نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۲۰۹-۲۰۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 5, No. 3, Fall 2013, p. 201-209

تاثیر آفت کش ارگانوفسفره فوزالون (phosalone) همراه با مقادیر مختلف بنتونیت بر فراسنجه‌های تخمیر پذیری یک جیره کاملاً مخلوط شده در شرایط آزمایشگاهی

محسن کاظمی[1*]- عبدالمنصور طهماسبی[2]- رضا ولی‌زاده[3]- عباسعلی ناصریان[4]- رضا افشاری[5]- آزاده صنعی[6]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۵/۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۱۰/۳۰

چکیده

در این آزمایش فراسنجه‌های تخمیرپذیری یک جیره کاملا مخلوط (TMR) در اثر افزودن مقادیر مختلف آفت کش ارگانوفسفره فوزالون (۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰پی پی ام) همراه با مقادیر مختلف بنتونیت (صفر، ۱ و ۲ درصد ماده خشک TMR)به روش آزمایشگاهی کشت ثابت و تولید گاز تعیین شد. نتایج حاصل از تولید گاز نشان داد که میزان تولید گاز بصورت تجمعی در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون، با افزایش مقادیر مختلف فوزالون به محیط کشت، از یک روند کاملا نزولی معنی داری در بین تیمارها برخوردار بود، به طوری که کمترین میزان تولید گاز برای سطح ۱۰۰۰ پی پی ام مشاهده گردید. همچنین با افزایش مقادیر فوزالون به محیط کشت ثابت، میزان تجزیه پذیری ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی، روند نزولی معنی داری در بین تیمارها داشت، به طوری که بیشترین و کمترین میزان نیتروژن آمونیاکی مربوط به تیمار شاهد (بدون هیچ افزودنی) و تیمار ۱۰۰۰ پی پی ام بود. با افزایش فوزالون به محیط کشت، pH در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون ثابت ماند، اما با افزایش سطح بنتونیت (بویژه سطح دو درصد)، pH روند نسبتا صعودی داشت. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش سطوح فوزالون از ۰ به ۱۰۰۰ پی پی ام به محیط کشت، برخی فاکتورهای تخمیرپذیری (همانند تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون، نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پذیری ماده خشک) کاهش یافته، همچنین افزودن بنتونیت نسبت به گروه شاهد در تیمارهایی که هیچ سمی دریافت نکرده بودند، باعث کاهش میزان تولید گاز در زمان ۹۶ ساعت بعد از انکوباسیون گردید و این در حالی بود که بطور کلی افزودن توام بنتونیت(بویژه سطح دو درصد) به مقادیر مختلف فوزالون، نیز باعث کاهش تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون گردید. در اثر افزودن بنتونیت به محیط کشت، اختلاف معنی داری برای تجزیه پذیری ماده خشک در بین تیمارها مشاهده نشد، هرچند که تنها با افزودن بنتونیت در سطح ۱۰۰ پی پی ام فوزالون، تجزیه پذیری ماده خشک به طور معنی داری افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آفت کش، فوزالون، TMR، تولید گاز، بنتونیت

مقدمه

بشر در طول قرن‌های متمادی روشهای مختلفی را جهت کنترل آفاتی که تامین غذا، محصولات زراعی و سلامتی آنها را به مخاطره می‌اندازد بکار برده است. امروزه با توجه به نیاز روزافزون به تولیدات کشاورزی و مواد غذایی به علت رشد روزافزون جمعیت، کاربرد سموم و مبارزه شیمیایی، نقش اصلی را در حفاظت گیاهان مورد کشت از گزند عوامل مخرب، ایفا می‌کند به طوری که این روش به مراتب بیش از سایر روشهای مبارزه مورد استفاده قرار گرفته و اغلب به علت عدم آشنایی کافی مصرف کنندگان سموم شیمیایی از اصول صحیح مبارزه، این کار بطور ناقص و یا بی رویه صورت می‌گیرد، در نتیجه علاوه بر عدم حصول نتیجه مطلوب در دراز مدت موجب بهم خوردن تعادل طبیعی شده و اثرات زیانباری بر محیط زیست و همچنین سلامت افراد جامعه برجای می‌گذارد. سموم ارگانوفسفره سنتتیکی در ابعاد وسیع برای کنترل آفات، بهداشت شهری و کنترل انتقال بیماری‌ها استفاده می‌شوند، این سموم از طریق ممانعت از فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، اثرات خود را بر روی بسیاری از موجودات زنده از جمله انسان بر جای میگذارند به طوری که مصرف بی رویه و غیر اصولی این سموم باعث شده است که مقدار زیادی از بقایای این

۱- استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت جام
(*- نویسنده مسئول: Email: phd1388@gmail.com)
۲ ، ۳ و ۴- استادان گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵- دانشیار گروه داخلی مسمومین، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۶- دانشجوی دکتری گیاهپزشکی، شرکت خصوصی پارس طراوت

