



اثر آفاتوکسین B₁ بر قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه‌ای جیره غذایی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی

ذبیح‌اله نعمتی^۱، رشید صفری^۲، نامدار کامرانی^۳، مقصود بشارتی^۲ و محمدرضا شیخلو^۲

۱- دانشیار دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، گروه علوم دامی (نویسنده مسوول: znnemati@yahoo.com, znnemati@tabrizu.ac.ir)

۲ و ۳- استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

صفحه: ۷۵ تا ۸۳

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر سطوح مختلف آفاتوکسین بر تولید گاز، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و قابلیت هضم ماده خشک و آلی جیره غذایی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره غذایی بدون آفاتوکسین و متانول (شاهد)، ۲- جیره غذایی شاهد همراه با متانول ۳- جیره غذایی همراه با متانول حاوی ۴۰۰ نانوگرم آفاتوکسین B₁ در میلی‌لیتر، ۴- جیره غذایی همراه با متانول حاوی ۸۰۰ نانوگرم آفاتوکسین B₁ در میلی‌لیتر ۵- جیره غذایی همراه با متانول حاوی ۱۲۰۰ نانوگرم آفاتوکسین B₁ در میلی‌لیتر مایع شکمبه بودند. برای اندازه‌گیری میزان تولید گاز و قابلیت هضم، از شیشه‌های مخصوص با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر به روش کشت ثابت استفاده شد. تیمارها در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ ساعت انکوباسیون و میزان گاز تولیدی به کمک فشارسنج در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تیمارهای دارای سطوح بالای آفاتوکسین، به‌خصوص سطح ۱۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه، سبب کاهش معنی‌داری در تولید گاز در مقایسه با تیمارهای فاقد آفاتوکسین شدند. افزودن سطوح مختلف آفاتوکسین B₁ سبب کاهش معنی‌داری در قابلیت هضم ماده خشک و آلی، تولید توده میکروبی و عامل تفکیک‌پذیری در مقایسه با تیمار شاهد گردید. نتایج این مطالعه نشان داد شرایط تخمیری محیط کشت در سطح پایین آفاتوکسین چندان تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای توانایی خنثی‌سازی آفاتوکسین را دارد. ولی با افزایش سطح آفاتوکسین در جیره غذایی، میزان تولید گاز، تولید توده میکروبی، عامل تفکیک‌پذیری و قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت آفاتوکسین سبب تغییر فرایندهای تخمیری شکمبه همراه با کاهش تجزیه‌پذیری مواد خوراکی می‌شود که این تغییرات وابسته به غلظت آفاتوکسین B₁ است.

واژه‌های کلیدی: آفاتوکسین، تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی

مقدمه

آفاتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های قارچی، سرطانی، مسموم‌کننده کبد و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی بدن هستند که توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند (۴۳، ۲۹). آلودگی دانه‌های غلات، دانه‌های روغنی و سایر مواد غذایی با آفاتوکسین‌ها بواسطه گرما، خشکسالی، حشرات یا سایر تنش‌های بیولوژیک در طول رشد محصول، حمل و نقل دانه یا در طول ذخیره‌سازی، امری اجتناب‌ناپذیر است (۹). آنها به‌علت زیان‌های جدی اقتصادی و مشکلات بهداشتی در پرورش دام و سلامت عمومی مشکل‌زا هستند (۳۳، ۳۱). یکی از ترکیبات سمی و پیش‌سازهای بیوسنتتیک سایر آفاتوکسین‌ها، آفاتوکسین B₁ است (۲۸) که بر اساس گزارش آژانس تحقیقات سرطان، جزء مواد سرطانی‌زا دسته یک طبقه‌بندی شده است (۱۷). از زمان کشف آنها در دهه ۱۹۶۰، آفاتوکسین‌ها به‌طور مداوم از نقاط مختلف جهان گزارش شده‌اند و حداکثر سطح آفاتوکسین در مواد غذایی، غلات، ادویه‌ها و شیر، مشاهده شده است. بروز آفاتوکسین در مواد غذایی بستگی به عوامل متعددی از قبیل نوع غذا، فصل سال، موقعیت جغرافیایی و همچنین دوره پس از برداشت و مدیریت دارد (۱۸). شرایط محیطی مناسب برای تولید آفاتوکسین، شرایط ذخیره‌سازی نامناسب، آگاهی کشاورزان و مصرف‌کنندگان، موانع فناوری و

به‌ویژه فقر، از دلایل احتمالی مرتبط با سطوح بالای آفاتوکسین‌ها در کشورهای آفریقایی هستند. از سوی دیگر در کشورهای توسعه یافته ممکن است با پذیرش محدودیت‌های استاندارد سخت‌گیرانه علیه آفاتوکسین، اجرای قوانین و مقررات، پیشرفت در فن‌آوری‌های پس از برداشت و آگاهی کشاورزان و مصرف‌کنندگان، سطوح آلودگی با آفاتوکسین کاهش یابد (۳۴، ۱۹، ۱۱۶). بر اساس گزارش محققین با بررسی ۵۷۳ نمونه خوراکی از ۱۶ استان و شهرهای کشور چین غلظت آفاتوکسین B₁ در ذرت ۳/۱ درصد و در دیگر مواد خوراکی ۵/۴ درصد بیش از حد استاندارد ملی بود (۱۶). میزان آلودگی مواد خوراکی با آفاتوکسین در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است به‌طوری‌که بر اساس گزارشی میزان آلودگی در شمال شرقی چین رایج است (۸) و درصد قابل توجهی از مواد خوراکی دام و طیور غرب ایران آلوده به آفاتوکسین هستند (۳۰).

