JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۱: ۴۱-۲۵

مقاله پژوهشی

اثر سطوح مختلف خاک دیاتومه بر فرآسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B_1 با استفاده از میکرو ارگانیسم‌های جداشده از شکمبه در شرایط برون‌تنی

رشید صفری[۱]، ذبیح اله نعمتی[۲*]، نامدار کامرانی[۳]، امیر کریمی[۱]

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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی افزودنی خاک دیاتومه بر اثرات منفی آفلاتوکسین در تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی جیره غذایی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. آزمایش در قالب، طرح کاملا تصادفی با ۶ گروه آزمایشی و ۴ تکرار در هر گروه در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. گروه‌های آزمایشی شامل: ۱-جیره پایه (شاهد بدون متانول)، ۲-شاهد با متانول، ۳- شاهد با متانول + آفلاتوکسین به میزان ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه (جیره آلوده با آفلاتوکسین)، ۴، ۵ و ۶- جیره آلوده با آفلاتوکسین + سطوح ۷، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم دیاتومه بودند. از شیشه‌های با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر به روش کشت ثابت برای اندازه‌گیری میزان تولید گاز و قابلیت هضم استفاده شد. هر یک از شیشه‌ها با گاز دی اکسید کربن پر و سپس با درپوش لاستیکی پلمپ و در حمام آبی در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. کمترین مقدار تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی و بیشترین غلظت آمونیاک مربوط به گروه دارای آفلاتوکسین بود ($P<۰/۰۵$). آفلاتوکسین سبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری تولید گاز، میزان انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب فرار در مقایسه با گروه‌های شاهد نشد. افزودن دو سطح پایین و میانی دیاتومه سبب بهبود تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در مقایسه با گروه آفلاتوکسین شد ($P<۰/۰۵$). همچنین محیط کشت حاوی خاک دیاتومه در سطح پایین (۷ میلی‌گرم در ۲۰۰ میلی‌گرم جیره) سبب بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی و راندمان سنتز میکروبی شد ($P<۰/۰۵$). می‌توان نتیجه گرفت که افزودنی خاک دیاتومه پتانسیل بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر کارکرد شکمبه در شرایط آزمایشگاهی را دارد و تحقیق بیشتر در خصوص ساز و کار عمل آن در اکوسیستم میکروبی شکمبه ضرورت دارد.

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

*نویسنده مسئول: ذبیح اله نعمتی

آدرس: گروه علوم دامی دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، تبریز، ایران. تلفن:۴۴۲۲۳۷۷۱۷

