



## "مقاله پژوهشی"

# اثر کربن فعال بر فرآیندهای تخمیری و پذیرگی جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B<sub>1</sub> با استفاده از میکروارگانیسم‌های جدا شده از شکمبه در شرایط برون تنی

ذبیح اله نعمتی<sup>۱</sup>، رشید صفری<sup>۲</sup> و مقصود بشارتی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: znmnemat@yahoo.com)

۲- استادیار دانشگاه تبریز

۳- دانشیار دانشگاه تبریز

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۶

تاریخ ارسال: ۹۸/۱۲/۱۶

صفحه: ۹۰ تا ۱۰۰

### چکیده

این آزمایش با هدف بررسی تأثیرگذاری کربن فعال بر کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین بر تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی جیره غذایی انجام گرفت. آزمایش با فرض امکان کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین به واسطه کربن فعال در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار در هر تیمار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره پایه (شاهد)، ۲- جیره پایه + متانول، ۳- جیره غذایی آلوده با متانول حاوی آفلاتوکسین به میزان ۸۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مایع شکمبه، ۴- جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین + هفت میلی گرم کربن فعال در ۲۰۰ میلی گرم خوراک، ۵- جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین + ۷۵ میلی گرم کربن فعال در ۲۰۰ میلی گرم خوراک، ۶- جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین + ۱۵۰ میلی گرم کربن فعال در ۲۰۰ میلی گرم خوراک بودند. برای اندازه گیری میزان تولید گاز و قابلیت هضم، از شیشه‌های با حجم ۱۰۰ میلی لیتر به روش کشت ثابت استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمار آفلاتوکسین سبب کاهش معنی داری در تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و آلی شد و با اضافه کردن سطوح مختلف کربن فعال، تولید گاز و قابلیت هضم ماده خشک و آلی افزایش یافت. غلظت نیترژن آمونیاکی در گروه آفلاتوکسین حداکثر بود و با افزودن سطوح افزایشی کربن فعال غلظت آن کاهش یافت. عامل تفکیک، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی به طور مشخص در گروه آفلاتوکسین کمترین مقدار بود و با افزودن کربن فعال، افزایش یافتند. می توان نتیجه گرفت کربن فعال به عنوان توکسین بایندر عمل کرده و قادر است اثرات منفی آفلاتوکسین بر تخمیر شکمبه‌ای را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، تجزیه پذیرگی و ماده آلی، تولید گاز، کربن فعال، قابلیت هضم

### مقدمه

۰/۰۲ گزارش شده است (۵۲) بر همین اساس اتحادیه اروپا حد مجاز آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در خوراک و جیره گاو شیری را به ترتیب ۲۰ و پنج میکروگرم در کیلوگرم (۷) و حداکثر سطح مجاز آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شیر را ۰/۰۵ میکروگرم در کیلوگرم اعلام کرده است (۸). مطالعات قبلی بیان داشتند که آفلاتوکسین B<sub>1</sub> با کاهش تجزیه سلولز (۱۴) و قابلیت هضم ماده خشک (۲) و تأثیر بر نرخ تولید و تولید تجمعی گاز مقدار تولید گاز شکمبه‌ای را کاهش می‌دهد (۵۳، ۲۵). رویکرد اخیر برای سم‌زدایی محصولات آلوده به آفلاتوکسین‌ها به منظور کاهش جذب آن‌ها از دستگاه گوارش و انتقال آن به فرآورده‌های دامی، استفاده از جاذب‌ها در جیره غذایی است (۴۰، ۳۹). در انتخاب جاذب‌ها باید به عواملی همچون هزینه کم، ایمن بودن و سهولت استفاده از آن در خوراک حیوانات توجه نمود (۳، ۲۷، ۴۶). مواد جاذب با اتصال به سموم از جذب آن‌ها در دستگاه گوارش جلوگیری می‌کنند (۴۰، ۴۲). با این حال بیشتر جاذب‌های مطالعه شده برای صاحبان مزارع پرورش کوچک در کشورهای در حال توسعه صرفه اقتصادی ندارد و روی آوردن به جاذب‌های بومی و قابل دسترس برای آن‌ها از قبیل بنتونیت، کربن فعال و فولر حائز اهمیت است (۳۴). کربن فعال یکی از جاذب‌های عالی، است که طی عمل فرآوری بر روی زغال به شکل کریستالی

آلودگی میکوتوکسین در خوراک دام یک مشکل جهانی است و در میان میکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها یکی از خطرناک‌ترین سموم در خوراک‌های حیوانی، در سراسر جهان می‌باشند (۳۸، ۵۲). آفلاتوکسین‌ها مشتق شده از دیفوروکومارین هستند که توسط گونه‌های مختلف سمی اسپیریلوس ساخته می‌شوند. از نظر شیمیایی، آفلاتوکسین‌ها دارای ساختار دیفوروکومارین بوده و شامل دو کلاس اصلی دیفوروکومارولاکتون (آفلاتوکسین G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub>) و دیفوروکوماروسیکلوپنتنون (آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، B<sub>2</sub>A، M<sub>1</sub>، M<sub>2</sub>، M<sub>2</sub>A و آفلاتوکسیکول) هستند. سمی‌ترین و فراوان‌ترین نوع آفلاتوکسین B<sub>1</sub> می‌باشد (۲۳) که مواد خوراکی را در مزرعه یا انبار آلوده می‌کند و مصرف آن‌ها سبب مسمومیت چندگانه سیستم ایمنی، کبد، سرطان‌زایی و اختلالات ژنتیکی در انسان و حیوان می‌شود (۴، ۵، ۲۶، ۳۷، ۴۵). آفلاتوکسین B<sub>1</sub> سبب خسارت اقتصادی شدید و مشکلات سلامتی در پرورش گاو شیری می‌شود چون آفلاتوکسین B<sub>1</sub> به مقدار جزئی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه تجزیه شده و مابقی آن در کبد به آفلاتوکسین M<sub>1</sub> تبدیل و در نهایت به شیر وارد می‌شود (۳۳). نرخ تبدیل آفلاتوکسین B<sub>1</sub> از خوراک به آفلاتوکسین M<sub>1</sub> شیر ۰/۰۱ الی

۳۹ درجه سانتی‌گراد در حمام بن‌ماری تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شد. بزاق مصنوعی نیز در شرایط آزمایشگاهی و بی‌هوازی به‌روش مکدوگال تولید و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۰). سپس مایع شکمه و بزاق مصنوعی با نسبت یک به دو مخلوط گردید. در این روش با استفاده از آسیاب با قطر منافذ یک میلی‌متر، جیره غذایی به‌صورت یکنواخت آسیاب و مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در درون ظروف شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. تیمارهای آزمایشی شامل آفلاتوکسین و سطوح مختلف کربن فعال به داخل آن‌ها افزوده شد و سپس مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمه داخل هر ظرف ریخته شد. حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. میانگین گاز تولیدی در ظروف فاقد جیره آزمایشی، از ظروف دارای تیمارهای آزمایشی کم شده و از این طریق حجم خالص گاز به‌دست آمد. حجم گاز تولیدی برای یک گرم نمونه بر اساس وزن نمونه‌ها در هر زمان با استفاده از رابطه (۱) تصحیح شد:

$$V = (V_t - V_b) \times 1000 / W \quad (1) \text{ رابطه}$$

$$P = b (1 - e^{-ct}) \quad (2) \text{ رابطه}$$

که طبق این رابطه  $V$  برابر با حجم گاز تصحیح‌شده بر حسب میلی‌لیتر به‌ازای 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 (۲) حجم گاز تولیدی و نرخ تولید گاز به‌دست آمد که در این رابطه  $P$ : حجم تولید گاز در زمان  $t$  به‌صورت تجمعی  $c$ : ثابت نرخ تولید گاز،  $b$ : کل گاز تولید شده از بخش قابل تخمیر،  $t$ : مدت زمان انکوباسیون است (۴۱).