آفاتوکسین‌ها می‌توانند موجب تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه، تغییر نسبت‌های محصولات نهایی هضم و مختل شدن فعالیت شکمبه شده و در نتیجه هضم مصرف خوراک و در نهایت تولید را مختل نمایند (۲۷). در آزمایشی نشان دادند که آفاتوکسین در مقادیر بالاتر از ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در سیستم شکمبه مصنوعی سبب کاهش هضم سلولز و تولید اسیدهای چرب فرار و تولید آمونیاک شد (۱۲).

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش و تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تبریز انجام گرفت. مایع شکمبه سه ساعت بعد از تغذیه وعده صبح از ۳ رأس گوسفند فیستوله‌گذاری شده با میانگین وزن زنده ۴۰ کیلوگرم به دست آمد. جیره غذایی استفاده شده توسط گوسفندان در جدول ۱ آورده شده است. دام‌ها روزانه در دو وعده غذایی صبح و عصر تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره پایه بدون متانول (شاهد)، ۲- جیره پایه + متانول (شاهد با متانول)، ۳- جیره پایه + متانول حاوی ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آفاتوکسین B₁، ۴- جیره پایه + متانول حاوی ۸۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آفاتوکسین B₁ و ۵- جیره پایه + متانول حاوی ۱۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آفاتوکسین B₁ بودند.

با افزودن آفاتوکسین B₁ فراسنجه‌های تولید گاز کاهش می‌یابد (۲۱). ولی میزان ناپدید شدن ماده خشک علوفه آلوده با ۰/۲ و ۱/۴ میکروگرم آفاتوکسین به‌ازای میلی‌لیتر مایع کشت تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد (۳۶). آفاتوکسین B₁ می‌تواند بیش از ۱۸ متابولیت مایع شکمبه، ۱۱ متابولیت پلاسما و ۹ متابولیت شیر را تحت تاثیر قرار دهد. محققین توصیه می‌کنند در بررسی اثرات آفاتوکسین، علاوه بر ارزیابی شاخص‌های اصلی و عملکردی از قبیل میزان تولید و ترکیبات شیر، بررسی شاخص‌های جزیی از جمله متابولیت‌های مایع شکمبه ضروری است (۴۲). بنابراین این آزمایش با هدف بررسی تاثیر آفاتوکسین B₁ (تولید شده در شرایط طبیعی و کشت شده بر روی برنج) بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه و قابلیت هضم ماده خشک و آلی جیره غذایی انجام یافت.

جدول ۱- اقلام و ترکیب شیمیایی جیره غذایی استفاده شده در آزمایش برون تنی (درصد ماده خشک) (NRC, 2007)

Table 1. Ingredient and chemical composition of diet used in *in vitro* (% DM, NRC 2007)

درصد از جیره	مورد
۵۰	یونجه خشک
۳۱/۵	دانه جو
۳	دانه ذرت
۶	سبوس گندم
۶	کنجاله سویا
۱	مکمل ویتامین و مواد معدنی ^۱
۱	دی کلسیم فسفات
۰/۵	نمک
۱	کلسیم کربنات
	ترکیبات شیمیایی
۹۲	ماده خشک
۲/۱۱	انرژی متابولیسمی (مگا کالری در کیلوگرم)
۸۹/۷۷	مواد آلی
۱۴/۹	پروتئین خام
۳۵	الیاف نامحلول در شوینده خنثی
۲۱/۳۶	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی
۱۰/۲۲	خاکستر
۵/۷۳	عصاره اتری

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 (E).

روش تولید گاز

شبه‌سازی محیط شکمبه و تولید گاز در آزمایشگاه به‌روش منک انجام شد (۲۶). مایع شکمبه قبل از تغذیه صبح از دام‌های دارای فیستولای شکمبه‌ای تهیه شد و با پارچه پنبه‌سازی صاف و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در حمام بن‌ماری پس از افزودن گاز دی‌اکسیدکربن، تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شد. بزاق مصنوعی نیز در شرایط آزمایشگاهی و بی‌هوازی به‌روش مکدوگال (۲۳) تولید و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس مایع شکمبه و بزاق مصنوعی با نسبت ۱ به ۲ مخلوط شدند. در این آزمایش ابتدا جیره‌های آزمایشی توسط آسیاب با قطر منافذ ۱ میلی‌متری به‌صورت یکنواخت آسیاب شدند و مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه خوراکی در درون ویال‌های شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری ریخته و تیمارهای آزمایشی حاوی سطوح مختلف آفاتوکسین به‌داخل ویال‌ها افزوده شد. داخل هر ویال، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع

روش تهیه آفاتوکسین

به‌منظور تهیه آفاتوکسین مورد نیاز، یک ویال حاوی سویه استاندارد قارچ *Aspergillus Parasiticus NRLL 2999* تهیه و در محیط آزمایشگاهی درون شیشه‌ای تحت شرایط استریل روی محیط کشت دکستروز آگار حاوی سیب‌زمینی (*potato dextrose agar*) کشت داده شد. سوسپانسیون اسپور قارچی حاوی ۱۰^۶×۶/۵ اسپور قارچی تهیه و مقدار ۲ سی‌سی از آن به داخل فلاسک حاوی محیط کشت افزوده شد. سپس محیط کشت تلقیح شده به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شد. محیط کشت تهیه شده خشک شد، سپس میزان آفاتوکسین B₁ آن به‌روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد. محیط کشت تولیدی حاوی غلظت بالای آفاتوکسین B₁ و آفاتوکسین کل به‌ترتیب به میزان ۲۵۰ و ۴۰۹ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. آفاتوکسین تولیدی در متانول حل و به میزان نیاز به ویال‌ها افزوده شد (۳۲).

(۲۲) برای تعیین شاخص تفکیک پذیری، استفاده شد. شاخص تفکیک پذیری (PF) عبارت است از میلی گرم ماده آلی تجزیه شده بخش بر میلی لیتر گاز تولیدی که طبق رابطه پنج محاسبه شد (۴۱).

رابطه (۵):

$$PF = OMD_e / IVGP = c - (a - b) / IVGP$$

در معادله مذکور: c، ماده آلی وزن شده در هر بطری (میلی گرم)، a مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی گرم)، b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی گرم)، و IVGP گاز تولیدی است.

از رابطه شش و به روش مکار (۲۲) برای محاسبه مقادیر توده میکروبی تولیدی و راندمان ساخت میکروبی استفاده شد (۴۱).

رابطه (۶):

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

که در این رابطه MM، میلی گرم توده میکروبی تولید شده، NG، میلی لیتر گاز خالص تولیدی، K، ضریب استوکیومتری و مقدار آن ۲/۲ می باشد.

اندازه گیری نیتروژن آمونیاکی

به منظور تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی مقدار ۰/۰۵ گرم نمونه یا محلول استاندارد را با ۲/۵ میلی لیتر فنول و ۲ میلی لیتر محلول هیپوکلریت ترکیب و در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه انکوبه کرده و پس از خنک شدن، میزان جذب نمونه ها توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد (۵).

مدل آماری

داده های این آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ (SAS 2002) در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل آماری زیر مورد آنالیز قرار گرفتند.

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

که در این مدل Y_{ij} : نشان دهنده مقدار هر مشاهده، μ : برابر با میانگین کل، T_i : اثر تیمار، e_{ij} : خطای آزمایش می باشد. و برای مقایسات میانگین از آزمون دانکن با سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر مقادیر مختلف آفلاتوکسین (AFB_1) بر میزان کل گاز تولیدی، نرخ تولید گاز و تجزیه پذیری ماده خشک و آلی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج به دست آمده در این آزمایش نشان داد که نرخ تولید گاز، در تیمار ۴۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار شاهد و شاهد همراه با متانول کاهش یافت ولی با افزایش میزان آفلاتوکسین به ۸۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم، نرخ تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد افزایش و در مقایسه با گروه شاهد همراه با متانول تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p < 0.05$). کل گاز تولیدی با افزایش سطوح آفلاتوکسین از ۴۰۰ نانوگرم به ۸۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم کاهش معنی دار یافت که این کاهش در سطوح ۸۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم

شکمه ریخته شد. در زمان های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون، فشار گاز ۴ تکرار از هر تیمار با استفاده از فشارسنج نیمه اتوماتیک اندازه گیری و حجم گاز تولیدی محاسبه شد. برای به دست آوردن حجم خالص گاز، میانگین گاز تولیدی در ویال های حاوی تیمارهای آزمایشی، از ویال های فاقد جیره آزمایشی کم گردید. حجم گاز تولیدی در هر زمان برای یک گرم نمونه جیره غذایی بر اساس وزن اولیه نمونه ها به دست آمد. حجم گاز تولیدی و نرخ تولید گاز با استفاده از برازش رابطه بهینه سازی شده ارسکوف و مک دونالد به دست آمد (۴۰، ۴۱). در رابطه $P = b(1 - e^{-ct})$ ، P حجم گاز تولیدی 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 (۳۵).

جهت برآورد انرژی قابل متابولیسم (ME) از رابطه یک (۲۵) و انرژی خالص شیردهی (NEL) و قابلیت هضم ماده آلی (DOM) از رابطه دو و سه (۲۴) و برای برآورد میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFAs) از رابطه چهار حاصل از تحقیقات (۱۳) استفاده شد.