سموم مضر برای سیستم عصبی، در خاک و آب‌های زیر زمینی و محصولات کشاورزی و باغی باقی بماند (۲۳ و ۲۴). معمولا بقایای سموم موجود در علوفه و خوراک پس از مصرف دام، در اغلب بافت‌های بدن حیوان و همچنین در شیر و چربی بدنی و مدفوع و خون و غیره ظاهر می‌شوند (۲۲). اطلاعات بسیاری در خصوص انتقال سموم ارگانوکلره به شیر و یا سایر فرآورده‌های دامی گزارش شده است (۱۵) ولی در خصوص سموم ارگانوفسفره اطلاعات کمی وجود دارد. شاید شکمبه حیوانات نشخوارکننده اولین سد دفاعی بدن در خصوص جلوگیری از انتقال این سموم به فرآورده‌های دامی از طریق هیدرولیز آن‌ها و تبدیل به فرآوردهای ثانویه کم خطرتر باشد (۵). به عنوان مثال ثابت شده است که حشره کش ددت (DDT) به محض ورود به شکمبه در اثر فعالیت میگروارگانیزم‌های شکمبه به ترکیب کم خطرتری از قبیل DDD که همان مشتقات ثانویه DDT هستند، تبدیل می‌شود (۳، ۸ و ۹). محققین زیادی از روش تولید گاز برای برآورد ارزش کیفی بعضی از مواد افزودنی، فرآورده‌های خوراکی دامی، گیاهان وغیره استفاده کرده اند (۱و۲). تولید گاز توسط پروتوزوآهای هولوتریش شکمبه‌ای (در یک محیط کشت خالص) توسط بعضی آفت کش‌های ارگانوکلره، ارگانوفسفره و کربامات ها، افزایش یافته است اما در یک محیط کشت حاوی باکتری ها، این آفت کش‌ها نتوانسته اند باعث افزایش تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی گردند (۲۱). مطالعات نشان داده است که با افزایش سطوح آفت کش هایی مثل DDT ، مالاتیون، سوین و توکزافن به محیط کشت حاوی مایع شکمبه در شرایط آزمایشگاهی، تجزیه پذیری ماده خشک و شمار پروتوزوآها کاهش یافته است (۱۴).

فوزالون جزو آفت کش‌های ارگانوفسفره بوده و برای از بین بردن طیف وسیعی از آفات در ایران و سایر نقاط دنیا بکار برده می‌شود. این آفت کش اولین بار در سال ۱۹۶۳ توسط کمپانی Rhone-poulenc به عنوان یک حشره کش غیر سیستمیک و کرم کش وارد بازار شد (۱۰). بسته به نوع و درجه شیوع آفت و نوع محصول زراعی، سطوح کاربردی این سم متفاوت بوده و بنابراین استفاده از سطوح مختلف این سم می‌تواند باعث پدیدار شدن غلظت‌های متفاوتی از آن در سطح مزرعه بشود که بخشی از این کار به مدیریت کشاورز و فرد سمپاش بستگی دارد. با این وجود مقدار این آلودگی در سطح مزرعه ممکن است متفاوت باشد ولی معمولا میزان مصرف این سم برای دفع آفات در حدود ۱/۵ تا ۵/۵ لیتر در هکتار (با ۳۵ درصد ماده موثره) در سطح مزارع متغیر می‌باشد. همچنین محققین، گزارشات مختلفی در خصوص آلودگی مواد خوراکی و محصولات زراعی با این نوع سم، ارایه داده اند. تحقیقات اخیر نشان داده است که بهترین و در عین حال با صرفه ترین شیوه کاهش بروز اختلالات مربوط به سموم دفع آفات و یا جلوگیری از انتقال این سموم به شیر و سایر فرآورده‌های دامی، استفاده از مواد جاذب و یا مواد باند کننده می‌باشند معمولا این ترکیبات، با ماده موثره سم موجود در خوراک آلوده ترکیب شده و در نهایت از طریق مدفوع حیوان دفع می‌گردد و بدین صورت از جذب سموم جلوگیری کرده و یا آن را به حداقل می‌رساند. از جمله مواد باند کننده سموم می‌توان به ترکیبات جاذب معدنی رسی، بنتونیت، زئولیت، اکسید منیزیم، زغال فعال شده و غیره اشاره نمود (۷ و ۹). بنتونیت، یک شبکه رسی توسعه یافته متشکل از گروههای مونتموریلونیت مینرالی (Mineral Montmorillonite) است که از ظرفیت تبادل یونی بالایی برخوردار بوده و میتواند انواع مختلفی از کاتیون‌ها را با خود باند کند (۷). درباره اثرات نامطلوب آفت کش‌ها بویژه ارگانوفسفره‌ها بر روند تخمیرپذیری در شرایط آزمایشگاهی و همچنین اثرات استفاده از توکسین بایندرهایی مثل بنتونیت بویژه در خصوص فوزالون تحقیقات کمی صورت گرفته است. بنابراین هدف از انجام این آزمایش بررسی اثرات سمی مقادیر مختلف فوزالون بر فراسنجه‌های تخمیر پذیری در شرایط آزمایشگاهی و تاثیر بنتونیت به عنوان یک توکسین بایندر در کاهش اثرات احتمالی سوء فوزالون می‌باشد.