برای تخمین انرژی قابل متابولیسم (ME)، انرژی خالص شیرواری (NEL) و قابلیت هضم ماده آلی (DOM) (۳۱) و برآورد میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFAs) از روابط ۳ الی ۶ استفاده شد (۵۲).

$$\text{رابطه (۳)}$$

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

$$\text{رابطه (۴)}$$

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

$$\text{رابطه (۵)}$$

$$DOM \% = 0.9991 \times GP + 0.0595 \times CP + 0.0181 \times CA + 9$$

$$\text{رابطه (۶)}$$

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

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

به‌منظور تعیین pH گاز تولیدی چهار تکرار از هر تیمار در ساعت ۲۴، از بن‌ماری خارج گردید و سریعاً pH آن‌ها توسط pH متر (Hi 2211-Hanna Instruments - USA)

با ساختار دارای منافذ زیاد و سطح خیلی زیاد برای واکنش شیمیایی و جذب تولید می‌شود (۱). نسبت سطح به جرم کربن فعال از ۵۰۰ تا ۳۵۰۰ متر مربع بر گرم متفاوت است و از آن می‌توان به‌عنوان باندکننده موثر برای طیف وسیعی از مواد سمی و دارویی استفاده کرد (۱۲). کربن فعال به‌عنوان یک ماده افزودنی شیمیایی، توانایی جذب مواد آلی، غیرآلی و ذرات کلوییدی را دارد و در جیره نشخوارکنندگان به‌عنوان ضد سم قابلیت استفاده دارد. در آزمایشی نشان دادند که کربن فعال، قابلیت بالایی در جذب آفلاتوکسین  $B_1$  در شرایط آزمایشگاهی و حیوان زنده دارد (۱۸، ۱۶). بنابراین آزمایش حاضر با هدف بررسی تاثیر سطوح مختلف کربن فعال بر کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین  $B_1$  بر فرآیندهای تخمیری شکمه و همچنین اثر آن بر قابلیت هضم ماده خشک و آلی انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تبریز انجام گرفت. مایع شکمه از سه رأس گوسفند دارای فیستوله که میانگین وزن زنده آن‌ها ۴۰ کیلوگرم بود، استخراج شد. در جدول ۱ ترکیب جیره غذایی آورده شده است. گوسفندها در دو وعده غذایی و صبح و عصر تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره پایه (شاهد بدون متانول)، ۲- جیره پایه + متانول (شاهد با متانول)، ۳- جیره پایه + متانول حاوی ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمه (جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین)، ۴- جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین + سطح یک کربن فعال (هفت میلی‌گرم برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک) ۵- جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین + سطح دو کربن فعال (۷۵ میلی‌گرم برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک) و ۶- جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین + سطح سه کربن فعال (۱۵۰ میلی‌گرم برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک) بودند.

به‌منظور تولید آفلاتوکسین یک ظرف حاوی سوبه استاندارد قارچ *Aspergillus Parasiticus* NRLL 2999 تهیه و روی محیط کشت دکستروز آگار حاوی سیب‌زمینی (potato dextrose agar) در محیط آزمایشگاهی و به‌روش درون شیشه‌ای تحت شرایط استریل کشت گردید. سوسپانسیون اسپور با غلظت  $6.5 \times 10^6$  از رشد قارچ‌ها تهیه و مقدار دو میلی‌لیتر از آن به‌داخل فلاسکی که حاوی محیط کشت استریل بود، افزوده شد. محیط کشت تلقیح شده با اسپور قارچی به‌مدت پنج روز و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در داخل انکوباتور شیکر قرار داده شد. محیط کشت تهیه شده در آن خشک و سپس میزان آفلاتوکسین  $B_1$  آن به‌روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد (۳۷). بر اساس غلظت آفلاتوکسین تولیدی (جدول دو)، مقدار مورد نیاز در اتانول حل و تیمارها تهیه شد.

برای تولید گاز در آزمایشگاه و شبیه‌سازی محیط شکمه از روش منک استفاده شد (۳۲). قبل از تغذیه صبح، از دام‌های دارای فیستولای شکمه‌ای مایع شکمه تهیه و با پارچه پنبه سازی صاف شد و پس از افزودن گاز دی‌اکسیدکربن در دمای

اثر کربن فعال بر فرآیندهای تخمیری و تجزیه‌پذیری جیره غذایی آلوده با آفاتوکسین B<sub>1</sub> با استفاده از میکروارگانیسم‌های ..... ۹۲

اندازه‌گیری شد و جهت خروج کامل باکتریایی و به‌دست‌آوردن مقادیر ماده خشک تجزیه نشده در هر بطری، محتویات هر بطری سه بار به‌وسیله شوینده خنثی شسته شد و با استفاده از کاغذ صافی بدون خاکستر صاف و باقی‌مانده در

اون و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. برای اندازه‌گیری مقادیر خاکستر مواد تجزیه‌نشده، از کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هشت ساعت استفاده شد (۴۷).

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره غذایی (درصد ماده خشک) (NRC, 2007)

Table 1. Ingredients and chemical composition of diet

| مورد                                   | درصد از جیره |
|--|--------------|
| یونجه خشک                              | ۵۰           |
| دانه جو                                | ۳۱/۵         |
| سبوس گندم                              | ۶            |
| کنجاله سویا                            | ۶            |
| دانه ذرت                               | ۳            |
| مکمل ویتامین و مواد معدنی <sup>۱</sup> | ۱            |
| دی کلسیم فسفات                         | ۱            |
| نمک                                    | ۰/۵          |
| کلسیم کرینات                           | ۱            |
| ترکیبات شیمیایی                        |              |
| ماده خشک                               | ۹۲           |
| مواد آلی                               | ۸۹/۷۷        |
| پروتئین خام                            | ۱۴/۹         |
| الیاف نامحلول در شوینده خنثی           | ۳۵           |
| الیاف نامحلول در شوینده اسیدی          | ۲۱/۳۶        |
| خاکستر                                 | ۱۰/۲۲        |
| عصاره‌های                              | ۵/۷۳         |

۱- هر کیلوگرم 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 بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۸ واحد بین‌المللی ویتامین E

جدول ۲- غلظت انواع آفاتوکسین در محیط کشت تولید شده (میلی‌گرم در کیلوگرم)

Table 2. Concentration of different type of aflatoxin in produced media culture (mg/kg).

| نوع آفاتوکسین | غلظت (میلی‌گرم بر کیلوگرم) |
|---------------|----------------------------|
| آفاتوکسین B1  | ۲۵۰/۸                      |
| آفاتوکسین B2  | ۱۰۷/۴                      |
| آفاتوکسین G1  | —                          |
| آفاتوکسین G2  | ۵۰/۷                       |
| کل آفاتوکسین  | ۴۰۹                        |

برای محاسبه مقادیر توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی از روش (۲۹) و طبق رابطه (۸) استفاده شد (۴۴).

$$\text{MM (mg)} = [c - (a - b)] - [\text{NG}_{\text{ml}} \times 2 / 2k] \quad (۸)$$

که در این رابطه MM، میلی‌گرم توده میکروبی تولید شده، NG، میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی، K، ضریب استوکیومتری و مقدار آن ۲/۲ می‌باشد.