رابطه (۱):

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

رابطه (۲):

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

رابطه (۳):

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

رابطه (۴):

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

که در این روابط GP: تولید خالص گاز در ۲۴ ساعت (میلی لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، CP: پروتئین خام (بر حسب درصد)، CA: مقدار خاکستر (بر حسب درصد) می باشد.

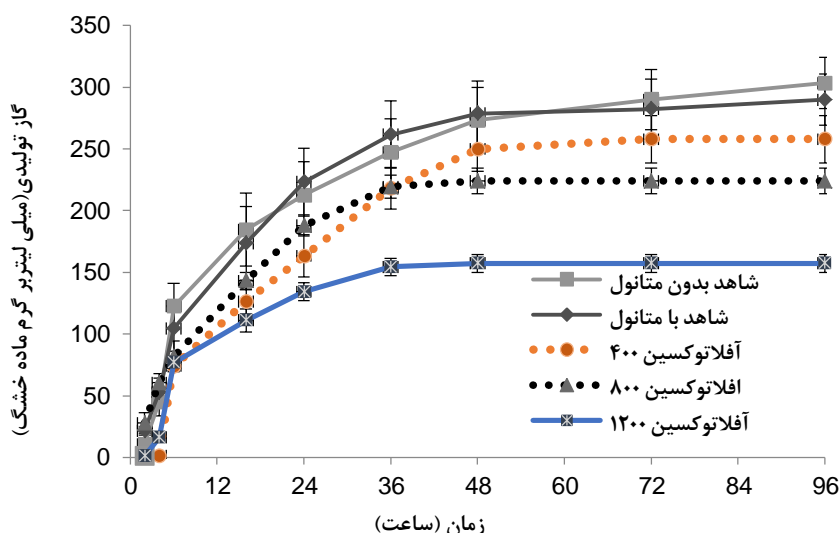
اندازه گیری تجزیه پذیری آزمایشگاهی ماده خشک، ماده آلی و تعیین شاخص تفکیک

در این آزمایش ساعت ۲۴، تولید گاز چهار تکرار از هر تیمار از بن ماری خارج گردید و سریعاً pH آنها توسط pH متر اندازه گیری (Hi 2211-Hanna Instruments – USA) شد و به منظور خروج کامل باکتریایی و به دست آوردن مقادیر ماده خشک تجزیه نشده در هر بطری، محتویات هر بطری سه بار بوسیله شوینده خنثی شسته شد و با استفاده از کاغذ صافی بدون خاکستر صاف و باقی مانده در آن و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. برای اندازه گیری مقادیر خاکستر مواد تجزیه نشده، از کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت استفاده شد (۳۵).

جهت تعیین عامل تفکیک پذیری (Partitioning factor) و توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی از روش ماکار

گاز مجدداً مربوط به تیمار آفلاتوکسین ۱۲۰۰ نانوگرم می‌باشد. از طرفی تجزیه‌پذیری ماده آلی نیز با افزایش سطوح آفلاتوکسین، کاهش یافت، به‌طوری که مقدار آن از ۷۴/۹۶ درصد در تیمار شاهد به ۳۱/۸۹ درصد در تیمار ۱۲۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین رسید ($p < 0.05$). تحقیقات محققان بر روی تأثیر سطوح آفلاتوکسین بر هضم علوفه یونجه نشان دهنده کاهش معنی‌دار در تولید گاز و تخمیر شکمبه‌ای است، که این کاهش را به تغییر در الگوی جمعیت باکتریایی شکمبه و کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها در اثر سطوح افزایشی آفلاتوکسین نسبت داده‌اند که به‌طور مستقیم بر تخمیر شکمبه‌ای و تولید اسیدهای چرب فرار تأثیرگذار خواهد بود. به‌طوری که این محققین نیز کاهش در میزان اسیدهای چرب فرار را گزارش کردند (۲۱). تحقیقات مشابه نیز نشان‌دهنده کاهش هضم سلولز تحت تأثیر آفلاتوکسین در جیره (۳۹، ۱۲) و کاهش قابلیت هضم ماده خشک با سطوح افزایشی آفلاتوکسین در جیره است (۲).

نسبت به تیمارهای فاقد آفلاتوکسین معنی‌دار بود، به‌گونه‌ای که از ۲۵۹/۰۵ میلی‌لیتر در تیمار شاهد به ۱۶۱/۴۷ میلی‌لیتر در گرم ماده خشک در تیمار ۱۲۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین کاهش یافت ($p < 0.05$). اسدزاده و همکاران نشان دادند که استفاده از آفلاتوکسین سبب کاهش فراسنجه‌های تخمیری در شرایط آزمایشگاهی شد که با نتایج این آزمایش موافق می‌باشد (۳). همچنین محققان دیگری دریافتند که با افزایش آفلاتوکسین B₁ میزان گاز تولیدی کاسته می‌شود (۲۸). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شد در گاز تولیدی بین تمامی تیمارها در ساعات اولیه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ولی با افزایش ساعات انکوباسیون از ۱۲ ساعت به بعد، تفاوت در گاز تولیدی ایجاد شد. به‌گونه‌ای که در ساعت ۳۶ انکوباسیون، بیشترین تولید گاز مربوط به تیمارهای شاهد و کمترین میزان تولید گاز مجدداً مربوط به تیمار آفلاتوکسین ۱۲۰۰ نانوگرم می‌باشد. در ساعت ۹۶ انکوباسیون نیز بیشترین میزان تولید گاز مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان تولید