مواد و روش ها

در این آزمایش از یک جیره پایه حاوی ۵۰ درصد سیلاژ یونجه و ۵۰ درصد کنسانتره استفاده گردید (جدول ۱). جیره پایه با استفاده از غربال ۱/۵ میلیمتری آسیاب گردید. سطوح متفاوتی از فوزالون خالص (Fluka, America) به نسبتهای ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام و بنتونیت به نسبتهای ۰ ، ۱و۲ درصد ماده خشک جیره پایه به محیط کشت اضافه گردید. بعبارت دیگر در این آزمایش به ازای هر میلی لیتر از محیط کشت، مقادیر مختلفی از فوزالون (صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر محیط کشت) در حجم مشخصی از هگزان حل گردید و قبل از اینکه مایع شکمبه و بافر به شیشه‌ها اضافه گردد، بر روی جیره آزمایشی درون شیشه اسپری گردید و درب شیشه‌ها به مدت ۲۴ ساعت جهت تبخیر کامل هگزان از محیط کشت باز گذاشته شد. همچنین به تیمارهای شاهد نیز فقط هگزان خالی اسپری گردید. اندازه گیری مقدار تولید گاز با استفاده از فشار سنج کمی (PTB330, Env Company) و بطری‌های شیشه‌ای (۱۲۰ میلی لیتری) محتوی بزاق مصنوعی (مطابق با روش منک و استینگاس (۱۶))و مایع شکمبه صاف شده به نسبت ۱:۲ (حدود ۵۰ میلی لیتر) و ۵۰۰ میلی گرم ماده خشک از نمونه مورد آزمایش (۵ تکرار برای هر تیمار) انجام شد. مایع شکمبه از چهار رأس گاو نر هلشتاین (با وزن زنده ۱۲±۴۲۰ کیلوگرم) دارای فیستولای شکمبه ای که با جیره حاوی ۵۰:۵۰ علوفه: کنسانتره (جو آسیاب شده، ذرت آسیاب شده و سبوس گندم:سیلاژ ذرت و یونجه خشک) و در حد احتیاجات نگهداری تغذیه می‌شدند، قبل از خوراک

وعده صبح به دست آمد. همچنین ۵ شیشه فاقد ماده خوراکی به عنوان عامل تصحیح برای تصحیح گاز تولید شده توسط ذرات باقیمانده در مایع شکمبه در نظر گرفته شد. درب بطری های شیشه‌ای (با حجم ۱۲۰ میلی لیتر) با استفاده از درپوش لاستیکی و پوشش آلومینیومی به طور کامل بسته شده و در بن ماری با دمای ۳۹ درجه سانتیگراد قرار داده شد و با ثبت فشار گاز تولید شده در زمانهای ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون و با استفاده از رابطه تئودورو و همکاران (۲۰)، حجم گاز تولید شده در هر زمان به دست آمد. تولید تجمعی گاز در زمان‌های مختلف محاسبه شده و بر اساس مدل آماری اسوجی و همکاران (۱۷) $\{P=b(1-e^{-ct})\}$ و با استفاده از نرم افزار آماری SAS(version 9.1) (۱۹)، نرخ تولید گاز (c) و مقدار تولید گاز (b) به صورت تجمعی در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون برآورد گردید.

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره پایه آزمایشی

اجزا(درصد ماده خشک)	مقدار
سیلاژ یونجه	۵۰
جو آسیاب شده	۱۳
ذرت آسیاب شده	۱۰
کنجاله سویا با پروتئین ۴۴٪	۹
سبوس گندم	۴
کنجاله تخم پنبه	۶
تخم پنبه	۷
نمک	۰/۵
مکمل مینرالی-ویتامینی	۰/۵
ترکیب شیمیایی(درصد ماده خشک)	
پروتیین خام	۲۲/۲
چربی خام	۳/۵
NDF	۳۴/۶
ADF	۲۳/۴
NFC	۳۵
انرژی قابل متابولیسم(Mcal/Kg DM)	۲/۵۳

از یک محیط کشت مشابه که برای آزمایش تولید گاز استفاده شده بود، برای کشت ثابت (تمام مواد شیمیایی و شرایط کار مشابه محیط کشت برای تولید گاز بود با این تفاوت که به فاصله هر ۲ ساعت مجموع گاز تجمع یافته در بطری‌های شیشه ای به طور مرتب خالی می‌شد تا از اثرات سوء تجمع گازها بر فرایند تخمیر کاسته شود) در نظر گرفته شد. درب شیشه‌های حاوی تیمارهای مختلف پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون باز گردید و بلافاصله pH آن‌ها تعیین شد و مقداری از محتویات داخل هر شیشه جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی برداشته شد و با حجم مساوی اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط گردید و بلافاصله به سردخانه با دمای ۱۸- درجه سانتیگراد انتقال داده شد.

غلظت نیتروژن آمونیاکی بر اساس روش کجلدال (Kjeltec 2300 Autoanalyzer, Foss Tecator AB, Hongas, Sweden) تعیین گردید. به طور خلاصه ۵ میلی لیتر از مخلوط محیط کشت و اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به داخل فلاکس هضم انتقال گردید، سپس با تترابورات سدیم ۱۰ آبه (مرک آلمان) (۱۶ گرم در لیتر) تقطیر گردید و با محلول ۰/۱ نرمال اسید کلریدریک به صورت اتوماتیک تیتر شد (۴). همچنین برای تعیین تجزیه پذیری ماده خشک، تمام محتوای داخل شیشه‌ها (کشت ثابت) با استفاده از کیسه نایلونی با منافذ ۵۰ میکرونی صاف گردید و محتوای صاف شده به داخل کروزه‌های چینی انتقال داده شد. سپس کروزه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد جهت خشک شدن کامل، قرار گرفتند 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. مراحل انجام آزمایش در چهار مرحله جداگانه و با شرایط یکسان صورت گرفت تا از این طریق از خطای آزمایشی کاسته شود. همچنین در این آزمایش از مدل آماری فاکتوریل ۳×۶ (۶ سطح فوزالون و سه سطح بنتونیت) با طرح پایه کاملا تصادفی استفاده گردید و اختلاف بین تیمارها با روش دانکن در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS(version 9.1) محاسبه شد. همچنین ضریب همبستگی بین برخی پارامترهای تولید گاز با سایر پارامترهای تخمیری با همین نرم افزار تعیین گردید. مدل آماری طرح و اجزای آن به شرح زیر است :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده

μ = میانگین پارامتر مورد مطالعه

α_i = اثر سم فوزالون

β_j = اثر بنتونیت

$(\alpha\beta)_{ij}$ = اثر متقابل فوزالون و بنتونیت

ε_{ijk} = خطای آزمایش

نتایج و بحث

تجزیه پذیری ماده خشک

نتایج حاصل از برآورد تجزیه پذیری ماده خشک در جدول ۲ آورده شده است. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که با افزایش سطوح فوزالون به محیط کشت، میزان تجزیه پذیری ماده خشک در بین تیمارهای آزمایشی به طور معنی داری کاهش پیدا کرده ($P<0/0001$) به طوری که کمترین میزان تجزیه پذیری ماده خشک در اثر استفاده ازسطح ۱۰۰۰ پی پی ام فوزالون در محیط کشت مشاهده گردید و میزان تجزیه پذیری ماده خشک نسبت به تیمار شاهد تا ۲۵ درصد کاهش یافت. کاچز و همکاران (۱۴) مشاهده کردند

که با افزایش استفاده از سطوح بعضی آفت کش‌ها مثل DDT، مالاتیون، سوین و توکزافن روند تجزیه پذیری ماده خشک نسبت به گروه شاهد کاهش یافت هرچند که در بین این آفت کش ها، توکزافن از روند کاهشی بیشتری در تجزیه پذیری ماده خشک برخوردار بود و این نشان می‌دهد که درجه سمیت آفت کشهای مختلف بر روی فعالیت میکروارگانیزم‌ها متفاوت می‌باشد. دراثر افزودن بنتونیت به محیط کشت، اختلاف معنی داری در تجزیه پذیری ماده خشک بین تیمارها مشاهده نشد، هرچند که تنها با افزودن بنتونیت در سطح ۱۰۰ پی پی ام فوزالون، تجزیه پذیری ماده خشک افزایش یافت (p<۰/۰۱) و بنظر می‌رسد که از لحاظ عددی کاربرد سطوح بالاتر بنتونیت (۲ درصد) کارایی بیشتری در بالا بردن مقدار تجزیه پذیری ماده خشک در صورت استفاده توام بنتونیت با فوزالون داشته باشد. صالح (۱۸) گزارش کرد استفاده از ۲/۵ درصد بنتونیت در جیره، باعث افزایش معنی داری (P<۰/۰۵) تجزیه پذیری ماده خشک گردید. اما جاسکوز و همکاران (۱۳) متوجه شدند که افزودن ۲ یا ۱۰ درصد بنتونیت به جیره گاوهای شیری، باعث کاهش در تجزیه پذیری ماده خشک گردید. ال ابید و همکاران (۶) گزارش کردند که با افزایش استفاده از سطوح فوزالون، اندوسولفان و کلرپیریفوس از ۰ به ۱۵ پی پی ام در محیط کشت حاوی مایع شکمبه، تجزیه پذیری ماده خشک به طور معنی داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵) که با نتایج این آزمایش همخوانی دارد. در این آزمایش اثرات متقابل فوزالون و بنتونیت برای تجزیه پذیری ماده خشک معنی دار نشد.

نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت

تاثیر سطوح مختلف فوزالون همراه با سطوح مختلف بنتونیت بر pH و نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت ثابت در زمان ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲-تاثیر سطوح مختلف فوزالون همراه با سطوح مختلف بنتونیت بر تجزیه پذیری ماده خشک جیره کاملا مخلوط در زمان ٢٤ ساعت بعد از انکوباسیون در محیط کشت ثابت

سطوح فوزالون(ppm)	سطوح بنتونیت (درصد ماده خشک جیره)	تجزیه پذیری ماده خشک(درصد)
۰	۰	۶۷/۰۰^{a}
۰	۱	۶۶/۷۲^{a}
۰	۲	۶۷/۹۶^{a}
۱۰۰	۰	۵۸/۶۰^{b}
۱۰۰	۱	۶۶/۰۸^{a}
۱۰۰	۲	۶۷/۸۴^{a}
۲۵۰	۰	۵۶/۰۸^{b}
۲۵۰	۱	۵۵/۹۲^{bc}
۲۵۰	۲	۵۷/۶۸^{b}
۵۰۰	۰	۵۴/۵۲^{bcd}
۵۰۰	۱	۵۴/۸۸^{bcd}
۵۰۰	۲	۵۵/۳۲^{bcd}
۷۵۰	۰	۵۱/۰۸^{cde}
۷۵۰	۱	۴۹/۲۰^{e}
۷۵۰	۲	۵۴/۱۲^{bcde}
۱۰۰۰	۰	۵۰/۰۰^{de}
۱۰۰۰	۱	۴۹/۰۴^{e}
۱۰۰۰	۲	۵۱/۷۶^{cde}
SEM		۱/۶۶
	اثرات فاکتوریل	
فوزالون		p<۰/۰۰۰۱
بنتونیت		p<۰/۰۱
فوزالون×بنتونیت		Ns

مینگین های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف کعنی دار می باشند (P< ۰/۰۵)

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که با افزایش سطوح فوزالون به محیط کشت، میزان نیتروژن آمونیاکی در بین تیمارهای آزمایشی به طور معنی داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۰۰۱) به طوریکه کمترین این مقدار در اثر استفاده ازسطح ۱۰۰۰ پی پی ام از فوزالون در محیط کشت مشاهده گردید و میزان نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد تا ۲۱ درصد کاهش یافت. ال ابید و همکاران (۶) مشاهده کردند که افزایش سطوح فوزالون، اندوسولفان و کلرپیریفوس به محیط کشت حاوی مایع شکمبه، باعث افزایش معنی داری در نیتروژن آمونیاکی می‌شود، که با نتایج این آزمایش مغایرت دارد (P<۰/۰۵).