#### مدل آماری

این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام گرفت که مدل آماری طرح به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (۹)$$

در این مدل نشان‌دهنده مقدار هر مشاهده،  $\mu$  برابر با میانگین کل،  $T_i$  اثر تیمار،  $e_{ij}$  خطای آزمایش می‌باشد. داده‌های این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ (SAS, 2002) مورد آنالیز قرار گرفتند و برای مقایسات میانگین، از آزمون دانکن با سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

مقدار ۰/۰۵ گرم نمونه یا محلول استاندارد را با ۲/۵ میلی‌لیتر فنول و دو میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت ترکیب و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه انکوبه کرده و پس از خنک‌شدن، جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد (۶).

از روش استاندارد (۲۹) برای تعیین عامل تفکیک‌پذیری استفاده شد. عامل تفکیک (Partitioning factor) عبارت است از میلی‌گرم ماده آلی تجزیه‌شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی که طبق رابطه (۷) محاسبه شد (۴۷).

$$\text{PF} = \text{OMDe} / \text{IVGP} = c - (a - b) / \text{IVGP}$$

در رابطه بالا: c ماده آلی وزن شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم)، b مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم)، و IVGP گاز تولیدی است.

## نتایج و بحث

داده‌های مربوط به فراسنجه‌های تولید گاز و تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی در جدول سه آورده شده است. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که، نرخ تولید گاز در تیمار شاهد و شاهد همراه با متانول به ترتیب ۰/۰۵۷، ۰/۰۵۹ میلی‌لیتر در میلی‌گرم ماده خشک می‌باشد نرخ تولید گاز گروه آفلاتوکسین (۰/۰۷) در مقایسه با گروه شاهد تنها از لحاظ عددی افزایش یافت. با افزودن دو سطح بالای کربن فعال، نرخ تولید گاز به‌طور معنی‌دار کاهش داشت و به ترتیب برابر با ۰/۰۳۸ و ۰/۰۴۲ شد. نوع سوبسترا تخمیری و میکروارگانیسم‌های غالب شکمبه نرخ تولید گاز را تعیین می‌کند (۱۷) بنابراین نرخ تولید بالا در جیره آلوده به آفلاتوکسین می‌تواند ناشی از اثر انتخابی آفلاتوکسین بر اکوسیستم میکروبی و باکتری‌های سریع تخمیرکننده شکمبه باشد. به‌نظر می‌رسد کربن فعال با جذب آفلاتوکسین و و اثر انتخابی بر میکروارگانیسم‌های شکمبه نرخ تولید گاز را تعدیل کرده است.

کل گاز تولیدی در تیمارهای شاهد و شاهد همراه با متانول به ترتیب برابر با ۲۹۵/۰۵ و ۲۹۴/۳۸ میلی‌لیتر بر گرم خوراک می‌باشد و در تیمار آفلاتوکسین این مقدار به ۲۲۸/۴۸ کاهش پیدا کرد و در تیمارهای آفلاتوکسین به‌علاوه سطوح یک، دو و سه کربن فعال به ترتیب برابر با ۲۴۸/۹۵، ۲۶۵/۴۶ و ۲۹۲/۰۷ می‌باشد که در مقایسه با تیمار آفلاتوکسین کل گاز تولیدی افزایش یافته ولی در مقایسه با تیمار شاهد، کاهش داشت، همانطور که در شکل یک نشان داده شده است، از نظر تولید گاز طی ساعات اولیه (تا ساعت ۱۲ انکوباسیون) اختلاف معنی‌داری نداشت، ولی با افزایش زمان انکوباسیون، به‌خصوص ۳۶ ساعت به بعد تولید گاز در تیمارهای شاهد، شاهد همراه با متانول و آفلاتوکسین همراه با سطح سه کربن فعال در حداکثر میزان خود قرار داشته و در تیمار آفلاتوکسین کاهش‌یافته و این روند تا آخرین ساعت انکوباسیون (۹۶) ادامه داشت. زمانی که در یک محیط کشت، جاذب آفلاتوکسین وجود ندارد، فراسنجه‌های تولید گاز کاهش می‌یابند که دلیل این امر احتمالاً می‌تواند به تاثیر منفی آفلاتوکسین بر جمعیت میکروبی شکمبه باشد (۲۵، ۲۲). برخلاف داده‌های حاصل از این آزمایش، طی آزمایشی نشان داده شد که نرخ تولید گاز پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی که از جاذب‌های آفلاتوکسین (کربن فعال و بنتونیت) استفاده شده بود، افزایش یافت (۲۴). مشابه با این داده‌ها طی آزمایشی نشان داده شد که افزودن جاذب‌های بنتونیتی در سطح شش درصد جیره پایه منجر به کاهش معنی‌داری در نرخ و میزان تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد شد (۳۵).

همان‌طور که در جدول سه مشاهده می‌گردد، با افزودن ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین به جیره غذایی، تجزیه‌پذیری ماده آلی و ماده خشک در مقایسه با گروه شاهد و شاهد با متانول کاهش معنی‌دار داشت و با افزودن جاذب کربن فعال در سطح هفت میلی‌گرم در ۲۰۰ میلی‌گرم جیره غذایی از لحاظ عددی، افزایش ولی تغییر معنی‌دار صورت