پست الکترونیک: znemati@ tabrizu.ac.ir

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متعلق به یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هایپرتوکسیک هستند که به طور عمده توسط گونه‌های خاصی از آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکو تولید می‌شوند (۵۷). آن‌ها به لحاظ داشتن خصوصیات سرطانزایی، تداوم آلودگی در مواد خوراکی بعد از آلودگی اولیه و احتمال آلودگی دامنه وسیعی از موادخوراکی به آن، جزء مهم‌ترین نوع مایکوتوکسین‌ها هستند(۱۸). بیشتر مواد خوراکی دام و طیور آلوده به انواع قارچ‌های آسپرژیلوس تولید کننده آفلاتوکسین و انواع آفلاتوکسین ها هستند (۱ - ۲). مولکول آفلاتوکسین، خیلی مقاوم به حرارت است و در دمای بالا ۲۶۸ الی ۲۶۹ درجه سانتی‌گراد تجزیه می‌شود (۴۶). بنابراین، تکنولوژی‌های معمولی خشک‌کن‌ها قادر به کاهش غلظت سم، در دانه‌های غلات انبار شده نیست و تنها دماهای بالا در طولانی مدت ممکن است، مفید باشد (۳۲). نشخوارکنندگان عموماً نسبت به تک‌معده‌ای‌ها در برابر اثرات سمی مایکوتوکسین‌ها مقاوم‌تر هستند که اساساً دلیل آن، تجزیه آفلاتوکسین B_1 و یا تبدیل زیستی آن توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه بیان شده است، اما بر خلاف آن، نتایج برخی مطالعات نشان داده است که آفلاتوکسین‌ها معمولاً به مقدار کم و تا ۱۰ درصد در شکمبه تبدیل زیستی می‌شوند (۶۱) و توانایی نشخوارکنندگان در تبدیل آفلاتوکسین B_1 به M_1 محدود بوده و در دامنه ۰/۳۵ -۳ درصد در گاو، ۰/۰۱۸-۳/۱ درصد در بز و بین ۰/۰۸ و ۰/۳۳ درصد در گوسفند است (۵۹). مواد خوراکی آلوده به طور مستقیم با کاهش تولید و سلامتی حیوانات و به طور غیر مستقیم با ورود به شیر، گوشت، تخم مرغ تغذیه و سلامتی انسان را تهدید می‌کند (۲۰). حیوانات در معرض آفلاتوکسین به مسمومیت حاد با علایم مرگ و میر و خسارت بالا یا مسمومیت مزمن با علایم ناهنجاری‌های بدنی همراه با کاهش عملکرد تولیدی می‌شود (۱۰،۴۷). آلودگی مواد خوراکی با این سموم، امری اجتناب‌ناپذیر است و گستره آلودگی آن جهانی است، به طوری‌که تنها آلودگی دانه ذرت از آرژانتین، برزیل، فرانسه، ایران و اروگوئه گزارش شده است (۱۳،۲۴،۴۸،۴۹). قارچ‌های توکسین‌زا معمولا روی بذور کوچک از قبیل گندم، جو، چاودار، برنج، تریتیکاله، ذرت و دیگر مواد خوراکی رشد می‌کنند. از راهکارهای اصلی مبارزه با آن می‌توان به نگهداری اصولی مواد خوراکی و جلوگیری از رشد قارچ روی گیاهان زراعی در مزرعه و بعد از آن باشد. لذا اقدام مهم بعدی در کنترل سموم قارچی، جلوگیری از ورود آن‌ها به بدن دام می باشد (۵۲). برای کنترل آفلاتوکسین روش‌های جدید بکارگیری ازن (۲۹)، اشعه مادون قرمز، گاما (۵۱) و اشعه میدان پالسی (۶۰)، پلاسمای سرد (۵۰) و به‌کارگیری انواع جاذب‌ها در خوراک دام (۴۲،۵۸) و مخلوط ترکیبات غیر آلی و سویه‌های جدید میکروبی (۳۰) پیشنهاد شده است. خاک دیاتومه نیز یکی از جاذب‌های طبیعی می‌باشد که می‌تواند به‌صورت مکمل در خوراک مورد استفاده قرار گیرد. خاک دیاتومه، خاک رسوبی تشکیل شده از بدن فسیل شده یک جلبک تک یاخته‌ای به نام دیاتومه بوده و به رنگ‌های مختلف اعم از سفید، خاکستری و زرد تا قرمز است. این خاک معمولا حاوی ۸۰ تا ۹۵ درصد دی‌اکسید سیلیسیم غیرمتبلور است (۶۲). علاوه بر سیلیس غیرمتبلور (حدود ۶۰ تا ۹۳ درصد)، عنصر اصلی آن کلسیم است، اما عناصر متعددی مانند آلومینیوم، منیزیم، سدیم، آهن، فسفر، گوگرد، نیکل، روی، منگنز و غیره وجود دارد (۵۳-۵۵). دیاتومیت

توانایی اتصال به AFB_1 را هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن دارا می‌باشد (۴۰) و محققین نشان دادند افزودن آفلادتوکس (نوعی خاک دیاتومه) به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی اثرات سمی آفلاتوکسین را بهبود می‌بخشد (۱۴). بر این اساس آفلاتوکسین به لحاظ خسارت اقتصادی و بهداشتی بالا، خطرات بالقوه شدید دارد و بررسی جنبه‌های مختلف آن امری ضروری است (۲۲). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی، اثر جاذب طبیعی خاک دیاتومه بر فرآسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B_1 با استفاده از میکرو ارگانیسم‌های جداشده از شکمبه در شرایط برون‌تنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های آزمایشی

آزمایش حاضر در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تبریز انجام شد. تعداد ۳ رأس گوسفند قزل فیستوله‌گذاری شده با میانگین وزن زنده ۴۰ کیلوگرم برای تهیه مایع شکمبه استفاده شدند.

جیره غذایی گوسفندان مطابق با جدول ۱ به‌صورت دوبار در روز و در دو وعده غذایی صبح و عصر تغذیه شد. گروه‌های آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه (شاهد بدون متانول)، ۲- جیره پایه + متانول (شاهد با متانول)، ۳- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه)، ۴- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه) + ۷ میلی‌گرم دیاتومه، ۵- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه) + ۷۵ میلی‌گرم دیاتومه، ۶- جیره پایه + آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه) + ۱۵۰ میلی‌گرم دیاتومه بودند.

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

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

مورد	درصد از جیره
یونجه خشک	۵۰
دانه جو	۳۱/۵
دانه ذرت	۳
سبوس گندم	۶
کنجاله سویا	۶
مکمل ویتامین و مواد معدنی[1]	۱
دی کلسیم فسفات	۱
نمک	۰/۵
کلسیم کربنات	۱
ترکیبات شیمیایی (درصد)	
ماده خشک	۹۲
مواد آلی	۸۹/۷۷
پروتئین خام	۱۴/۹
فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۳۵
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	۲۱/۳۶
خاکستر	۱۰/۲۲
چربی خام	۵/۷۳

[1] هرکیلوگرم مکمل مواد معدنی و ویتامینی حاوی ۹۹/۲- میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴/۷ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۸واحد بین‌المللی ویتامین E .