شکل ۱- منحنی تولید گاز در جیره غذایی آلوده با سطوح متفاوت آفلاتوکسین B₁
Figure 1. Gas production curve in diets contaminated with different level of Aflatoxin B₁

۱۲۰۰ نانوگرم کاهش می‌یابد. در یک پژوهشی گزارش شد که آفلاتوکسین موجب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و حرکات شکمبه می‌شود (۳۹) به‌طوری‌که با افزودن ۹۶۰ نانوگرم آفلاتوکسین B₁ به جیره غذایی حاوی مخلوط علوفه چاودار و دانه ذرت (به نسبت ۴ به ۱) و مخلوط یونجه و دانه ذرت سبب کاهش کل اسیدهای چرب فرار در شرایط آزمایشگاهی شد. همچنین میزان تولید اسید چرب در جیره حاوی علوفه چاودار بیشتر از یونجه بود (۲۱). هر چند در دیگر تحقیقات غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه بره‌های در حال رشد تغذیه شده با ۲/۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B₁ در کیلوگرم (۱۰) و گوساله‌های نر تغذیه شده با ۶۰-۶۰۰ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B₁ تأثیری بر تولید اسیدهای چرب فرار نداشت (۱۵). غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش سطوح

اثر آفلاتوکسین B₁ بر فراسنجه‌های تخمیری، ازت آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار
غلظت اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی از جمله شاخص‌های مهم برای ارزیابی کارکرد تخمیری شکمبه و تأثیر تیمارهای غذایی بر آن تلقی می‌شود (۱۴). مطابق جدول ۳، با افزودن سطوح مختلف آفلاتوکسین میزان انرژی متابولیکی و انرژی خالص شیر کاهش پیدا کرد. میزان انرژی متابولیکی در بین گروه‌های آفلاتوکسین ۸۰۰ و ۴۰۰ نانوگرم تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. ولی میزان آن در گروه آفلاتوکسین ۱۲۰۰ معنی‌دار و افزایش یافت ($p < 0.05$). بر اساس داده‌های جدول ۳ اسیدهای چرب فرار با افزایش سطوح آفلاتوکسین سیر نزولی به‌خود می‌گیرد، به‌گونه‌ای که از ۱/۰۴۴ در تیمار شاهد به ۰/۶۵۸ در تیمار آفلاتوکسین

کل گاز تولیدی، کاهش قابلیت هضم خوراک و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و افزایش نیتروژن آمونیاکی گردید، که این نتایج می‌تواند بیانگر اثرات منفی و ممانعت‌کنندگی فلاتوکسین B₁ بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد.

عامل تفکیک‌پذیری (PF)، توده میکروبی تولیدی و راندمان ساخت آن: مطابق داده‌های جدول ۴ عامل تفکیک‌پذیری در بین تیمارهای شاهد، شاهد همراه با متانول و فلاتوکسین ۴۰۰ نانوگرم اختلاف معنی‌داری نداشت. ولی با افزایش سطح فلاتوکسین از ۴۰۰ به ۱۲۰۰ نانوگرم، میزان آن کاهش یافت ($p < 0.05$). مقدار عامل تفکیک‌پذیری در تیمار شاهد، ۳/۴۹ و در تیمار فلاتوکسین ۱۲۰۰ نانوگرم، ۲/۲۲ بود. افزایش شاخص تفکیک‌پذیری، نشان‌دهنده استفاده بیشتر میکروارگانیسم‌های شکمبه از نیتروژن آمونیاکی و تولید پروتئین میکروبی می‌باشد. توده میکروبی تولیدی و راندمان آن نیز همانند عامل تفکیک‌پذیری سیر نزولی داشت به‌گونه‌ای که توده میکروبی تولیدی در تیمار شاهد ۵۰/۸۲ بوده و در تیمار فلاتوکسین ۱۲۰۰ نانوگرم به میزان ۳/۱۷ کاهش پیدا کرد، همچنین میزان راندمان سنتز میکروبی برای تیمارهای شاهد و فلاتوکسین ۱۲۰۰ نانوگرم، به‌ترتیب برابر ۲۷/۴۷ و ۱/۷۱ بود. افزودن فلاتوکسین به محیط شبیه‌ساز شکمبه‌ای سبب کاهش عامل تفکیک‌پذیری شد فلاتوکسین احتمالاً با کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه در استفاده از نیتروژن برای تولید پروتئین میکروبی شده و در نتیجه سبب کاهش شاخص تفکیک‌پذیری و افزایش نیتروژن آمونیاکی شده است