نگرفت. اما سطوح ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم کربن فعال سبب بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر تجزیه‌پذیری شدند، به‌طوری که میزان تجزیه‌پذیری آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. ضریب تجزیه‌پذیری ماده آلی برای تیمارهای شاهد، شاهد همراه با متانول، آفلاتوکسین و آفلاتوکسین به‌علاوه سطوح یک، دو و سه کربن فعال به ترتیب برابر با ۷۴/۹۶، ۷۱/۸۹، ۴۴/۸۷، ۴۴/۱۹، ۴۴/۸۶ و ۷۰/۹۹ درصد می‌باشد. تجزیه‌پذیری ماده خشک در تیمارهای شاهد و شاهد همراه با متانول برابر با ۵۸/۸۴ و ۵۵/۵۰ می‌باشد و با هم تفاوت معنی‌داری نداشت و بیانگر این موضوع است که حلال افزوده‌شده تاثیری بر تجزیه‌پذیری نداشت. میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک در تیمار جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار شاهد کاهش‌یافته و به عدد ۲۹/۱۷ درصد می‌رسد و در تیمارهای کربن فعال با افزایش سطوح آن این پارامتر به ترتیب از لحاظ عددی (۴۲، ۴۶/۸۳ و ۵۷/۱۷ درصد) افزایش داشت، ولی تجزیه‌پذیری ماده خشک تنها در سطح سوم کربن فعال از لحاظ آماری معنی‌دار شد. بر خلاف نتایج آزمایش حاضر افزودن آفلاتوکسین به‌میزان یک میکروگرم در میلی‌گرم و جاذب کربن فعال و مخمر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (۵۳) به‌نظر می‌رسد کربن فعال با اتصال به مایکوتوکسین کارکرد آن‌ها را تغییر داده و از اختلال فعالیت شکمبه و کاهش هضم ایلیاف و تولید اسیدهای چرب فرار جلوگیری می‌کند. به‌طوری‌که در آزمایشی نشان دادند که آفلاتوکسین B<sub>1</sub> تقریباً به‌میزان ۱۰۰ درصد به کربن فعال می‌چسبد (۱۳). و هر موقع کربن فعال در جیره غذایی افزوده می‌شود، اثرگذاری کمتری در کاهش انتقال آفلاتوکسین به شیر مشاهده می‌شود. مشابه نتایج آزمایش حاضر گزارش کردند آفلاتوکسین B<sub>1</sub> موجب کاهش فراسنجه‌های شکمبه‌ای آزمایشگاهی از قبیل تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی، تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه می‌شود و با افزودن جاذب بنتونیت و کربن فعال به جیره غذایی آلوده با ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B<sub>1</sub> میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و میزان تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی بهبود می‌یابد (۲). همچنین در شرایط درون‌تنی با مکمل کردن جیره غذایی با کربن فعال قابلیت هضم ظاهری کل دستگاه گوارش برای همی‌سلولز، پروتئین خام و ایلیاف نامحلول در شوینده خنثی در گاو شیری افزایش یافت (۱۶). محققین بیان داشتند که افزودن کربن فعال به‌میزان ۲۰ یا ۴۰ گرم در روز سبب بهبود قابلیت هضم مواد مغذی در دام‌های تغذیه شده با علوفه کیفیت پایین و دارای کپک می‌شود، ولی در گاوهای تغذیه‌شده با علوفه سالم تاثیری بر قابلیت هضم و تولید آن‌ها ندارد (۱۶) بنابراین اثر مثبت کربن فعال در آزمایش حاضر را می‌توان به خواص جذبی آن با سم آفلاتوکسین جیره غذایی مرتبط دانست که با غیرقابل دسترس کردن سموم، شرایط برای تخمیر و تجزیه‌پذیری مواد خوراکی توسط میکروارگانیسم‌ها فراهم کرده است. کربن فعال نوعی زغال یا کربن فرآوری شده از مواد خام در شرایط ۱۵۰ الی ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد تولید

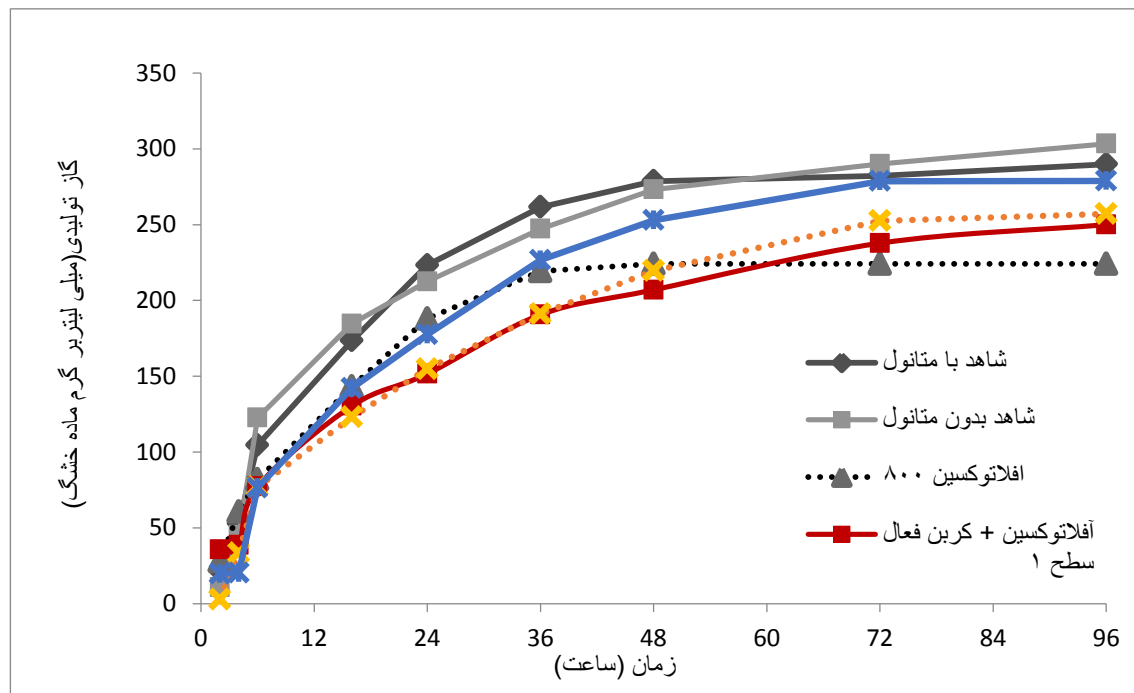
می‌شود و طی این فرآوری مواد غیرکربنی از آن خارج شده و بخش کربنه دارای سطح وسیعی با جایگاه اتصال بالا باقی می‌ماند (۱۹) و بخش کربنه با روش فیزیکی جریان بخار یا دی‌اکسیدکربن در دمای بالا فعال‌سازی می‌شود.

جدول ۳- تاثیر آفلاتوکسین و کربن فعال به‌عنوان باندکننده سموم بر گاز تولیدی و نرخ تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در شرایط آزمایشگاهی

Table 3. Effect of aflatoxin and activated carbon as a toxin binder on gas production, gas production rate and degradability of dry matter and organic matter in in vitro condition.

| سطح معنی‌داری | خطای استاندارد | تیمارهای آزمایشی              |                               |                               |                      |                       |                       |
|---------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|               |                | آفلاتوکسین + سطح سه کربن فعال | آفلاتوکسین + سطح دو کربن فعال | آفلاتوکسین + سطح یک کربن فعال | آفلاتوکسین           | شاهد با متانول        | شاهد بدون متانول      |
| <./۰.۰۱       | ۰./۰.۰۴۶       | ۰./۰.۴۳ <sup>c</sup>          | ۰./۰.۳۸ <sup>c</sup>          | ۰./۰.۴۶ <sup>bc</sup>         | ۰./۰.۷۰ <sup>a</sup> | ۰./۰.۵۹ <sup>ab</sup> | ۰./۰.۵۷ <sup>ab</sup> |
| ۰./۰.۰۹       | ۱۳/۸۰          | ۲۹۲/۰.۷ <sup>a</sup>          | ۲۶۵/۴۶ <sup>ab</sup>          | ۲۴۸/۹۵ <sup>b</sup>           | ۲۲۸/۴۸ <sup>b</sup>  | ۲۹۴/۳۸ <sup>a</sup>   | ۲۹۵/۰.۵ <sup>a</sup>  |
| <./۰.۰۱       | ۲/۸۶           | ۷۰/۹۹ <sup>ab</sup>           | ۶۴/۸۶ <sup>b</sup>            | ۴۹/۱۹ <sup>c</sup>            | ۴۴/۸۷ <sup>c</sup>   | ۷۱/۸۹ <sup>ab</sup>   | ۷۴/۹۶ <sup>a</sup>    |
| <./۰.۰۱       | ۳/۲۴           | ۵۷/۱۷ <sup>ab</sup>           | ۴۶/۸۳ <sup>bc</sup>           | ۴۲ <sup>c</sup>               | ۲۹/۱۷ <sup>d</sup>   | ۵۵/۵۰ <sup>ab</sup>   | ۵۸/۸۴ <sup>a</sup>    |

۱- تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه)، آفلاتوکسین + سطح یک کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه + هفت میلی‌گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح دو کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۷۵ میلی‌گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح سه کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۱۵۰ میلی‌گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک) تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.