روش تهیه آفلاتوکسین

برای تهیه گروه‌های آزمایشی، نیاز به تولید آفلاتوکسین تولید شده در شرایط طبیعی بود، چرا که آلودگی مواد خوراکی در طبیعت با رشد طبیعی قارچ بر مواد خوراکی و تولید انواع آفلاتوکسین شکل می‌گیرد. برای تهیه محیط کشت طبیعی، ابتدا یک ویال از سویه استاندارد قارچ Aspergillus Parasiticus NRLL 2999 تهیه و در محیط آزمایشگاهی درون شیشه‌ای و در شرایط استریل بر محیط کشت دکستروز آگار حاوی سیب زمینی (potato dextrose agar) کشت گردید. سپس به کمک شمارش میکروسکوپی سوسپانسیون اسپور با غلظت $۶٫۵\times۱۰^{۶}$ تهیه شد. مقدار ۲ سی‌سی از اسپور قارچی تهیه شده به داخل فلاسک حاوی محیط کشت استریل از برنج تلقیح شد. فلاسک حاوی محیط کشت تلقیح شده به مدت ۵ روز و در شرایط استاندارد دمایی ۲۸ درجه سانتیگراد و سایر شرایط محیطی، در داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس با حرارت دادن، قارچ‌های محیط کشت از بین برده شد و سپس خشک شد (۴۳). میزان آفلاتوکسین B_1 در پودر تهیه شده، به روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد که غلظت آفلاتوکسین تولیدی قابل توجه بوده و نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. آفلاتوکسین تولیدی در متانول حل و به میزان نیاز به ویال‌ها افزوده شد (۴۳).

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

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

اندازه‌گیری فرآسنجه‌های تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی

با استفاده از میکروارگانیسم‌های جدا شده از شکمبه و شبیه‌سازی محیط شکمبه به روش منک، آزمون تولید گاز در محیط آزمایشگاهی انجام شد (۳۸،۳۹). به منظور استخراج میکروارگانیسم‌ها، مایع شکمبه قبل از تغذیه صبح، از دام‌های دارای فیستوله شکمبه‌ای تهیه و با استفاده از پارچه پنیرسازی صاف شد. مایع شکمبه تهیه شده بلافاصله در شرایط دمایی مناسب به آزمایشگاه منتقل شد. مایع شکمبه در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد حمام بن‌ماری تحت گاز دی اکسید کربن قرار گرفت. بزاق مصنوعی که قبلا به روش مکدوگال (۳۴) تهیه شده بود، دمای آن به ۳۹ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. سپس مایع شکمبه و بزاق مصنوعی در محیط بی هوازی و با حضور دی اکسید کربن با نسبت ۱ به ۲ مخلوط شد. از آسیاب با الک به قطر منافذ ۱ میلی‌متری جهت آسیاب یکنواخت مواد خوراکی استفاده شد و در درون ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی-لیتری مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه خوراکی ریخته و گروه‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین به داخل ویال‌ها افزوده شد و در نهایت مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمبه داخل هر ویال اضافه شد. حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. میانگین گاز تولیدی در ویال‌های فاقد جیره آزمایشی به عنوان بلنک، از ویال‌های دارای گروه‌های آزمایشی کم شده و از این طریق حجم خالص گاز بدست آمد. حجم گاز تولیدی

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

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

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

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

ME (MJ/kg DM) = 0.157GP + 0.0084 CP + 0.022 EE - 0.0081 Ash + 1.06

NE_L (MJ/kg DM) = 0.115GP + 0.0054CP + 0.014EE - 0.0054Ash - 0.36

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

SCFAs (mmol) = -0.00425 + GP 0.0222

که در این معادلات GP: تولید خالص گاز در ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، CP: پروتئین خام (بر حسب درصد)، Ash: مقدار خاکستر (بر حسب درصد) می‌باشد.

اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده خشک، ماده آلی

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

اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی

از روش استاندارد فنل – هیپوکلرایت برای اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه استفاده شد (۹). مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه با محلول استاندارد را با ۲/۵ میلی‌لیتر فنول و ۲ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت ترکیب و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوباسیون شد پس از خنک شدن، جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی میزان جذب نمونه‌ها به کمک اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد.

تعیین شاخص تفکیک‌پذیری (Partitioning factor) و توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی

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

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

شاخص تفکیک‌پذیری=OMDe/IVGP=c–(a–b)/IVGP

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

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

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

آنالیز آماری داده‌ها

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

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

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

نتایج

فرآسنجه‌های تولید گاز و تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی

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

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

شاهد کاهش یافت. افزودن سطوح ۷ و ۱۷۵ میلی‌گرم دیاتومه به محیط کشت در مقایسه با گروه آفلاتوکسین تفاوت معنی‌داری بر حجم گاز تولیدی نداشت هرچند کمترین سطح دیاتومه نسبت به گروه آفلاتوکسین از لحاظ عددی افزایش تولید گاز نشان داد (P≥۰/۰۵). با افزایش سطوح دیاتومه میزان کل گاز تولیدی سیر نزولی داشته به طوریکه که کمترین مقدار کل گاز تولیدی در بالاترین سطح دیاتومه بوده (۱۶۴/۱۵) و در مقایسه با دو سطح دیگر آن و گروه آفلاتوکسین تفاوت معنی‌دار داشته است (P≤۰/۰۵) هرچند این یافته نشان از اثر منفی سطح بالای دیاتومه (۱۷۵ میلی گرم) بر محیط تخمیری شکمبه و تولید گاز داشته است اما در مطالعه قبلی افزودن خاک دیاتومه به میزان ۲ گرم در لیتر به محیط کشت بدون حضور آفلاتوکسین تأثیری بر تولید گاز نداشته است (۵). مشابه نتایج آزمایش حاضر، با توجه به اثرات ثابت شده و منفی آفلاتوکسین بر جمعیت میکروبی شکمبه، فرآسنجه تولید گاز در حضور آفلاتوکسین کاهش پیدا می‌کنند ولی بر خلاف نتایج این آزمایش با افزودن جاذب آفلاتوکسین به محیط کشت اثر مهاری آفلاتوکسین برطرف شده و این فرآسنجه‌ها افزایش می‌یابند (۲۶،۳۱).

در جدول ۲ نتایج تأثیر افزودن آفلاتوکسین و سطوح مختلف دیاتومه بر تجزیه‌پذیری ماده آلی و ماده خشک آمده است. تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده‌آلی در گروه شاهد (۵۸/۸۴، ۷۴/۹۶) و گروه شاهد همراه با متانول (۵۵/۵۰، ۷۱/۸۹) مشابه هم بوده اما در گروه آفلاتوکسین در مقایسه با گروه شاهد، تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی (۲۹/۱۷، ۴۴/۸۷) شدیداً کاهش معنی‌دار پیدا کرد (P<۰/۰۵). کمترین مقدار تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در گروه دارای آفلاتوکسین مشاهده شد. افزودن سطوح مختلف دیاتومه سبب بهبود معنی‌دار تجزیه‌پذیری ماده خشک در مقایسه با گروه آفلاتوکسن شد اما تفاوت آن با گروه‌های شاهد، معنی‌دار نشد. همچنین افزودن دو سطح پایین دیاتومه سبب بهبود نسبی اثرات منفی آفلاتوکسین بر تجزیه‌پذیری ماده آلی شد (P<۰/۰۵) ولی تفاوت آن‌ها در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار نشد. با افزایش سطوح جاذب دیاتومه میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی کاهش پیدا کرده و تفاوت میزان تجزیه‌پذیری در بین سطوح پایین و بالای دیاتومه معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). بهبود قابلیت هضم ماده خشک و آلی با افزودن خاک دیاتومه در این مطالعه بیانگر بهبود فرآیند تخمیر شکمبه است. بهبود در قابلیت هضم می‌تواند تا حدودی به خاطر اثرات منفی خاک دیاتومه بر تولید متان باشد به طوری‌که گزارش کردند افزودن مخلوط خاک دیاتومه و بنتونیت به محیط کشت اثر معنی‌داری بر تعداد کل جمعیت باکتریایی و قارچی نشان دادند اما در مقایسه با گروه شاهد سبب مهار ۵۹ و ۹۷ درصدی تولید متان به ترتیب در مدت ۵ و ۲ روز می‌شود (۵) و بیان داشتند که این افزودنی احتمالاً از طریق غیر مستقیم و با کاهش فعالیت‌های رونویسی تولید متان را مهار کردند و اثر مهار تولید متان آن موثرتر از سایر افزودنی‌ها از جمله تانن متراکم، ساپونین چای (۲۳،۲۷،۲۸،۳۵) و بروموکلرومتان (۱۵) است. محققین قبلاً با بررسی شاخص حضور پروتوزوا در شکمبه (18S rRNA) به کمک تانن، یونوفرها و ضد پروتوزوا، نشان دادند که کاهش جمعیت پروتوزوایی با کاهش تولید متان همراه است (۴،۲۵،۴۵) بنابراین ساز و کار احتمالی دیگر دیاتومه ممکن است همین امر باشد. اغلب گروه‌های موثر در شرایط برون‌تنی، کاهش معنی‌داری در

اثرگذاری در شرایط درون‌تنی دارد (۱۹) بنابراین انجام آزمایش بر روی خود حیوان ضروری است.