فلاتوکسین افزایش یافت. به‌گونه‌ای که نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای شاهد، شاهد همراه با متانول، سطوح فلاتوکسین ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم به‌ترتیب برابر با ۱۹/۰۲، ۲۰/۷۲، ۲۰/۵۳، ۲۳/۵۷ و ۲۵/۵۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌دست آمد. مشابه با نتایج آزمایش حاضر غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکبه گاوهای تغذیه شده با فلاتوکسین B₁ افزایش یافت (۴۲)، بر خلاف این نتایج میزان نیتروژن آمونیاکی، تجزیه سلولز و تولید اسیدهای چرب فرار با تغذیه ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنی فلاتوکسین B₁ به گوساله‌های نر و در شرایط فلاتوکسیکوز حاد گاوی، کاهش یافت (۷). پروتئین مواد خوراکی در شکمبه معمولاً توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه و آمین‌زدایی شده و سبب تولید پپتید و اسیدهای آمینه می‌شود (۳۷). اگر تجزیه و یا متابولیسم پروتئین جیره توسط فلاتوکسین مهار شود غلظت آمونیاک آزاد، ممکن است تغییر پیدا کند. مقدار نیتروژن آمونیاکی آزاد شکمبه حاصل تعادل تجزیه پروتئین و استفاده از آن است (۳۷) بالا بودن میزان نیتروژن آمونیاکی در آزمایش حاضر بیانگر اثر منفی فلاتوکسین بر استفاده میکروارگانیسم‌ها از آن و تبدیل به پروتئین میکروبی می‌باشد. به‌طوریکه کاهش تولید پروتئین میکروبی و راندمان تولید پروتئین میکروبی مطابق داده‌های جدول ۴ موید این موضوع می‌باشد. همچنین فلاتوکسین B₁ احتمالاً با تأثیر منفی بر جمعیت میکروبی مایع شکمبه (۲۰) و کاهش تحرک شکمبه (۷) سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک و گاز تولیدی (۲۱) می‌گردد. بنابراین فلاتوکسین باعث افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی و کاهش تولید پروتئین میکروبی می‌شود. به‌طور کلی در این آزمایش، افزودن فلاتوکسین B₁ موجب کاهش

جدول ۲- کل گاز تولیدی و نرخ تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی در تیمارهای آزمایشی در شرایط آزمایشگاهی
Table 2. Total gas production and gas production rate, DMD and OMD in experimental treatments *in vitro*

موارد	شاهد بدون متانول	شاهد با متانول	تیمارهای آزمایشی ^۱				خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
			فلاتوکسین ۴۰۰	فلاتوکسین ۸۰۰	فلاتوکسین ۱۲۰۰			
نرخ تولید گاز	۰/۰۵۷ ^b	۰/۰۵۹ ^{ab}	۰/۰۳۹ ^c	۰/۰۷۰ ^a	۰/۰۷۱ ^a		۰/۰۰۳۸	<۰/۰۰۱
کل گاز تولیدی (میلی‌لیتر بر گرم خوراک)	۲۹۵/۰۵ ^a	۳۹۴/۳۸ ^a	۲۷۵/۰۸ ^a	۲۲۸/۴۸ ^b	۱۶۱/۴۷ ^c		۱۳/۴۶	<۰/۰۰۱
تجزیه‌پذیری ماده آلی (%)	۷۴/۹۶ ^a	۷۱/۸۹ ^a	۶۹/۰۱ ^a	۴۴/۸۷ ^b	۳۱/۸۹ ^c		۲/۵۱	<۰/۰۰۱
تجزیه‌پذیری ماده خشک (%)	۵۸/۸۴ ^a	۵۵/۵۰ ^a	۵۲/۸۳ ^a	۳۹/۱۷ ^b	۱۴/۱۷ ^c		۲/۶۰	<۰/۰۰۱

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

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین در جیره غذایی بر فراسنجه‌های تخمیری جیره غذایی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گوسفند

Table 3. Effect of different levels of aflatoxin on fermentation parameters of diet using mixed ruminal microorganisms of sheep

مورد	شاهد بدون متانول	شاهد با متانول	تیمارهای آزمایشی ^۱			خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
			آفلاتوکسین ۴۰۰	آفلاتوکسین ۸۰۰	آفلاتوکسین ۱۲۰۰		
انرژی متابولیکی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)	۹/۱۵ ^a	۸/۶۷ ^a	۶/۹۵ ^{bc}	۷/۷۸ ^b	۵/۹۳ ^c	۰/۵۱	۰/۰۰۱
انرژی خالص شیردهی (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)	۵/۱۹ ^a	۵/۴۷ ^a	۳/۹۴ ^{bc}	۴/۵۴ ^b	۳/۱۹ ^c	۰/۳۷	۰/۰۰۱
ماده آلی قابل هضم (درصد)	۵۷/۲۶ ^a	۵۹/۶۵ ^a	۴۶/۳۶ ^b	۵۱/۶۴ ^b	۳۹/۹۰ ^c	۳/۲۳	۰/۰۰۱
اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول)	۱/۰۴۴ ^a	۱/۰۹ ^a	۰/۸۰ ^b	۰/۹۲ ^b	۰/۶۵۸ ^c	۰/۰۷	۰/۰۰۱
نیترژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۹/۰۲ ^b	۲۰/۷۲ ^b	۲۰/۵۳ ^b	۲۳/۵۷ ^a	۲۵/۵۸ ^a	۰/۹۰	۰/۰۰۳