شکل ۱- اثر سطوح مختلف کربن فعال بر منحنی تولید گاز در جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B<sub>1</sub>  
Figure 1. Effect of different level of activated carbon on gas production curve in contaminated diet with aflatoxin B<sub>1</sub>

به‌صورت معنی‌داری انرژی متابولیسی را از ۹/۱۵ به ۷/۶۲ و قابلیت هضم ماده آلی را از ۵۷/۲۶ درصد به ۵۰/۶۲ درصد در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد. مشابه نتایج آزمایش حاضر (۲۸) گزارش کردند افزودن آفلاتوکسین به‌میزان ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت شکمبه‌ای سبب کاهش قابلیت هضم ماده آلی می‌شود. همچنین کاهش قابلیت هضم شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی با افزودن آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در سطح ۳۰۰ الی ۹۶۰ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است

نتایج افزودن آفلاتوکسین و جاذب کربن فعال بر فرآیندهای تخمیری شامل انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی، قابلیت هضم ماده آلی، میزان اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی در جدول چهار آمده است. میزان انرژی متابولیسی، انرژی متابولیسی شیر و قابلیت هضم ماده آلی در بین تیمارهای شاهد و شاهد همراه با متانول اختلاف معنی‌داری نداشت و بیان‌گر عدم تأثیرگذاری حلال مورد استفاده بر این فرآیندها است (جدول ۴). تیمار آفلاتوکسین

معنی داری با تیمارهای شاهد نشان داد. در مطالعه‌ای گزارشی شده است زمانی که آفلاتوکسین به مقدار ۰/۲ تا ۰/۸ میکروگرم به ازای میلی لیتر مایع شکمبه به محیط کشت اضافه گردید، غلظت اسیدهای چرب فرار کاهش یافت (۹). حضور آفلاتوکسین در محیط کشت احتمالاً سبب کاهش رشد و فعالیتهای متابولیکی میکرو ارگانیسمهای شکمبه‌ای می‌شود. مشابه نتایج آزمایش حاضر، آفلاتوکسین موجود در جیره غذایی موجب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار (۲۴) و حرکات شکمبه می‌گردد (۴۴) به طوری که با افزودن ۹۶۰ نانوگرم آفلاتوکسین B<sub>1</sub> به جیره غذایی سبب کاهش کل اسیدهای چرب فرار در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۲۵). هر چند در دیگر تحقیقات غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه بره‌های در حال رشد تغذیه شده با ۲/۵ میلی گرم آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در کیلوگرم (۱۴) و گوساله‌های نر تغذیه شده با ۶۰-۶۰۰ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B<sub>1</sub> تأثیری بر تولید اسیدهای چرب فرار نداشت (۲۲). غلظت اسید چرب در تیمارهای کربن فعال در مقایسه با گروه آفلاتوکسین تفاوت معنی داری نداشتند و بر خلاف انتظار مکمل سازی با کربن فعال نتوانست اثر منفی آفلاتوکسین بر این فراسنجه را بهبود بخشد، هرچند با افزایش سطوح کربن فعال، غلظت اسیدهای چرب فرار از نظر عددی سیر صعودی داشت. مشابه نتایج آزمایش حاضر افزودن ۰/۵ درصد کربن فعال (۵۳) و جاذب آلومینو سلیکاتی (۱۰ گرم در لیتر) در محیط کشت شکمبه‌ای حاوی آفلاتوکسین به میزان یک میکروگرم در میلی لیتر تأثیری بر کل اسیدهای چرب شکمبه‌ای نداشت (۲۴).

(۳۶). فراسنجه‌های تخمینی مورد اشاره با افزودن سطوح مختلف کربن فعال به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین، در مقایسه با تیمار گروه آفلاتوکسین تغییر معنی داری نداشت و از اثرات منفی آفلاتوکسین بر این فراسنجه‌ها جلوگیری نکرد. هرچند با افزایش سطوح کربن فعال، مقادیر فراسنجه‌ها به صورت عددی روند افزایشی داشت. در گزارشی نشان داده شده است زمانی که آفلاتوکسین به مقدار ۰/۲ تا ۰/۸ میکروگرم به ازای میلی لیتر مایع شکمبه به محیط کشت اضافه گردید، انرژی متابولیکی کاهش یافت (۹). قابلیت هضم ماده خشک در علوفه‌هایی که از آفلاتوکسین به مقدار یک میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد، به میزان ۵۰ درصد کاهش یافت (۵۰) و زمانی که از جاذب‌های بنتونیت و کربن فعال در تیمارهای آفلاتوکسین B<sub>1</sub> استفاده شده، قابلیت هضم بهبود یافته است (۲۴). سطوح افزایشی کربن فعال تأثیری بر جبران اثرات منفی آفلاتوکسین بر صفات انرژی متابولیکی، انرژی خالص شیردهی و قابلیت هضم ماده آلی نشان نداد. مشابه نتایج آزمایش حاضر گزارش کردند که افزودن کربن فعال به میزان ۰/۵ درصد به جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین (یک میکروگرم در میلی گرم جیره غذایی) تأثیری بر قابلیت هضم ماده آلی و ماده خشک در شرایط برون تنی نداشت (۵۳). غلظت اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی از جمله شاخص‌های مهم برای ارزیابی کار کرد تخمیری شکمبه و تأثیر تیمارهای غذایی بر آن تلقی می‌شود (۲۱). غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه در تیمارهای شاهد (۱/۰۴) و شاهد همراه با متانول (۱/۰۹) در حداکثر مقدار خود بود و اما مقدار آن در تیمار آفلاتوکسین کاهش یافته (۰/۸۹) و اختلاف

جدول ۴- تأثیر آفلاتوکسین و کربن فعال به عنوان جاذب سموم در جیره دام بر فراسنجه‌های تخمیری جیره غذایی در شرایط آزمایشگاهی توسط میکروارگانیسم‌های جدا شده از شکمبه گوسفند