جدول ۲. اثر سطوح مختلف خاک دیاتومه بر میزان کل گاز تولیدی، نرخ تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B_1

Table 2- Effect of different level of diatom on total gas production and gas production rate, DMD and OMD in contaminated diet with aflatoxin B_1

	تیمارهای آزمایشی[1]					خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
	شاهد بدون متانول	شاهد با متانول	آفلاتوکسین	آفلاتوکسین+ سطح پایین دیاتومه	آفلاتوکسین+ سطح میانی دیاتومه	آفلاتوکسین+ سطح بالای دیاتوم		
نرخ تولید گاز	^{a}۰/۰۵۷	^{a}۰/۰۵۹	^{a}۰/۰۷۰	^{b}۰/۰۲۹	^{b}۰/۰۲۵	^{b}۰/۰۲۴	۰/۰۰۴۴	<۰/۰۰۱
کل گاز تولیدی (میلی‌لیتر بر گرم خوراک)	^{a}۲۹۵/۰۵	۲۹۴/۳۸^{a}	^{b}۲۲۸/۴۸	^{b}۲۳۴/۳۸	۲۰۹/۹۰.^{b}	^{c}۱۶۴/۱۵	۱۵/۲۵	<۰/۰۰۱
تجزیه‌پذیری ماده آلی (درصد)	^{a}۷۴/۹۶	^{a}۷۱/۸۹	^{d}۴۴/۸۷	^{b}۶۱/۲۶	^{bc}۵۵/۳۱	^{cd}۴۹/۹۱	۲/۳۱	<۰/۰۰۱
تجزیه‌پذیری ماده خشک (درصد)	^{a}۵۸/۸۴	^{ab}۵۵/۵۰	^{d}۲۹/۱۷	^{a}۵۶/۵	^{b}۴۸/۱۷	^{c}۳۷/۳۳	۲/۶۰	<۰/۰۰۱

[1]تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه)، آفلاتوکسین+ سطح پایین دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۷ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین+ سطح میانی دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۷۵ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین+ سطح بالای دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۱۵۰ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)

تیمارها با حروف متفاوت به لحاظ آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

فرآسنجه‌های تخمیری شکمبه

در جدول ۳ نتایج اثر افزودن آفلاتوکسین و سطوح مختلف خاک دیاتومه بر فرآسنجه‌های تخمیری شامل انرژی متابولیکی، انرژی متابولیکی شیر، قابلیت هضم ماده آلی، میزان اسیدهای چرب فرار و ازت آمونیاکی آورده شده است. میزان انرژی متابولیکی، انرژی متابولیکی شیر و قابلیت هضم ماده آلی گروه‌های شاهد و شاهد همراه با متانول مشابه هم بوده و در بین آنها اختلاف معنی‌داری نداشت. حضور آفلاتوکسین در خوراک، سبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری در شرایط آزمایشگاهی شد به‌طوری‌که انرژی متابولیکی در مقایسه با گروه شاهد از ۹/۱۵ به ۷/۶۲، انرژی متابولیکی شیر از ۵/۱۹ به ۴/۵۴ و همچنین قابلیت هضم ماده‌آلی از ۵۷/۲۶ به ۵۰/۶۲ کاهش یافت ($P\leq$۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف خاک دیاتومه به عنوان جاذب آفلاتوکسین، نه تنها اثری بر کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین بر این فرآسنجه‌ها نداشته بلکه سبب کاهش میزان آنها در مقایسه با گروه آفلاتوکسین و شاهد شد ($P\leq$۰/۰۵). خاک دیاتومه به خاطر فعالیت و توانایی آن در جذب لیپیدها برای کنترل انگل‌های دستگاه گوارش از قبیل هلمینت و کوکسیدیوزها در نشخوارکنندگان (۷) و مرغ تخمگذار (۱۷) استفاده می‌شود. در آزمایش حاضر خاک دیاتومه سبب کاهش فرآسنجه‌های تخمیری شامل انرژی متابولیسم، انرژی متابولیکی شیر و فرآسنجه تخمینی قابلیت هضم ماده آلی شد. این یافته، مخالف گزارش دیگر محققین است به‌طوریکه افزودنی خاک دیاتومه بدون حضور آفلاتوکسین به میزان ۲ گرم در لیتر تأثیری بر الگوی تخمیر شکمبه و فعالیت پروتوزوایی نداشت (۵).

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

بیشترین غلظت اسیدهای چرب فرار مربوط گروه‌های شاهد (۱/۰۴۴) و شاهد همراه با متانول (۱/۰۹) می‌باشند و حضور آفلاتوکسین سبب کاهش میزان آن به ۰/۸۹ شد (P≤۰/۰۵). بلومل و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که بین تولید گاز و اسیدهای چرب فرار تولیدی رابطه مستقیم وجود دارد (۸). در آزمایش حاضر همین رابطه برقرار بوده و در گروه شاهد حداکثر تولید اسید چرب فرار همراه با تولید گاز مشاهده شد درحالیکه در گروه آفلاتوکسین برعکس بود. غلظت اسیدهای چرب فرار در بین گروه آفلاتوکسین و سطوح مختلف دیاتومه (۰/۵۱) اختلاف معنی‌دار نداشت و افزودن جاذب دیاتومه تأثیری بر کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشته است. همچنین در این آزمایش سطوح مختلف افزودنی دیاتومه در حضور آفلاتوکسین اثر معنی‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشت که مشابه آن، با ارزیابی افزودنی خاک دیاتومه گزارش کردند افزودنی دیاتومه در مقایسه با شاهد اثری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار و انواع اسیدهای چرب فرار (استات، پروپیونات، بوتیرات و اسید چرب شاخه دار) ندارد (۵). هیدروژن علاوه بر تولید متان می‌توانند برای تولید اسیدهای چرب فرار مانند پروپیونات و استات نیز مورد استفاده قرار گیرند. سطح اسیدهای چرب فرار موجود در شکمبه می‌تواند نشانه‌ای از راندمان خوراک دام باشد و کاهش در نسبت استات احیا شده به پروپیونات احیا شده در شکمبه همزمان با کاهش تولید CH_4 است (۱۱).