^۱ تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین در جیره غذایی بر عامل تفکیک‌پذیری و توده میکروبی تولیدی میکروارگانیسم‌های شکمبه گوسفند در شرایط آزمایشگاهی

Table 4. Effect of different levels of aflatoxin in the diet on partitioning factor and microbial mass of ruminal microorganisms of sheep *in vitro*

مورد	شاهد بدون متانول	شاهد با متانول	تیمارهای آزمایشی ^۱			خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
			آفلاتوکسین ۴۰۰	آفلاتوکسین ۸۰۰	آفلاتوکسین ۱۲۰۰		
عامل تفکیک‌پذیری (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده بر میلی‌لیتر گاز)	۳/۴۹ ^a	۳/۲۸ ^a	۳/۵۳ ^a	۲/۳۱ ^b	۲/۲۲ ^b	۰/۲۸	۰/۰۲
توده میکروبی (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)	۵۰/۸۲ ^a	۵۰/۳۵ ^a	۴۲/۲۳ ^a	۴/۷۷ ^c	۳/۱۷ ^c	۵/۱۸	<۰/۰۰۱
راندمان تولید میکروبی (درصد)	۲۷/۴۷ ^a	۲۷/۲۳ ^a	۲۲/۸۳ ^b	۳/۳۱ ^c	۱/۷۳ ^c	۲/۸۰	<۰/۰۰۱

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

آفلاتوکسین کاهش پیدا کرد. در کل می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آفلاتوکسین اثر سوئی بر روند تخمیر میکروبی در شرایط آزمایشگاهی داشت و در صورت آلودگی جیره غذایی با سطوح بالای آفلاتوکسین استفاده از جاذب‌های آفلاتوکسین ضروری است.

افزودن آفلاتوکسین B1 در غلظت‌های مختلف سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی نسبت به سایر تیمارها شد. با توجه به اینکه پارامترهای تخمینی از روی میزان تولید گاز برآورد شد، انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی و اسیدهای چرب فرار با افزایش سطح

منابع

- Assadzadeh, S., A. Tahmasbi, A. Naserian and V.R. 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: 413-423.
- Besharati, M., N. Shafipour, E. Abdi and Z. Nemati. 2017. Effects of supplementation alfalfa silage with molasses, orange pulp and Lactobacillus buchneri on *in vitro* dry matter digestibility and gas production. Advances in Food Technology and Nutrition Science, 6: 43-47.
- 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.
- Cano-Sancho, G., V. Sanchis, S. Marín and A. Ramos. 2013. Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). Food and Chemical Toxicology, 51: 188-193.
- Cook, W., J. Richard, G. Osweiler and D. Trampel. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of anatoxins B₁ and M₁. American journal of veterinary research, 47: 1817.
- Dan, A., C. Zhou, Y. Zhang, Z. Jia and S. Yin. 2013. Determination of the content of fungal toxin of different feed raw materials in Northeast region. China. Journal of Northeast Agricultural University.
- Deng, Y., L. Liu, A. Luisa Barrientos Velázquez and J.B. Dixon. 2012. The determinative role of the exchange cation and layer-charge density of smectite on aflatoxin adsorption. Clays and Clay Minerals, 60: 374-386.
- Edrington, T. 1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. pp: 1274-1281, En: Journal of Animal Science, Vol. 72, No. 5 (May 1994).