Table 4. Effect of aflatoxin and activated carbon as a toxin binder in animal diet on fermentation parameters of diet in vitro by microorganisms isolated from rumen of sheep

| مورد   | تیمارهای آزمایشی   |                        |                        |                        | شاهد با متانول     | شاهد بدون متانول   | انرژی متابولیکی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک) |
|--|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--|
|  | افلاتوکسین         | افلاتوکسین + کربن فعال | افلاتوکسین + کربن فعال | افلاتوکسین + کربن فعال |                    |                    |  |
| انرژی خالص شیردهی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک) | ۷/۶۲ <sup>b</sup>  | ۶/۱۳ <sup>b</sup>      | ۶/۵۴ <sup>b</sup>      | ۶/۹۸ <sup>b</sup>      | ۸/۶۷ <sup>ab</sup> | ۹/۱۵ <sup>a</sup>  | ۰/۰۰۱  |
| انرژی خالص شیردهی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک) | ۴/۵۴ <sup>b</sup>  | ۳/۹۲ <sup>b</sup>      | ۴/۱۴ <sup>b</sup>      | ۴/۲۳ <sup>b</sup>      | ۵/۴۷ <sup>a</sup>  | ۵/۱۹ <sup>a</sup>  | ۰/۰۰۱  |
| ماده آلی قابل هضم (درصد)                       | ۵۰/۶۲ <sup>b</sup> | ۴۱/۵۷ <sup>b</sup>     | ۴۳/۷۵ <sup>b</sup>     | ۴۶/۵۵ <sup>b</sup>     | ۵۹/۶۵ <sup>a</sup> | ۵۷/۲۶ <sup>a</sup> | ۰/۰۰۱  |
| اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر گرم ماده خشک)    | ۰/۸۹ <sup>b</sup>  | ۰/۷۱ <sup>b</sup>      | ۰/۷۴ <sup>b</sup>      | ۰/۸۰ <sup>b</sup>      | ۱/۰۹ <sup>a</sup>  | ۱/۰۴ <sup>a</sup>  | ۰/۰۰۱  |
| نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم در دسی لیتر)        | ۲۳/۵۷ <sup>a</sup> | ۲۲/۶۳ <sup>a</sup>     | ۲۰/۵۳ <sup>b</sup>     | ۲۰/۸۸ <sup>b</sup>     | ۲۰/۷۳ <sup>b</sup> | ۱۹/۰۲ <sup>c</sup> | ۰/۰۰۱  |

۱- تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه)، آفلاتوکسین + سطح یک کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۷۵ میلی گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح دو کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی لیتر مایع شکمبه + ۱۵۰ میلی گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی گرم خوراک)، تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی دار دارند.

افزایشی کربن فعال به جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین سبب کاهش مقدار نیتروژن آمونیاکی شد به طوری که سطوح دو و سه کربن فعال اختلاف معنی داری با گروه آفلاتوکسین داشت (۲۲/۶۳، ۲۰/۵۳ و ۲۰/۸۸ میلی گرم در دسی لیتر) ولی سطح

غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار آفلاتوکسین (۲۳/۵۷ میلی گرم در دسی لیتر) در مقایسه با گروه شاهد (۱۹/۰۲ میلی گرم در دسی لیتر) و گروه شاهد همراه با متانول (۲۰/۷۳ میلی گرم در دسی لیتر) افزایش داشته است. افزودن سطوح

با نتایج آزمایش حاضر با افزودن بنتونیت و کربن فعال به محیط کشت حاوی آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، میزان نیتروژن آمونیاکی کاهش یافت (۲۴) همچنین زمانی که کربن فعال به جیره افزوده شد، غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش نشان داد (۴۸). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که در محیط کشت‌هایی که جاذب ندارند، اضافه کردن آفلاتوکسین B<sub>1</sub> به محیط کشت سبب می‌شود تا آفلاتوکسین B<sub>1</sub> به پروتئین خوراک متصل شده و آن را از دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه خارج کند و به دنبال آن هضم پروتئین کاهش یافته و نیتروژن کمی تولید شود (۲۵، ۱۳). طی مطالعه‌ای که انجام گرفت، نشان داده شد که به دنبال استفاده از بنتونیت سدیم، جمعیت پروتوزوایی کاسته و جمعیت باکتریایی افزایش می‌یابد و در نتیجه دسترسی میکروارگانیسم‌ها به نیتروژن آمونیاکی افزایش یافته و نیتروژن بیشتری را از محیط شکمبه برداشت می‌کنند و به همین دلیل غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه کاهش می‌یابد (۵۱). مطالعه دیگری نیز نشان داد که کربن فعال نیز همانند بنتونیت سدیم در محیطی که غلظت آمونیاک بالا می‌باشد، قادر است آن را جذب کرده و در غلظت‌های پایین، آمونیاک را به محیط آزاد سازد (۱۵).

پایین آن تاثیر معنی‌دار نداشت (جدول ۴). افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه گاوهای تغذیه شده با آفلاتوکسین B<sub>1</sub> گزارش شده است (۴۹)، بر خلاف این نتایج کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی، تجزیه سلولز و تولید اسیدهای چرب فرار با تغذیه ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنی آفلاتوکسین B<sub>1</sub> به گوساله‌های نر گزارش شده است (۱۰). در شکمبه معمولاً میکروارگانیسم‌ها پروتئین مواد خوراکی را تجزیه و آمین‌زدایی کرده و سبب تولید پپتید و اسیدهای آمینه می‌شوند (۴۳). اگر تجزیه و یا متابولیسم پروتئین جیره توسط آفلاتوکسین تحریک شود غلظت آمونیاک آزاد، ممکن است تغییر پیدا کند. بالا بودن میزان نیتروژن آمونیاکی در آزمایش حاضر بیانگر تجزیه میکروبی بیشتر پروتئین (۲۰) و اثر منفی آفلاتوکسین بر میکروارگانیسم‌های استفاده‌کننده از نیتروژن آمونیاکی و تبدیل به پروتئین میکروبی می‌باشد، به‌طوری‌که کاهش تولید پروتئین میکروبی و راندمان تولید پروتئین میکروبی مطابق داده‌های جدول پنج نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد. همچنین آفلاتوکسین B<sub>1</sub> احتمالاً با تاثیر منفی بر جمعیت میکروبی مایع شکمبه (۲۴) و کاهش تحرک شکمبه (۱۰) سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک و گاز تولیدی (۲۵) می‌گردد. مطابق

جدول ۵- تاثیر آفلاتوکسین و کربن فعال به‌عنوان باند کننده سموم در جیره دامی حاوی آفلاتوکسین بر عامل تفکیک‌پذیری و تولید توده زنده میکروبی در شرایط آزمایشگاهی

Table 5. Effect of aflatoxin and activated carbon as a toxin binder in contaminated diet with aflatoxin on partitioning factor and production of microbial biomass in vitro

| مورد  | تیمارهای آزمایشی <sup>۱</sup> |                              |                              |                              |                          | شاهد بدون متانول   | شاهد با متانول     |
|---|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
|   | آفلاتوکسین                    | آفلاتوکسین + سطح ۱ کربن فعال | آفلاتوکسین + سطح ۲ کربن فعال | آفلاتوکسین + سطح ۳ کربن فعال | خطای استاندارد معنی‌داری |                    |                    |
| عامل تفکیک (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده بر میلی‌لیتر گاز) | ۲/۳۵ <sup>b</sup>             | ۳/۲۳ <sup>a</sup>            | ۳/۵۱ <sup>a</sup>            | ۳/۵۳ <sup>a</sup>            | ۰/۱۰                     | ۳/۲۸ <sup>a</sup>  | ۳/۴۹ <sup>a</sup>  |
| توده زنده میکروبی (میلی‌گرم)                              | ۴/۷۷ <sup>c</sup>             | ۴۰/۲۸ <sup>b</sup>           | ۵۳/۲۹ <sup>a</sup>           | ۵۳/۹۱ <sup>a</sup>           | ۲/۸۶                     | ۵۰/۳۵ <sup>a</sup> | ۵۰/۸۲ <sup>a</sup> |
| بازده توده زنده میکروبی (درصد)                            | ۲/۵۸ <sup>c</sup>             | ۲۱/۱۱ <sup>b</sup>           | ۲۹/۲۷ <sup>a</sup>           | ۲۹/۹۴ <sup>a</sup>           | ۲/۸۰                     | ۲۷/۲۲ <sup>a</sup> | ۲۷/۴۷ <sup>a</sup> |

۱- تیمارها شامل تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه)، آفلاتوکسین + سطح یک کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه + هفت میلی‌گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح دو کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۷۵ میلی‌گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، آفلاتوکسین + سطح سه کربن فعال (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۱۵۰ میلی‌گرم کربن فعال برای ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک). تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

میکروبی می‌باشد ولی با افزودن کربن فعال مشاهده می‌کنیم که اثرات منفی آفلاتوکسین را کاسته و سبب افزایش عامل تفکیک‌پذیری می‌شود.

تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی نیز همانند عامل تفکیک‌پذیری سیر نزولی داشت به‌گونه‌ای که تولید توده زنده میکروبی در تیمار شاهد ۵۰/۸۲ میلی‌گرم بوده و در تیمار آفلاتوکسین به ۴/۷۷ میلی‌گرم کاهش پیدا کرد، همچنین میزان بازده تولید توده زنده میکروبی برای

عامل تفکیک در بین تیمارهای شاهد در مقایسه با گروه آفلاتوکسین معنی‌دار و مقدار آن در تیمار شاهد، ۳/۴۹ و در تیمار آفلاتوکسین، ۲/۳۵ بود. به‌علاوه افزودن سطوح مختلف کربن فعال در مقایسه با تیمار آفلاتوکسین افزایش معنی‌داری بر عامل تفکیک‌پذیری نشان داد (جدول پنج). این بدین معنا می‌باشد که آفلاتوکسین نیتروژن آمونیاکی را از طریق محدود کردن دسترسی میکروارگانیسم‌ها به پروتئین کاهش داده و سبب می‌شود تا عامل تفکیک‌پذیری نیز کاهش یابد چراکه عامل تفکیک‌پذیری نشان‌دهنده تولید پروتئین

افزودن آن سبب بهبود میزان گاز تولیدی، قابلیت هضم ماده خشک و تجزیه پذیری ماده آلی و عامل تفکیک و تولید توده زنده میکروبی می شود.

تیمارهای شاهد و آفلاتوکسین، به ترتیب برابر ۲۷/۴۷ و ۲/۵۸ بود. می توان نتیجه گرفت کربن فعال پتانسیل بهبود اثرات منفی آفلاتوکسین بر فرآیندهای تخمیری شکمبه را دارد و

## منابع

1. Ao, C. and S. Lee. 2005. Indoor air purification by photocatalyst TiO<sub>2</sub> immobilized on an activated carbon filter installed in an air cleaner. *Chemical engineering science*, 60: 103-109.
2. Assadzadeh, S., A. Tahmasbi, A. Naserian and R. Valizadeh. 2018. The effect of organic and inorganic aflatoxin B1 absorbents on in vitro digestibility and rumen fermentation characteristics. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 9.
3. Avantaggiato, G., M. Solfrizzo and A. Visconti. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins. *Food Additives Contaminants*, 22: 379-388.
4. Bagheri, M., M. Karimi Torshizi and M. Rasaei. 2017. Amelioration of Experimental B1 Aflatoxicosis in Japanese quails by Yolk derived specific antibody. *Research on animal Production*, 8: 42-48 (In persian).
5. Besharati, M., Z. Nematy and R. Safari. 2019. The Effect of adding whey and *L. Buchneri* to alfalfa silage on in vitro gas production and degradability. *Research on animal Production*, 10: 56-63 (In persian).
6. Broderick, G. and J. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63: 64-75.
7. Commission, E. 2003. Commission Directive of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed (Text with EEA relevance), 2003/100/EC. *Official Journal*, L285, 31/10/2003: 33-37.
8. Commission, E. 2006. Commission Regulation of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance), 2006/1881/EC. *Official Journal*, L364, 19/12/2006: 5-24.
9. Conway, H., R. Anderson and E. Bagley. 1978. Detoxification of aflatoxin-contaminated corn by roasting. *Cereal Chemistry*, 55: 115-117.
10. Cook, W., J. Richard, G. Osweiler and D. Trampel. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid. *Am J Vet Res*, 47.
11. Daković, A., M. Tomašević-Čanović, G. Rottinghaus, V. Dondur and Z. Mašić. 2003. Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 30: 157-165.
12. Devreese, M., P. De Backer and S. Croubels. 2013. Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82: 181-190.
13. Diaz, D.E., W.M. Hagler, B.A. Hopkins and L.W. Whitlow. 2003. Aflatoxin binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia*, 156: 223-226.
14. Edrington, T., R. Harvey and L. Kubena. 1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. *Journal of Animal Science*, 72: 1274-1281.
15. El Obied, G., F. Ahmed and N. Bashir. 2005. In vitro effects of some insecticides on rumen fluid fermentation. *Gezira Journal of Agricultural Science*.
16. Erickson, P.S., N.L. Whitehouse and M. Dunn. 2011. Activated carbon supplementation of dairy cow diets: Effects on apparent total-tract nutrient digestibility and taste preference. *The Professional Animal Scientist*, 27: 428-434.
17. France, J., J. Dijkstra, M. Dhanoa, S. Lopez and A. Bannink. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83: 143-150.
18. Galvano, F., A. Pietri, T. Bertuzzi, M. Bognanno, L. Chies, A. DE ANGELIS and M. Galvano. 1997. Activated carbons: in vitro affinity for fumonisin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *Journal of food protection*, 60: 985-991.
19. Greensher, J., H.C. MOFENSON and T.R. Caraccio. 1987. Ascendency of the black bottle (activated charcoal). *Pediatrics*, 80: 949-951.
20. Hackmann, T.J. and J.L. Firkins. 2015. Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. *Frontiers in Microbiology*, 6: 465.
21. Hall, M., T. Nennich, P. Doane and G. Brink. 2015. Total volatile fatty acid concentrations are unreliable estimators of treatment effects on ruminal fermentation in vivo. *Journal of dairy science*, 98: 3988-3999.
22. Helferich, W., W. Garrett, D. Hsieh and R. Baldwin. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *Journal of animal science*, 62: 691-696.

