تاثیر مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی

محسن مجتهدی[۱،۲،*]، محسن دانش مسگران [۲] و سیدعلیرضا وکیلی [۲]

۱. گروه علوم دامی دانشگاه بیرجند و۲. گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

* mojtahedi@birjand.ac.i

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 (AFB1) بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون تنی بود. انکوباسیون آزمایشگاهی و اندازه گیری تولید گاز به روش کشت ثابت و با استفاده از شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری مخصوص و فشارسنج اندازه گیری گردید. تیمارهای آزمایشی سطوح مختلف AFB1 شامل صفر، ۳۰۰، ٦۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت بودند. شیشه‌های کشت تحت انکوباسیون قرار گرفتند و تولید گاز در زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون اندازه‌گیری شد و pH محیط کشت، نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار محیط کشت و همچنین قابلیت‌هضم ماده خشک به روش برون‌تنی تعیین شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که افزودن سطوح مختلف AFB1 به محیط کشت، موجب کاهش معنی‌دار نرخ تولید گاز و پتانسیل تولید گاز شد (P<۰/۰۵). همچنین قابلیت‌هضم ماده خشک و غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) با افزایش غلظت AFB1 کاهش یافت. غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش مقدار AFB1 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، اما نسبت مولی اسیدهای چرب فرار شامل استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات و ایزووالرات تحت‌تاثیر مقدار AFB1 قرار نگرفتند. بطورکلی نتایج این آزمایش می‌تواند بیانگر اثرات منفی و ممانعت کنندگی AFB1 بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B1- تخمیر شکمبه- شرایط برون تنی

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات بسیار سمی از دسته مایکوتوکسین‌ها (متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها) هستند که عمدتا بوسیله آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند و دارای اثرات سمی، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی می‌باشند. آفلاتوکسین B1 (AFB1) بخش عمده آفلاتوکسین‌ها را تشکیل داده و به‌عنوان قوی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی شناخته می‌شود(۷). در نشخوارکنندگان (به‌ویژه گاوهای شیرده) تغذیه شده با خوراک آلوده به AFB1 مشکلات سلامتی از قبیل سرطان کبد، تضعیف سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های تولیدمثلی، ناقص‌الخلقه‌زایی، کاهش مصرف خوراک و تولید شیر بروز می‌کند (۹). ازطرف دیگر ازآنجا که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند اثرات ضد میکروبی (تخریب میکروب و یا ممانعت و کاهش رشد آن‌ها) داشته باشند، ممکن است باعث تداخل در عمل شکمبه و ایجاد مشکلاتی در نشخوارکنندگان گردند که در دیگر حیوانات رخ نمی دهد. آفلاتوکسین ها می توانند موجب تغییر جمعیت های میکروبی شکمبه، تغییر نسبت های محصولات نهایی هضم و مختل شدن شکمبه گردیده و درنتیجه هضم، مصرف خوراک و درنهایت تولید را مختل نمایند (۸). فِهِر و دِلاگ (٤) مشاهده کردند که مقادیر آفلاتوکسین بالاتر از ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در سیستم شکمبه مصنوعی باعث کاهش هضم سلولز، کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش تولید آمونیاک شد. همچنین نسبت اسیدهای چرب فرار تغییر کرد، بگونه ای که استات کاهش و پروپیونات و بوتیرات افزایش یافتند. اما نسبت والرات

تغییری نکرد. با این وجود پِترسون و کِسلینگ (۱۰) تفاوتی در ناپدید شدن ماده خشک علوفه هنگامی که ۰/۲ و ۱/٤ میکروگرم آفلاتوکسین به ازای میلی‌لیتر مایع کشت اضافه شد را مشاهده نکردند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۱) انجام شد. تولید گاز با استفاده از شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری مخصوص و فشارسنج اندازه گیری گردید. ویال حاوی AFB1 خالص (سیگما-آلدریچ) با استفاده از متانول و آب مقطر رقیق شد. خوراک پایه آزمایشی شامل مخلوطی از ۸۰ درصد علف خشک یونجه (حاوی ۱٦٪ پروتئین خام) و ۲۰ درصد دانه جو بود. ۵۰۰ میلی‌گرم از خوراک پایه داخل شیشه‌ها ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۲:۱) اضافه شد. سپس محلول رقیق شده AFB1 به محیط کشت افزوده شد تا غلظت‌های ۳۰۰، ٦۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم AFB1 در میلی‌لیتر محیط کشت، بدست آید. سپس شیشه‌ها تحت انکوباسیون قرار گرفتند و تولید گاز در زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون اندازه‌گیری شد. pH محیط کشت، نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار محیط کشت و همچنین قابلیت‌هضم ماده خشک به روش برون‌تنی، پس از گذشت ۲٤ ساعت انکوباسیون ثبت و یا نمونه گیری شدند. برای محاسبه قابلیت‌هضم ماده خشک محتویات شیشه‌ها به فالکون‌های ۵۰ منتقل شد و فالکون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت هر فالکون به آرامی تخلیه شده و پلت باقیمانده در کف، در دمای ٦۰ درجه سانتیگراد و به مدت ٤۸ ساعت خشک گردید تا مقدار ماده خشک باقیمانده تعیین گردد. غلظت نیتروژن آمونیاکی در نمونه ها بر اساس روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد. اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (PHILIPS- PU4410) آنالیز شدند. از مدل نمایی با فاز تأخیر برای برازش داده‌های تولید گاز با به کارگیری روش مقایسات گوسن- نیوتن در رویه NLIN نرم افزار آماری SAS (۱۱) به شیوه رگرسیون غیر خطی استفاده گردید. سپس فراسنجه‌های تولید گاز و سایر نتایج (غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار و قابلیت‌هضم ماده خشک) با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (۱۱) و طرح کاملاً تصادفی به‌صورت زیر مورد تجزیه آماری قرار گرفت. میانگین مشاهدات توسط Lsmeans در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تاثیر مقادیر افزایشی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت اسیدهای چرب فرار و قابلیت‌هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 به محیط کشت، نرخ تولید گاز و پتانسیل تولید گاز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، به‌طوری که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز از ۰/۱۳٤ به ۰/۰۹۲ میلی لیتر در ساعت و پتانسیل تولید گاز از ۱٦۰/۷ میلی لیتر به ۱۳۱/۳ کاهش یافت، ولی تفاوت معنی‌داری بین مقادیر صفر و ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. علاوه بر این فاز تاخیر تولید گاز به‌طور معنی‌داری با افزایش AFB1، افزایش یافت (P<۰/۰۵) و از ۰/۰۷ ساعت در مقدار صفر AFB1 به ۱/۳۹ ساعت در بالاترین مقدار تزریق AFB1 افزایش یافت. مشابه با نتایج بدست آمده در این آزمایش، جیانگ و همکاران (٦) و همچنین هِلفریچ و همکاران (۵) گزارش کردند که فراسنجه‌های تولید گاز با افزودن AFB1 کاهش یافت و این ممانعت از تولید گاز بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه تحت‌تاثیر AFB1 می‌باشد. افزودن AFB1 به محیط کشت تاثیری بر pH آن نداشت، ولی قابلیت‌هضم ماده خشک به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) با افزایش غلظت AFB1 کاهش یافت (جدول ۱). قابلیت‌هضم ماده خشک در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت از ۰/۵۹۳ در تیمار فاقد AFB1 به ۰/۵۵٤ در تیمار حاوی ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 رسید ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی صفر و ۳۰۰ و همچنین بین تیمارهای حاوی ٦۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. نتایج گزارش شده در مورد تاثیر AFB1 بر