مقدار نیتروژن آمونیاکی در گروه آفلاتوکسین در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف دیاتومه در مقایسه با گروه آفلاتوکسین سبب کاهش مقدار نیتروژن آمونیاکی شد و بیشترین کاهش مربوط به سطح بالای دیاتومه بود (P<۰/۰۵). برخلاف نتایج این آزمایش، نشان دادند که سطوح افزایشی خاک دیاتومه و کیتوزان تأثیری بر نیتروژن آمونیاکی ندارند (۵). در تأیید نتایج آزمایش حاضر، گزارش کردند که پروبیوتیک مخمر با افزایش مصرف لاکتات و آمونیاک شکمبه سبب تعدیل pH شکمبه و افزایش سنتز پروتئین می‌شود (۱۲). کاهش نیتروژن آمونیاکی بواسطه افزودن خاک دیاتومه احتمالا به خاطر اثر ضد پروتئولیتکی آن در حضور آفلاتوکسین می‌باشد و یا با تحریک باکتری‌های شکمبه و افزایش مصرف نیتروژن آمونیاکی و افزایش سنتز توده میکروبی می‌شود که داده های راندمان میکروبی و شاخص تفکیک موید این موضوع می‌باشد (جدول ۴).

جدول۳. اثر خاک دیاتومه به عنوان توکسین بایندر بر فرآسنجه‌های تخمیری جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B_1

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

مورد	تیمارهای آزمایشی[1]					خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
	شاهد بدون متانول	شاهد با متانول	آفلاتوکسین	آفلاتوکسین+ سطح پایین دیاتومه	آفلاتوکسین+ سطح میانی دیاتومه	آفلاتوکسین+ سطح بالای دیاتومه	
انرژی متابولیکی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)	^{a}۹/۱۵	^{ab}۸/۶۷	^{b}۷/۶۲	^{c}۴/۹۰	^{c}۵/۴۲	^{c}۴/۷۸	۰/۴۶	۰/۰۰۱
انرژی خالص شیرواری(مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)	^{a}۵/۱۹	^{a}۵/۴۷	^{b}۴/۵۴	^{c}۲/۴۳	^{c}۲/۸۱	^{c}۲/۳۴	۰/۳۴	۰/۰۰۱
ماده آلی قابل هضم (درصد)	^{a}۵۷/۲۶	^{a}۵۹/۶۵	^{b}۵۰/۶۲	^{c}۳۳/۲۹	^{c}۳۶/۶۱	^{c}۳۲/۴۶	۲/۹۳	۰/۰۰۱
اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر گرم ماده خشک)	^{a}۱/۰۴۴	^{a}۱/۰۹	^{b}۰/۸۹	^{b}۰/۵۱	^{b}۰/۵۸	^{b}۰/۴۹	۰/۰۶	۰/۰۰۱
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	^{b}۱۹/۰۲	^{bc}۲۰/۷۲	^{d}۲۳/۵۷	^{bc}۱۹/۶۰	^{cd}۲۱/۸۲	^{a}۱۲/۸۳	۰/۷۳	۰/۰۰۱

[1] تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه)، آفلاتوکسین+ سطح پایین دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۷ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین+ سطح میانی دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۷۵ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین+ سطح بالای دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۱۵۰ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)

تیمارها با حروف متفاوت ار نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

جدول٤. تأثیر سطوح مختلف دیاتومه به عنوان جاذب توکسین در جیره غذایی حاوی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک‌پذیری و توده میکروبی تولیدی میکروارگانیسم‌های شکمبه در شرایط آزمایشگاهی