در این آزمایش همچنین افزودن بنتونیت در تیمارهای فاقد فوزالون، باعث کاهش مقدار نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت بویژه در سطح ۲ درصد بنتونیت نسبت به گروه شاهد گردید (P<۰/۰۰۰۱).

صالح (۱۸) گزارش کرد که بنتونیت قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالاست، آن را جذب کرده و پس از اینکه غلظت آن در محیط کاهش یافت، شروع به آزاد کردن مجدد آمونیاک می‌کند. بنابراین اضافه کردن بنتونیت به جیره می‌تواند تا حدودی دسترسی میکروارگانیزم‌ها به نیتروژن را متعادل ساخته و همچنین به عنوان یک ماده افزودنی با ارزش در جهت بهبود ارزش غذایی خوراک مدنظر قرار بگیرد (۷). والاس و نیوبولد (۲۱) گزارش کردند که اضافه کردن بنتونیت به جیره، منجر به کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به گروه شاهد گردید.

به طور کلی pH محیط کشت با افزایش سطوح فوزالون، تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت اما با افزایش سطوح بنتونیت، pH از لحاظ عددی تمایل به افزایش داشت.

جدول ۳-تاثیر سطوح مختلف فوزالون همراه با سطوح مختلف بنتونیت بر pH و نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت ثابت در زمان ۲٤ ساعت بعد از انکوباسیون

سطوح فوزالون(ppm)	سطوح بنتونیت(درصد از ماده خشک جیره)	pH	نیتروژن آمونیاکی(mg/dl)
۰	۰	۶/۷۰^{c}	۱۸/۸۸^{a}
۰	۱	۶/۷۳^{bc}	۱۸/۲۶^{ab}
۰	۲	۶/۷۵^{b}	۱۷/۸۰^{cde}
۱۰۰	۰	۶/۷۱^{bc}	۱۸/۲۴^{ab}
۱۰۰	۱	۶/۷۳^{bc}	۱۷/۹۸^{bc}
۱۰۰	۲	۶/۷۲^{bc}	۱۸/۲۰^{ab}
۲۵۰	۰	۶/۷۱^{c}	۱۷/۴۸^{bcd}
۲۵۰	۱	۶/۷۲^{bc}	۱۷/۲۴^{cde}
۲۵۰	۲	۶/۷۲^{bc}	۱۷/۲۶^{cde}
۵۰۰	۰	۶/۷۰^{c}	۱۷/۱۳^{de}
۵۰۰	۱	۶/۷۲^{bc}	۱۶/۶۰^{e}
۵۰۰	۲	۶/۷۳^{bc}	۱۶/۵۲^{e}
۷۵۰	۰	۶/۷۳^{bc}	۱۶/۵۴^{e}
۷۵۰	۱	۶/۸۲^{a}	۱۵/۲۸^{f}
۷۵۰	۲	۶/۸۴^{a}	۱۴/۹۷^{f}
۱۰۰۰	۰	۶/۷۲^{bc}	۱۴/۸۴^{f}
۱۰۰۰	۱	۶/۸۴^{a}	۱۳/۹۴^{g}
۱۰۰۰	۲	۶/۸۶^{a}	۱۳/۸۱^{g}
SEM		۰/۰۱۳	۰/۲۵۰
اثرات فاکتوریل			
فوزالون		p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱
بنتونیت		p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱
فوزالون×بنتونیت		p<۰/۰۰۰۱	Ns

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می‌باشند (P <۰/۰۵)

همچنین pH در سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام همراه با ۲ درصد بنتونیت به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵). ال ابید و همکاران (۶) گزارش کردند که افزایش سطوح فوزالون به محیط کشت حاوی مایع شکمبه نسبت به تیمار شاهد، تاثیر معنی داری بر pH محیط کشت ندارد که با نتایج حاصل از این آزمایش، همخوانی دارد. ایوان و همکاران (۱۲)، مشاهده کردند که با افزودن سطوح مختلف بنتونیت به جیره، تغییری در pH محیط شکمبه مشاهده نگردید. در این آزمایش، اثرات متقابل بنتونیت و فوزالون برای pH محیط کشت معنی دار بود (p< ۰/۰۰۰۱) ولی این اثر برای نیتروژن آمونیاکی معنی دار نبود. معنی دار بودن اثر متقابل pH شاید تا حدودی به دلیل تاثیر بنتونیت بر جمعیت میکروب‌ها در محیط کشت و همچنین تفاوت در ترکیب مواد معدنی موجود در ساختمان بنتونیت بوده که از این طریق تا حدودی از فرایند کاهش pH کاسته است.

تولید گاز

تاثیر سطوح مختلف فوزالون همراه با سطوح مختلف بنتونیت بر میزان تولید گاز در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ پس از شروع انکوباسیون و نرخ و مجموع کل تولید گاز در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تیمارها تحت تاثیر سطوح مختلف فوزالون قرار گرفته اند.

