiang, Y. H., H. J. Yang, and P. Lund. 2012. Effect of aflatoxin B_1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. Animal Feed Science and Technology, 175: 85-89.
24- Jiang, Y. H., P. Wang., H. J. Yang, and Y. Chen. 2014. The efficacy of bamboo charcoal in comparison with smectite to reduce the detrimental effect of aflatoxin B_1 on in vitro rumen fermentation of a hay-rich feed mixture. . Animal Feed Science and Technology, 175: 85-89.
25- Kutz, R. E., J. D. Sampson., L. B. Pompeu., D. R. Leduox., J. N. Spain, and M. Vazquez-Anon. 2009. Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M_1 levels in milk of early to mid-lactation dairy cows fed aflatoxin B_1. Journal of Dairy Science, 92: 3959-3963
26- Lindemann, M. D., D. J. Blodgett., E. T. Kornegay, and G. G. Schurig. 1993. Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. Journal of Animal Science, 71: 171–178.
27- Menke, K. H, and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 7: 28-55.
28- Mojtahedi, M., M. Danesh Mesgaran., S. A. Vakili, and E. Abdi Ghezeljeh. 2013. Effect of esterified glucomannan on carryover of aflatoxin from feed to milk in lactating holstein dairy cows. *Annual Review* & *Research* in *Biology,* 3:76-82.
29- Mokhtarpur, A., A. A. Naserian., R. Valizadeh, and A. M. Tahmasbi. 2012. Effect of pistachio silage products processed with polyethylene glycol and urea on phenolic compounds and in vitro gas production and performance of Holstein dairy cows. Iranian Journal of Animal Science Research, 4: 55-61. (In Persian).
30- Morgavi, D. P., H. Boudra, and J. P. Jouany. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. Animal Feed Science and Technology, 137: 201-212
31- Moschini, M., A. Gallo., G. Piva, and F. Masoero. 2008. The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agentsand in vivo release of the sequestered toxin. Animal Feed Science and

Technology, 147: 292-309.
32- Motoi, Y. 1988. Present status on animal disease due to low fiber intake. Japanese Grassland Science, 10: 24-31.
33- Osuji, P. O., I. V. Nsahlai, and H. Khalili. 1993. Feed Evaluation. Ilca manual (International Livestock Center for Africa), Addis Ababa, Ethiopia.
34- Raju, M. V. L. N, and G. Devegowda. 2000. Influenceof esterified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis. British Poultry Science, 41: 640-650.
35- Ramos, A. J., J. Fink-Gremmels, and E. Hernandez. 1996. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. Journal of Food Protection, 59: 631-641.
36- Saleh, M. S, and A. B. Bonf. 2000. Bentonite supplementation to concentrate for lactating buffaloes. Egypt Journal of Nutrient Feeds, 6:67-78
37- Sarr, A. B., B. A. Clement, and T. D. Phillips. 1991. Molecular mechanism of aflatoxin B$_1$ chemisorption by hydrated sodium calcium aluminosilicate. Toxicologist, 197: 91-97
38- SAS. SAS/STAT User's guide Statistics, Version 9.1. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
39- Theodorou, M. K., B. A. Williams., M. S. Dhanoa., A. B.McAllan, and J. France. 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- Valizadeh, R., M. Ghadami, and F. Mellati. 2011. Determining the chemical composition and nutritional value of Eurotia ceratoides using plastic bags and gas production. Iranian Journal of Animal Science Research, 3: 159-169. (In Persian).
41- Wallace, R. J, and C. J. Newbold. 1991. Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique and rumen ciliate protozoa. *Journal* of *Agricultural Science*, 116: 163-168.
42- 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.
43- Williams, P. P., J. D. Robbins., J. Gutierrez, and R. E. Davis. 1963. Rumen bacterial and protozoa responses to insecticide substrates. Applied Microbiology, 9: 405-409.
44- Williams, A. G, and S. E. Withers. 1993. Changes in the rumen microbial population and its activities during the fermentation period after the reintroduction of ciliate protozoa in to rumen of defaunated sheep. Canadian Journal of Microbiology, 31: 61-69.
45- Yildiz, A. O., S. S. Parlatand, and I. Yildirim. 2004. Effect of dietary addition of live yeast (Saccharomyces cerevisiae) on some performance parameters of adult Japanese quail (Coturnix japonica) induced by aflatoxicosis. Revue Médicine Véterania, 155: 38-41.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 4, Winter 2018, p. 413-423