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

مورد	تیمارهای آزمایشی[1]					خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
	شاهد بدون متانول	شاهد با متانول	آفلاتوکسین	آفلاتوکسین+ سطح پایین دیاتومه	آفلاتوکسین+ سطح میانی دیاتومه	آفلاتوکسین+ سطح بالای دیاتومه	
ضریب تفکیک (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده بر میلی لیتر گاز)	^{b}۳/۴۹	^{b}۳/۲۸	^{c}۲/۳۵	^{a}۴/۷۸	^{b}۳/۷۰	^{c}۲/۷۷	۰/۱۸	<۰/۰۰۱
توده میکروبی (میلی‌گرم)	^{a}۵۰/۸۲	^{a}۵۰/۳۵	^{c}۴/۷۷	^{a}۵۸/۵۰	^{b}۳۸/۷۵	^{c}۱۲/۷۲	۴/۳۹	<۰/۰۰۱
راندمان سنتز میکروبی (درصد)	^{a}۲۷/۴۷	^{a}۲۷/۲۲	^{c}۲/۵۸	^{a}۳۱/۶۲	^{b}۲۰/۹۵	^{c}۶/۸۷	۲/۳۸	<۰/۰۰۱

[1] تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه)، آفلاتوکسین+ سطح پایین دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۷ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین+ سطح میانی دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۷۵ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین+ سطح بالا دیاتومه (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شمکبه + ۱۵۰ میلی گرم دیاتومه برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)

تیمارها با حروف متفاوت ار نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندومان سنتز میکروبی

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود شاخص تفکیک‌پذیری گروه آفلاتوکسین (۲/۳۵) در مقایسه با گروه‌های شاهد (۳/۴۹) و شاهد همراه با متانول (۳/۲۸) بطور معنی‌دار کاهش یافت. افزودن دو سطح پایین دیاتومه اثر منفی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک‌پذیری را جبران کرد اما بالاترین سطح دیاتوم تفاوت معنی‌داری با گروه آفلاتوکسین نداشت ($P\leq ۰/۰۵$). شاخص تفکیک همان راندمان سنتز میکروبی در شرایط آزمایشگاهی است (۶) و شاخص تفکیک بالا به این مفهوم است که نسبت بیشتری از ماده تجزیه شده صرف سنتز توده میکروبی می‌شود. با افزودن سطوح مختلف جاذب دیاتومه میزان توده میکروبی در مقایسه با گروه آفلاتوکسین بهبود یافت و در بین سه سطح دیاتومه، بیشترین و کمترین مقدار توده میکروبی مربوط به سطح پایین و بالای دیاتومه (۵۸/۵۰ و ۱۲/۷۲) بودند. میزان راندمان سنتز میکروبی نیز روندی مشابه به روند شاخص تفکیک‌پذیری و توده میکروبی دارد و بهترین پاسخ از لحاظ شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی و راندمان سنتز میکروبی مربوط به سطح پایین خاک دیاتومه بوده و در سطوح بالا پاسخ یا ضعیف بوده و اثر منفی بر فرآسنجه‌های تخمیری داشته است. بنابراین آفلاتوکسین احتمالا فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه در استفاده از نیتروژن برای تولید پروتئین میکروبی را محدود کرده و سبب افزایش تولید ازت آمونیاکی و کاهش شاخص تفکیک‌پذیری شده است (۳). به طوریکه با افزودن خاک دیاتومه به محیط کشت نه تنها میزان ازت آمونیاکی کاسته شده بلکه میزان شاخص تفکیک-پذیری و سنتز توده میکروبی هم افزایش یافته است. در آزمایش حاضر، میزان تولید گاز در گروه‌های افزودنی خاک دیاتومه و آفلاتوکسین برابر بوده درحالیکه راندمان سنتز میکروبی و شاخص تفکیک بیشتر از گروه آفلاتوکسین بود. در تأیید آزمایش حاضر محققین گزارش کردند افزودن مخلوط خاک دیاتومه و بنتونیت به محیط کشت در مقایسه با گروه شاهد سبب مهار ۹۷ درصدی تولید متان در مدت ۲ روز تخمیر می‌شود (۵). این افزودنی بدون تأثیر منفی بر تعداد کل جمعیت باکتریایی و قارچی احتمالا بصورت غیر مستقیم و با کاهش فعالیت‌های رونویسی تولید متان را مهار کردند و اثر مهاری آن بر تولید متان از سایر مهارکننده‌های متان مثل تانن متراکم، ساپونین چای (۲۳،۲۷،۲۸،۳۵) موثر تر است. بنابراین یکی از مکانیسم‌های احتمالی خاک دیاتومه در بهبود تخمیر محیط کشت کاهش تولید متان بوده است. تولید گاز در محیط بی‌هوازی شکمبه یک محصول تخمیر است که نوعی اتلاف انرژی محسوب می‌شود و باکاهش تولید گاز متان راندمان سنتز میکروبی افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

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

منابع

۱- مروی ع.، طبیبی م.، یزدان ستاد س.، نادری م.، خالدی م.، پور شهبازی غ. و محمودی کوهی ا. ۱۳۹۷. بررسی آلودگی خوراک دام و طیور با گونه های قارچی آسپرژیلوس تولید کننده آفلاتوکسین. *تحقیقات دامپزشکی و فراورده های بیولوژیک*. **۱۲۰**: ۳۸-۴۳.