به طوری که با افزایش سطوح فوزالون از ۰ به ۱۰۰۰ پی پی ام، نرخ تولید گاز در هر ساعت و میزان تولید گاز به صورت تجمعی در زمان ۲۴ و ۴۸ و ۹۶ ساعت انکوباسیون به طور معنی داری کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱). ویلیامز و همکاران (۲۲) گزارش کردند که اضافه کردن تیودان و سوین (دو آفت کش که برای از بین بردن طیف وسیعی از آفات و حشره‌ها بکار برده می‌شوند) به محیط کشت حاوی پروتوزوآی هولوتریش، باعث افزایش تولید گاز می‌شود.

جدول ٤-تاثیر سطوح مختلف فوزالون همراه با سطوح مختلف بنتونیت بر میزان تولید گاز در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٩٦ ساعت انکوباسیون و نرخ تولید گاز

سطوح فوزالون (ppm)	سطوح بنتونیت (درصد ماده خشک جیره)	تولید گاز (میلی لیتر در ٢٤ ساعت)	تولید گاز (میلی لیتر در ٤٨ ساعت)	تولیدگاز (میلی لیتر در ٩٦ ساعت)	نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت)
۰	۰	۸۷/۱۳۴^{a}	۱۰۶/۱۲۰^{a}	۱۰۸/۹۱۷^{a}	۰/۰۶۶^{bcd}
۰	۱	۸۴/۵۹۵^{ab}	۱۰۰/۷۵۴^{ab}	۱۰۵/۲۹۰^{ab}	۰/۰۶۸^{ab}
۰	۲	۷۱/۸۱۵^{cd}	۸۹/۷۳۰^{c}	۹۷/۲۰۸^{cd}	۰/۰۵۳^{ef}
۱۰۰	۰	۸۱/۱۳۹^{b}	۹۷/۶۳۶^{b}	۱۰۱/۹۹۲^{bc}	۰/۰۶۷^{bc}
۱۰۰	۱	۷۳/۲۳۴^{c}	۹۰/۳۵۷^{c}	۹۶/۶۶۷^{cd}	۰/۰۵۷^{e}
۱۰۰	۲	۶۹/۵۹۵^{cd}	۸۵/۶۱۸^{cd}	۹۱/۱۵۲^{de}	۰/۰۵۸^{de}
۲۵۰	۰	۷۴/۹۹۰^{c}	۸۸/۷۵۵^{c}	۹۲/۷۰۰^{de}	۰/۰۷۴^{a}
۲۵۰	۱	۷۰/۹۸۵^{cd}	۸۵/۷۷۳^{cd}	۹۲/۰۳۶^{de}	۰/۰۶^{cde}
۲۵۰	۲	۶۶/۳۶۱^{d}	۸۱/۷۲۸^{d}	۸۸/۱۶۸^{e}	۰/۰۵۸^{de}
۵۰۰	۰	۵۹/۶۸۲^{e}	۷۳/۱۴۷^{e}	۷۹/۰۶^{f}	۰/۰۵۶^{e}
۵۰۰	۱	۵۱/۸۷۲^{f}	۶۷/۸۱۹^{ef}	۸۱/۰۹۷^{f}	۰/۰۴۴^{gh}
۵۰۰	۲	۴۸/۶۹۷^{f}	۶۵/۲۳۲^{f}	۷۷/۱۶۷^{f}	۰/۰۴۰^{hi}
۷۵۰	۰	۴۱/۰۰۴^{g}	۵۲/۵۸۷^{g}	۷۷/۴۰۷^{g}	۰/۰۴۸^{gf}
۷۵۰	۱	۲۹/۸۶۵^{h}	۴۲/۴۹۱^{h}	۵۶/۶۹۲^{g}	۰/۰۲۸^{kj}
۷۵۰	۲	۳۱/۵۸۳^{h}	۴۳/۸۲۲^{h}	۵۵/۴۰۱^{g}	۰/۰۳۲^{kj}
۱۰۰۰	۰	۳۲/۲۹۷^{h}	۴۲/۰۰۸^{h}	۵۲/۷۹۲^{g}	۰/۰۳۵^{ij}
۱۰۰۰	۱	۱۹/۹۱۷^{i}	۲۸/۶۶۲^{i}	۴۶/۱۳۸^{h}	۰/۰۲^{l}
۱۰۰۰	۲	۲۳/۰۷۰^{i}	۳۱/۳۷۱^{i}	۴۳/۸۰۱^{h}	۰/۰۲۶^{kl}
SEM		۱/۹۱۷	۲/۰۳۰	۲/۲۵۷	۰/۰۰۲۵
اثرات فاکتوریل					
فوزالون		p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱
بنتونیت		p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱	p<۰/۰۰۰۱
فوزالون×بنتونیت		p<۰/۰۵	p<۰/۰۵	p<۰/۰۱	NS

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می‌باشند (P <۰/۰۵)