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ص. ۴۲۳-۴۱۳

The Effect of Organic and Inorganic Aflatoxin B_1 Absorbents on *in Vitro* Digestibility and Rumen Fermentation Characteristics

S. Assadzadeh[1]- A. Tahmasbi[2*]- A. A. Naserian[2]- R. Valizadeh[2]

Received: 25-01-2015
Accepted: 13-06-2015

Introduction Aflatoxins (AF) as secondary metabolites are produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The most abundant aflatoxin B_1 (AFB_1) is toxic and carcinogenic to humans and animals. Utilization of mycotoxin adsorbents are noted as the most practical methods for protection of feed ingredients. The purpose of this study was to investigate the effect of organic and inorganic adsorbents for the adsorption of AFB_1 and its effects on dry matter digestibility and rumen fermentation characteristics.

Materials and Methods The experimental diet was a mixture of alfalfa silage and concentrate. Procedure of in vitro batch culture was performed according to the Menke and Steingass procedure. In an anaerobic condition, 30 ml of buffered rumen fluid was dispensed with pipetor pump into a 120-ml serum bottle containing 0.5 g DM of the experimental diet. The content of each bottle was contaminated with 0.5 ppm AFB_1. Experimental treatments were: the control diet, commercial bentonite, activated bentonite, activated charcoal, the cell wall of *Saccharomyces serevisia* with 75% purity, bentonite + activated charcoal + yeast, (0.5 + 0.4 + 0.1 percent), bentonite + activated charcoal + yeast, (0.4 + 0.45 + 0.15 percent) and , bentonite + activated charcoal + yeast(0.3 + 0.5 + 0.2 percent) The amount of absorbents for all treatments was 1% of the experimental diets. All bottles were purged with anaerobic CO_2, sealed with rubber stoppers and placed in a shaking water bath for 72 h at 38.6 degree centigrade. The amount of produced gas was recorded at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48 and 72 h of the incubation. At the end of incubation, all the bottles were transferred to refrigerator to stop fermentation, and then opened. After pH measurements 2-ml sample of each filtrate bottle was taken and frozen at 20 degree centigrade after acidification with 2-ml of 0.2 N HCl. The biomass residues were centrifuged at 1000×g for 10 min at 4 degree centigrade. The supernatant in each bottle was decanted and the pellet was dried at 65 degree centigrade to a constant weight for the determination of the residues.

Results and Discussion Absorbents addition increased the amount of produced gas in all treatments in comparison with the control treatment significantly ($P<0.0001$). The similar trend was obtained for organic matter digestibility, ME and SCFA ($P<0.0001$). Within the treatments bentonite was more effective ($P<0.0001$) in case of the noted parameters. Jiang et al, reported the similar results following fermentation without aflatoxin absorbent probably because the adverse effects of aflatoxin B_1 on microbial fermentation in the media. In another report utilization of activated carbon and bentonite increased the rate of gas production after 72 h of incubation significantly.

Dry matter digestibility was affected significantly ($P<0.0001$) by the type of adsorbent. It was concluded that the use of bentonite was more effective in increasing dry matter digestibility compared with other adsorbents. Similar results were reported in an experiment with bentonite added to the alfalfa silage. The aflatoxin adsorbents addition reduced ammonia nitrogen concentration significantly ($P<0.0001$). Williams and Withers demonstrated that, addition sodium bentonite to the media led to reduction in ammonia nitrogen concentration in the rumen. In another study the activated carbon was able to absorb high levels of ammonia nitrogen first and then it was released to the rumen gradually. The pH of rumen fluid culture was affected by the types of adsorbent significantly ($P<0.0001$) reported. It was showed that bentonite addition in diets containing aflatoxin B_1 significant increase pH levels than the control treatments.

Conclusion The results showed that aflatoxin B_1 reduced *in vitro* rumen fermentation characteristics including dry matter digestibility, ammonia-N concentration, pH and produced gas significantly. For overcoming these problems, absorbents addition mainly the activated bentonite is highly recommended.

Keywords: Activated carbon, Aflatoxin, Bentonite, In vitro, Yeast.

1- PhD Student of Ruminant Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran,

2- Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Iran.

(*-Corresponding Author Email: a.tahmasbi@lycos.com)