۲- نعمتی ذ، جانمحمدی ح.، تقی زاد ا.، ملکی نژاد ح. و مقدم غ. ۱۳۹۴. تاثیر جاذب طبیعی بنتونیت در کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین B_1 برعملکرد و سیستم ایمنی در جوجه-های گوشتی. *تحقیقات تولیدات دامی*. سال ۴ شماره **۳**. ۶۷-۷۷.

۳- نعمتی، ذ.، صفری ر.، بشارتی م.، کامرانی ن. و شیخلو م. ۱۳۹۹. اثر آفلاتوکسین B۱ بر قابلیت هضم و فراسنجه های تخمیری شکمبه ای جیره غذایی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی. *پژوهشهای تولیدات دامی*. **۱۱**(۲۸) :۷۵-۸۳.

4. Beauchemin, K., Kreuzer M., O'mara F., and McAllister T. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **48**: 21-27.
5. Belanche, A., Ramos-Morales E., Newbold C. J., and agriculture. 2016 . In vitro screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Journal of the science of food*, **96**: 3069-3078.
6. Benchaar, C., McAllister T., and Chouinard P. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or Yucca schidigera saponin extracts. *Journal of Dairy Science*, **91**: 4765-4777.
7. Bennett, D., Yee A., Rhee Y.-J., and Cheng K. 201 .Effect of diatomaceous earth on parasite load, egg production, and egg quality of free-range organic laying hens. *Poultry Science*, **90**: 1416-1426.
8. Blümmel, M., Makkar H., Becker K.. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, **77**: 24-34.
9. Broderick, G., and Kang J. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, **63**: 64-75.
10. Bryden, W. L., and Technology. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science*, **173**: 134-158.
11. Christophersen, C., Wright A. G., and Vercoe P. 2008. In vitro methane emission and acetate: propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *Journal of animal science*, **86**: 384-389.
12. Dawson, K. 1992. Current and future role of yeast culture in animal production: A review of research over the past six years. In: Proceedings of Alltech's 8th annual symposium, Nicholasville, Kentucky. p 1-23.
13. del Palacio, A., Bettucci L., and Pan D. 2016. Fusarium and Aspergillus mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. *Brazilian journal of microbiology*, **47**: 1000-1005.
14. Denli, M., Blandon J., Guynot M., Salado S., and Perez J. 2009. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poultry Science*, **88**: 1444-1451.
15. Denman, S. E., Tomkins N. W., and McSweeney C. S. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response

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

Khazraeinia P., Farkhoy M., Masoumi Z., and Agriculture. 2008. Effect of diatomaceous earth on the performance and blood variables of broiler chicks during experimental aflatoxicosis. *Journal of the Science of Food*, **88**: 626-632.

41. Mojtahedi, M., Mesgaran M. D., Vakili S. A., and Hayati-Ashtiani M. 2013. Effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen microbial fermentation responses using batch culture. *Annual Research Review in Biology*: 686-693.
42. Nemati, Z., Janmohammadi H., Taghizadeh A., Moghaddam G., and Maleki Nejad H. 2014.Effect of bentonite supplementation to the contaminated diets with aflatoxin B1 on broiler performance. In: 6th Iranian congress on animal science, Tabriz
43. Nemati, Z., Karimi A., and Besharati M. 2015. Impact of Aflatoxin Contaminated Feed and Yeast Cell Wall Supplementation on Immune System in Broiler Chickens. In: Proceedings of International Conference on Innovations in Chemical & Agricultural Engineering. p 8-9.
44. Ørskov, E., and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, **92**: 499-503.
45. Patra, A. K., and Assessment. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring*, **184**: 1929-1952.
46. Peng, W.-X., Marchal J., and Van der Poel A. 2018. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Animal Feed Science and Technology*, **237**: 129-153.

rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Animal feed science technology*, **175**: 85-89.

32. Lee, J., Her J.-Y., and Lee K.-G. 2015. Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food chemistry*, **189**: 45-51.
33. Makkar, H. P. 2010. In vitro screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. p 107-144. Springer.
34. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical journal*, **43**: 99.
35. McGinn, S., Beauchemin K., Coates T., and Colombatto D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of animal science*, **82**: 3346-3356.
36. Menke, K., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, **93**: 217-222.
37. Menke, K., and Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and. vitro.
38. Menke, K. H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research and development*, **28**: 7-55.
39. Menke, K. H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research*, **28**: 7-55.
40. Modirsanei, M., Mansoori B., Khosravi A. R., Kiaei M. M.,

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

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

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 16, Issue 2, 2020

Effect of diatoms on the fermentation parameters and digestibility of contaminated diet with aflatoxin B_1 by microorganisms isolated from rumen in vitro condition

Rashid Safari[1] Zabihollah Nemati*[2], Namdar Kamrani[3], Amir Karimi[1]

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

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

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

Received: 16 March 2020 *Accepted: 21 October 2020*

Abstract

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

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

**Corresponding author: Zabihollah Nemati,*

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

Tel: +984144237717

Email: znemati@ tabrizu.ac.ir