تولید گاز نتیجه‌ای از فعالیت تخمیری میکروارگانیزم‌ها در محیط شکمبه و محیط کشت می‌باشد، از این‌رو آفت کش‌ها می‌توانند بر روی جمعیت میکروارگانیزم‌ها اثرات منفی گذاشته که متعاقبا باعث کاهش تولید گاز در محیط کشت خواهند شد هر چند که سرنوشت آفت کش‌ها در محیط، نیز تحت تاثیر فعالیت میکروب‌های موجود در آن محیط قرار می‌گیرد و بعضی آفت کش‌ها براحتی توسط میکروارگانیزم‌ها تجزیه می‌شوند و بعضی دیگر در مقابل تجزیه شدن از خود مقاومت نشان می‌دهد. بنابراین اثرات سمیت زا بودن بعضی از آفت کش‌ها می‌تواند تا حدود زیادی از میزان تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی بکاهد. بنتونیت، اکثر فرآورده‌های سمی را در محیط جذب کرده و از تجمع آن‌ها در بافت‌های مختلف می‌کاهد (۱۱). در این آزمایش افزودن بنتونیت به محیط کشت، نتوانسته است از اثرات مضر فوزالون بر محیط کشت در خصوص تولید گاز بکاهد، همچنین استفاده از سطح ۲ درصد بنتونیت در محیط کشت یک اثر ممانعت کنندگی بیشتری بر تولید گاز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت انکوباسیون در تمام سطوح فوزالون داشت. در این آزمایش اثرات متقابل فوزالون و بنتونیت برای تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت انکوباسیون (به ترتیب با سطوح معنی داری $p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$) معنی دار بود ولی در عین حال این اثرات برای نرخ تولید گاز معنی دار نبود. به نظر می‌رسد که اثرات ممانعت کنندگی بنتونیت و فوزالون در اثر استفاده توام با یکدیگر، بر فرایند تولید گاز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت چشمگیرتر بوده به طوری که سطح معنی داری این اثر متقابل برای تولید گاز در زمان ۹۶ ساعت نسبت به بقیه بیشتر بوده است.

همبستگی نتایج تولید گاز با pH، نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پذیری ماده خشک

ضریب همبستگی بین برخی فاکتورهای تخمیری (pH، نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پذیری ماده خشک) با تولید گاز در جدول ۵ آورده شده است. با توجه به داده های جدول، همبستگی موافق و معنی‌داری بین تولیدگاز با تجزیه پذیری ماده ی خشک و نیتروژن آمونیاکی وجود دارد ($p <۰/۰۰۰۱$). در این قسمت، مقایسه سطوح همبستگی بین تجزیه پذیری ماده خشک و تولید گاز در تمام سطوح کاربردی فوزالون صورت گرفته است، بعبارت دیگر رابطه همبستگی مثبت و همسو بین تجزیه پذیری ماده خشک و تولید گاز نشان می‌دهد که با افزایش سطوح فوزالون از ۰ به ۱۰۰۰ پی پی ام به جیره، میزان تجزیه پذیری و تولید گاز تواما با یک روند کاهشی مواجه شده است. همچنین همبستگی منفی و معنی داری بین تولید گاز و pH در بین تیمارها وجود داشت ($p <۰/۰۰۰۱$). در بین فاکتورهای تخمیری بیشترین ضریب همبستگی مربوط به نیتروژن آمونیاکی با تولید گاز و پارامترهای برآورد شده از آن می‌باشد. همچنین بیشترین میزان همبستگی بین فاکتورهای تخمیری و تولید گاز در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون مشاهده گردید. همچنین نتایج حاکی از آن است که از لحاظ عددی یک همبستگی مثبت تر و بیشتری بین تولید گاز در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون با تجزیه پذیری ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی وجود داشته، هرچند که رابطه همبستگی این زمان انکوباسیون با pH محیط کشت نسبت به سایر پارامترهای تولید گاز از لحاظ عددی منفی تر می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که با افزایش سطوح فوزالون به محیط کشت، روند تخمیرپذیری شکمبه ای (تولید گاز، تجزیه پذیری ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی) بشدت کاهش یافته و در حقیقت فوزالون اثرات مسمومیتی بر جمعیت میکروبها میگذارد و نیز بنتونیت به عنوان یک توکسین بایندر بر روی برخی پارامترهای تخمیری مثل تولید گاز تا حدودی اثر منفی داشته و در مقابل، راندمان تجزیه پذیری ماده خشک تحت تاثیر اضافه کردن سطوح مختلف بنتونیت قرار نگرفت، هرچند که تنها با افزودن بنتونیت در سطح ۱۰۰ پی پی ام فوزالون، تجزیه پذیری ماده خشک افزایش یافت.

جدول ۵-ضریب همبستگی بین برخی فاکتورهای تخمیری (pH، نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پذیری ماده خشک) با تولید گاز

تولید گاز و پارامترهای آن	فاکتورهای تخمیری		
	تجزیه پذیری ماده خشک	نیتروژن آمونیاکی	pH
۱۲	۰/۳۸۷****	۰/۶۸۳****	-۰/۶۱۲****
۲۴	۰/ ۷۰۴****	۰/۸۹۶****	-۰/۶۷۰****
۴۸	۰/۷۱۵****	۰/۹۰۷****	-۰/۶۷۳****
b_{gas} [۱]	۰/۷۱۰****	۰/۸۸۶****	-۰/۶۶۷****
C_{gas} [۲]	۰/۵۶۵****	۰/۸۲۵****	-۰/۶۶۲****

۱- مجموع گاز تولید شده از بخش کربوهیدرات‌های محلول و بخش نامحلول(میلی لیتر در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون)؛ ۲ - نرخ تولید گاز(میلی لیتر در هر ساعت)

**** $p <۰/۰۰۰۱$

گزارشات در خصوص استفاده از توکسین بایندرها متفاوت می‌باشد، با این حال بنتونیت از لحاظ ترکیب ساختمانی و بافت متفاوت بوده و این خود می‌تواند بر فعال بودن و یا نبودن آن در خصوص جذب سموم در سایر محیطها موثر باشد. در مجموع به نظر می‌رسد که باید کیفیت توکسین بایندرهای مختلفی که در سطوح تجاری ساخته می‌شوند، با انجام مراحل تحقیقاتی مختلف محک زده شود و همچنین می‌توان کارایی توکسین بایندرها را از طریق فرآوری شیمیایی و یا فیزیکی تا حدود زیادی بهبود بخشید. همچنین باید سطوح سمی آفت کش‌های مختلف را که برای میکروارگانیزمهای شکمبه ای می‌تواند خطرساز باشد، تعیین نمود تا از این طریق بتوان راهکارهای عملی و موثرتری را برای حذف اثرات سمی آن‌ها پیاده نمود.