23. Jaynes, W.F. and R.E. Zartman. 2011. Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. *Toxins*, 3: 551-565.
24. Jiang, Y.H., P. Wang, H. Yang and Y. Chen. 2014. The efficacy of bamboo charcoal in comparison with smectite to reduce the detrimental effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen fermentation of a hay-rich feed mixture. *Toxins*, 6: 2008-2023.
25. Jiang, Y., H. Yang, P. Lund and technology. 2012. Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Animal feed science technology*, 175: 85-89.
26. Jouany, J., A. Yiannikouris and G. Bertin. 2009. Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options méditerranéennes*, 85: 205-224.
27. Khadem, A., S. Sharifi, M. Barati and M. Borji. 2012. Evaluation of the effectiveness of yeast, zeolite and active charcoal as aflatoxin absorbents in broiler diets. *Global Veterinaria*, 8: 426-432.
28. Khodabandehloo, M., M. Malecky, H. Aliarabi and A. Saki. 2019. In vitro evaluation of aflatoxin B1 effect on gas production and ruminal fermentation parameters. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20: 263.
29. 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. Springer, p 107-144.
30. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43: 99.
31. Menke, K., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. Schneider. 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.
32. 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.
33. Meucci, V., G. Soldani, E. Razzuoli, G. Saggese and F. Massart. 2011. Mycoestrogen pollution of Italian infant food. *The Journal of pediatrics*, 159: 278-283. e271.
34. Mgbeahuruike, A.C., T.E. Ejioffor, O.C. Christian, V.C. Shoyinka, M. Karlsson and E. Nordkvist. 2018. Detoxification of Aflatoxin-Contaminated Poultry Feeds by 3 Adsorbents, Bentonite, Activated Charcoal, and Fuller's Earth. *The Journal of Applied Poultry Research*, 27: 461-471.
35. Mojtahedi, M., M.D. Mesgaran, S.A. Vakili and M. Hayati-Ashtiani. 2013. Effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen microbial fermentation responses using batch culture. *Annual Research Review in Biology*, 686-693.
36. Mojtahedi, M., M.D. Mesgaran, S.A. Vakili and M. Hayati-Ashtiani. 2013. Effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen microbial fermentation responses using batch culture. *Annual Research Review in Biology*, 686-693.
37. Nemati, Z., A. Karimi and M. Besharati. 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 and Agricultural Engineering*, 8-9.
38. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, H. Malekinejad, G.H. Mogaddam and M. Arzanlou. 2014 Occurrence of aflatoxins in poultry feed and feed ingredients from north western Iran. *European Journal of Zoology Research*, 3: 56-60.
39. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, G.H. Mogaddam and H. Malekinejad. 2014. Effect of bentonite supplementation to the contaminated diets with aflatoxin B1 on broiler performance. presented at the 6th Iranian congress on animal science, Tabriz
40. Nemati, Z., H. Janmohammadi., A. Taghizadeh., H. Maleki Nejad and G. Mogaddam. 2015. Effect of Bentonite as a natural adsorbent to ameliorate the adverse effects of aflatoxin B1 on performance and immune systems in broiler chicks. *Animal Production Research*, 4(3): 67-77.
41. Ørskov, E. and I. McDonald. 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.
42. Pasha, T., M. Farooq, F. Khattak, M. Jabbar and A. Khan. 2007. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science Technology*, 132: 103-110.
43. Reynal, S., I. Ipharraguerre, M. Lineiro, A. Brito, G. Broderick and J. Clark. 2007. Omasal flow of soluble proteins, peptides, and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradabilities. *Journal of Dairy Science*, 90: 1887-1903.
44. Scudamore, K.A. and C.T. Livesey. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 77: 1-17.
45. Shabani, A., B. Dastar, M. Khomeiri, B. Shabanpur and S. Hasani. 2010. Effect of nanozeolite on performance, some blood parameters and ileal bacteria population in broiler chicks fed Aflatoxin contaminated diets. *Research on animal Production. Animal Feed Science Technology*, 1: 58-68 (In Persian).

46. Teleb, H.M., A.A. Hegazy and Y.A. Hussein. 2004. Efficiency of kaolin and activated charcoal to reduce the toxicity of low level of aflatoxin in broilers. *Scientific Journal of King Faisal University*, 5: 1425.
47. Vercoe, P.E., H.P. Makkar and A.C. Schlink. 2010. *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer.
48. Wallace, R. and C. Newbold. 1991. Effects of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and on rumen ciliate protozoa. *The Journal of Agricultural Science*, 116: 163-168.
49. Wang, Q., Y. Zhang, N. Zheng, L. Guo, X. Song, S. Zhao and J. Wang. 2019. Biological system responses of dairy cows to aflatoxin B1 exposure revealed with metabolomic changes in multiple biofluids. *Toxins*, 11: 77.
50. Westlake, K., R. Mackie and M. Dutton. 1989. *In vitro* metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Animal Feed Science Technology*, 25: 169-178.
51. Williams, A.G. and S.E. Withers. 1993. Changes in the rumen microbial population and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. *Canadian journal of microbiology*, 39: 61-69.
52. Williams, J.H., T.D. Phillips, P.E. Jolly, J.K. Stiles, C.M. Jolly and D. Aggarwal. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, 80: 1106-1122.
53. Yeanpet, C., C. Thamrongyoswittayakul, C. Wachirapakorn, P. Songsermsakul, N. Somphon and C. Wongnen. 2018. Efficacy of mycotoxin adsorbents on aflatoxin b1 decontamination and *in vitro* rumen fermentation. *Prawarun Agricultural Journal*, 15: 260-268.

## Effect of Activated Charcoal on the Fermentation Parameters and Degradability of Contaminated Diet with Aflatoxin B<sub>1</sub> by Microorganisms Isolated from Rumen *In Vitro*

Zabihollah Nemati<sup>1</sup>, Rashid Safari<sup>2</sup> and Maghsod Besharati<sup>3</sup>

1- Associate Professor, University of Tabriz, (Corresponding author: znnemati@yahoo.com)

2- Assistant Professor, University of Tabriz

3- Associate Professor, University of Tabriz

Received: March 6, 2020

Accepted: June 15, 2020

### Abstract

The purpose of this experiment was to investigate the effect of activated carbon on reducing the negative effects of aflatoxin on gas production, digestibility of dry matter and organic matter of sheep diet ration under laboratory conditions. In this experiment, we assumed that activated carbon was able to reduce the negative effects of aflatoxin. This experiment was conducted in a completely randomized design with five treatments and four replicates per treatment. Experimental treatments were: 1- control (untreated diet), 2- control with methanol (control + methanol), 3- contaminated diet with methanol solution containing AFB<sub>1</sub> at 800 ng/ml, 4- contaminated diet treated with activated charcoal at 7mg/200mg, 5-contaminated diet treated with activated carbon at 75 mg/200mg and 6-contaminated diet treated with activated carbon at 150 mg/200mg. To measure gas production and digestibility, glass bottles with a volume of 100 ml was used in a constant culture. All bottles were purged with anaerobic CO<sub>2</sub>, sealed with rubber stoppers and incubated in a water bath for 96 h at 39 degree centigrade and their gas production at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h incubation times was measured. The amount of gas produced was measured by means of a pressure gauge. The results showed that aflatoxin B<sub>1</sub> treatment decreased the amount of gas production but the amount of gas production was increased in treated group as supplemented activated carbon level increased ( $p < 0.05$ ). Regarding the digestibility of dry matter and organic matter, there is a similar process to gas production, where aflatoxin treatment reduces both, but in treated group as supplemented activated carbon level increased the amount of them increases ( $p < 0.05$ ). Ammonia N concentration was highest in aflatoxin group and declined with addition of increasing level of activated carbon. Partitioning factor, microbial mass and efficiency of microbial synthesis were distinctly lower in aflatoxin group than other groups ( $p < 0.05$ ). However, treatments that containing high level of activated carbon had higher Partitioning factor, microbial biomass production and efficiency of microbial synthesis. It can be concluded that activated carbon has the potential to improve detrimental effect of aflatoxin on ruminal fermentation.

**Keywords:** Aflatoxin, Activated Carbon, Degradability and Organic Matter, Digestibility, Gas Production