9. Ertas, N., Z. Gonulalan, Y. Yildirim and F. Karadal. 2011. A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control*, 22: 1956-1959.
10. Fehr, P. and J. Delage. 1970. Effet de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. *Acad Sci Compt Rend Ser D*.
11. Getachew, G., E. DePeters and P. Robinson. 2004. In vitro gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *California Agriculture*, 58: 54-58.
12. Hall, M., T. Nennich, P. Doane and G.J. 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.
13. 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.
14. Huang, G., X. Li, Y. Yang, K. Lin He, Y. Lao. 2013. Analysis of the contamination of mold and toxin in feed during the second half of 2012. *Swine Prod* 2: 23-24 (In Chinese).
15. ARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *World Health Organization*, 82: 1-556.
16. Ismail, A., M. Riaz, S. Akhtar, S. Yoo, S. Park, M. Abid, M. Aziz and Z. Ahmad. 2017. Seasonal variation of aflatoxin B1 content in dairy feed. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26: 33-37.
17. Ismail, A., M. Riaz, R.E. Levin, S. Akhtar, Y.Y. Gong and A. Hameed. 2016. Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan. *Food Control*, 60: 461-465.
18. Jiang, Y.H., P. Wang, H.J. Yang and Y. Chen. 2014. The efficacy of bamboo charcoal in comparison with smectite to reduce the detrimental effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen fermentation of a hay-rich feed mixture. *Toxins*, 6: 2008-2023.
19. Jiang, Y., H. Yang and P. Lund. 2012. Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Animal feed science and technology*, 175: 85-89.
20. 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. pp: 107-144. Springer.
21. McDougall, E. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43: 99.
22. Menke, K., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. g. 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.
23. Menke, K. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro.
24. 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.
25. Mertens, D. 1979. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In: *Proc. interactions of mycotoxins in animal production symposium*, July, pp: 118-136.
26. Mojtahedi, M., M.D. Mesgaran and S.A. Vakili. 2013. Effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen microbial fermentation responses using batch culture. *Annual Research & Review*. 686-693.
27. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, H. MalekinejadNejad 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. In: *Animal Production Research*, pp: 56-60.
28. Nemati, Z., H. Janmohammadi, A. Taghizadeh, H.M. Nejad, G. Mogaddam and M. Arzanlou. 2014. Occurrence of Aflatoxins in poultry feed and feed ingredients from northwestern Iran. *European Journal of Zoological Research*, 3: 56-60.
29. Nemati, Z., A. Karimi and M. Besharati. 2015. Effects of aflatoxin B1 and yeast cell wall supplementation on the growth performance of broilers. *International Conference on Innovations in Chemical and Agricultural Engineering*, 10-11.
30. 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 & Agricultural Engineering*. pp: 8-9.
31. Oguz, H. 2011. A review from experimental trials on detoxification of aflatoxin in poultry feed. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 27: 1-12.
32. Oliveira, C., J. Cruz, R. Rosim, K. Bordin and A. Kindermann. 2016. Simultaneous occurrence of aflatoxins and fumonisins in corn intended for the pet feed industry and for human consumption. *J Food Chem Nanotechnol*, 2: 1-5.
33. 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.
34. Pettersson, H. and K. Kiessling. 1976. Effect of aflatoxin, ochratoxin and sterigmatocystin on microorganisms from sheep rumen. *Swedish Journal of Agricultural Research*.

35. Reynal, S., I. Ipharraguerre, M. Lineiro, A. Brito, G. Broderick and J.J.J.O.D.S. Clark. 2007. Omasal flow of soluble proteins, peptides, and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradabilities. 90: 1887-1903.
36. Sadia, A., M.A. Jabbar, Y. Deng, E.A. Hussain, S. Riffat, S. Naveed and M. Arif. 2012. A survey of aflatoxin M1 in milk and sweets of Punjab, Pakistan. Food Control, 26: 235-240.
37. 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 and Agriculture, 77: 1-17.
38. Taghizadeh, A., Z. Nemati, H. Jan Mohamadi and P.N. 2008. The determination of fermentation characteristics of treated and untreated barley grain using gas production technique. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6: 1395-1397.
39. 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.
40. Wang, Q., Y. Zhang, N. Zheng, L. Guo, X. Song, S. Zhao and J.J.T. Wang. 2019. Biological System Responses of Dairy Cows to Aflatoxin B1 Exposure Revealed with Metabolomic Changes in Multiple Biofluids. 11: 77.
41. 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.

Effect of Aflatoxin B1 on *In Vitro* Digestibility and Ruminal Fermentation of Sheep Diet

Zabihollah Nemati¹, Rashid Safari², Namdar Kamrani³, Maghsoud Besharati² and Mohammadreza Sheikhlou²

1- Associate Professor University of Tabriz, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources Department of Animal Science (Corresponding author: znnemati@yahoo.com)

2 and 3- Assistant Professor and M.Sc. Student, University of Tabriz, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources Department of Animal Science

Received: October 20, 2019

Accepted: February 1, 2020

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of different levels of aflatoxin on the gas production, *in vitro* fermentation parameters, dry matter and organic matter digestibility of sheep's diet. This experiment was conducted in a completely randomized design with 5 treatments and 4 replicate per treatment. The treatments included 1.diet without aflatoxin and methanol (control), 2.control with methanol, 3.diet containing 400 ng / ml of aflatoxin B₁, 4.diet containing 800 ng / ml of aflatoxin B₁, and 5.diet containing 1200 ng / ml of aflatoxin B₁ in ruminal fluid. Treatments were incubated at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 hours and the amount of gas produced was measured using a barometer at 39 °C. The results showed that treatments with high levels of aflatoxin, especially 1200 ng / ml rumen fluid, significantly decreased gas production compared to those without aflatoxin. Addition of different levels of aflatoxin significantly decreased dry matter and organic matter digestibility, microbial mass production, and biodegradability index compared to control group. The results of this study showed that rumen microorganisms have the ability to neutralize aflatoxin at low levels and fermentation conditions are not significantly affected. With increasing level of aflatoxin in the diet, the gas production, digestibility of dry matter and organic matter, and also microbial mass production and PF was reduced. Therefore, it can be concluded that aflatoxin modifies ruminal fermentation processes with reduced nutrient degradability, which is dependent on aflatoxin concentration.

Keywords: Aflatoxin, Gas production, Digestibility of dry matter and organic matter