تشکر و قدردانی

در پایان بر خود لازم می‌دانیم از حمایت‌های مالی و تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد و همچنین شرکت گیاهپزشکی پارس طراوت که همکاری صمیمانه ای در ایجاد زمینه ی لازم جهت اجرای آزمایشات فوق داشته اند، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

منابع

۱- ولی زاده، ر.، م. قدمی کوهستانی و ف. ملتی. ۱۳۹۰. تعیین ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی گیاه اروشیا *(Eurotia ceratoides)* با استفاده از روش کیسه‌های نایلونی و تولید گاز. مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران. ۳(۲):۱۵۹ تا ۱۶۹.

۲- مختارپور، ا.، ع. ع. ناصریان، ر. ولی زاده و ع. م. طهماسبی. ۱۳۹۱. تاثیر سیلاژ محصولات فرعی پسته عمل آوری شده با پلی اتیلن گلیکول و اوره بر ترکیبات فنولی و تولید گاز در شرایط برون تنی و عملکرد گاوهای شیری هلشتاین. مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران. ۴(۱):۵۵ تا ۶۱.

3- Aislabie, J., and G. Lloyd-Jones. 1995. A review of bacterial-degradation of pesticides. Aust. J. Soil Res. 33(6) 925 – 942.

4- Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, Y. Dong, B. I. Far, and K. J. Cheng. 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. J. Anim. Sci. 72:236-274.

5- Cook, R. M., and K. A. Wilson. 1971. Removal of pesticide residues from dairy cattle. J. Dairy Sci. 54:712-717.

6- El-Obied, G. H., F. A. Ahmed, N. H. H. Bashir. 2005. *In vitro* effects of some insecticides on rumen fluid fermentation. Gez. J. Agric. Sci. 3(1): 80-89.

7- 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. Aust. J. Agric. Res. 40: 889-896.

8- Fries, G. F., W. P. Flatt, and L. A. Moree. 1969. Energy balances and excretion of DDT into milk. J. Dairy Sci. 52:684–695.

9- Ghanem, Gh. A. 1995. Additives in feeding farm animals. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture, Kafr El-Sheikh, Tanta University.

10- Hayes, W. J., and E. R. Laws. 1990. Handbook of Pesticide Toxicology, General Principles, Vol. 1 and 2. Academic Press, Inc., NY.

11- Huntington, G. B., R. J. Emerick, and L. B. Embry. 1977. Sodium bentonite, effects when fed at various levels with high concentrate diets to lambs. J. Anim. Sci. 45:119-131.

12- Ivan, M., M. De. Se. Dayrell, S. Mahadeven, and M. Hidiroglou. 1992. Effect of bentonite on wool growth and nitrogen metabolism in fauna-free and faunated sheep. J. Anim.Sci. 70:3194-3205.

13- Jacques, K. A., D. E. Axe, T. R. Harris, D. L. Harmon, K. K. Bolsen and D. E. Johnson. 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. J. Anim. Sci. 63:923-933.

14- Kutches, A. J., D. C. Church, and F. L. Duryee. 1970. Toxicological effects of pesticides on rumen function *in vitro*. J. Agr. Food Chem. 18(3):430-433.

15- Laben, R. C., T. E. Archer, D. G. Crosby, and S. A. Peoples. 1965. Lctational output of DDT fed prepartum to dairy cattle. J. Dairy Sci. 52:1643-1655.

16- 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. Anim. Res. Dev. 28: 7–55.

17- Osuji, P. O., I. V. Nsahlai, and H. Khalili. 1993. Feed evaluation. Ilca manual (International Livestock Center for Africa), Addis Ababa, Ethiopia. P. 40-41.

18- Saleh, M. S. 1994. Using of feed additives for feeding farm animals. Ph.D. Thesis, Faculty. of Agriculture. Kafr El-Sheikh, Tanta University, Egypt.

19- SAS Institute INC. 2002. Sas user's Guide: statistics. Statistical Analysis Systems Institute Inc. Cary NC.

20- 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. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197.
21- Wallace, R. J., and C. J. Newbold. 1991. Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. J. Agric. Sci. Camb. 116:163-175.
22- Williams, P. P., J. D. Robinson, J. Gutierrez, and R. E. Davis. 1963. Rumen bacterial and protozoal responses to insecticide substrates. Appl. Microbial. 11:517-522.
23- World Health Organization. 1973. Safe use of Pesticides: twentieth report of the WHO Expert Committee on Insecticides. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 513).
24- Zheng, Y. Z., W. S. Lan, C. L. Qiao, A. Mulchandani, and W. Chen. 2007. Decontamination of Vegetables Sprayed With Organophosphate Pesticides by Organophosphorus Hydrolase and Carboxylesterase (B1). App. Biochem. Biotech. 136:231-241.