قابلیت‌هضم ماده خشک متناقض است. نتایج این آزمایش یافته‌های فِهِر و دِلاگ (٤) و اسکودامور و لایوزی (۱۲) را تایید می کند که گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش هضم سلولز شد. از طرف دیگر جیانگ و همکاران (٦) و پِترسون و کِسلینگ (۱۰) گزارش کردند که افزودن AFB1 بر قابلیت‌هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی، تاثیری نداشت. در آزمایش حاضر کاهش مشاهده شده در قابلیت‌هضم ماده خشک در اثر افزودنAFB1 می‌تواند درنتیجه‌ی اختلال در فعالیت میکروارگانیسم های شکمبه از طریق کاهش هضم فیبر و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار باشد (٤ و ٥).

نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافت. همچنین غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش مقدار AFB1 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، اما نسبت مولی اسیدهای چرب فرار شامل استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات و ایزووالرات تحت‌تاثیر مقدار AFB1 قرار نگرفتند (P>۰/۰۵) که با نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی، تاحدی متناقض است. ادرینگتون و همکاران (۳) تفاوتی در غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه بره‌های در حال رشد تغذیه شده با ۲/۵ میلی‌گرم AFB1 در کیلوگرم جیره مشاهده نکردند. هِلفریچ و همکاران (٥) نیز گزارش کردند که افزودن ٦۰۰-٦۰ میکروگرم در کیلوگرم AFB1 به جیره گوساله های نر، تاثیری بر تولیدی اسیدهای چرب فرار نداشت. در مقابل، هضم سلولز، تولید اسیدهای چرب فرار، غلظت نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پروتئین ها با تغذیه ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنی AFB1 به گوساله‌های نر و در شرایط آفلاتوکسیکوز حاد گاوی، کاهش یافت (۲). اسکودامور و لایوزی (۱۲) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و حرکات شکمبه می‌گردد.

به‌طورکلی در این آزمایش افزودنAFB1 موجب کاهش تولید گاز (نرخ و کل تولید گاز)، کاهش قابلیت‌هضم خوراک و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی گردید که این نتایج می‌تواند بیانگر اثرات منفی و ممانعت کنندگیAFB1 بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد.

جدول ۱. تاثیر مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

فراسنجه	مقدار آفلاتوکسین B1 در محلول کشت (نانوگرم در میلی‌لیتر)				SEM	P
	صفر	۳۰۰	٦۰۰	۹۰۰		
فراسنجه‌های تولید گاز در مدل						
نرخ تولید گاز	۰/۱۳٤ a	۰/۱۲۱ b	۰/۱۰۷ c	۰/۰۹۲ d	۰/۰۰۵	۰/۰۳۱
تولید گاز (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)	۱٦۰/۷ a	۱٥٤/۱ a	۱٤۲/۰ b	۱۳۱/۳ c	٤/۱	۰/۰۱۲
فاز تأخیر (ساعت)	۰/۰۷ c	۰/٦٤ b	۱/۰۳ a	۱/۳۹ a	۰/۲۷	۰/۰۱۹
فراسنجه‌های تخمیر و هضم شکمبه ای (در ۲٤ ساعت)						
pH	٦/٦۳	٦/٥۸	٦/٦۱	٦/٥٤	۰/۰۹	۰/٤۳
قابلیت‌هضم ماده خشک	۰/٥۹۳ a	۰/٥۸٤ a	۰/٥٦۰ b	۰/٥٥٤ b	۰/۰۱۱	۰/۰۲۳
غلظت نیتروژن آمونیاکی	۱۷/۸ a	۱٦/۹ b	۱٥/۲ c	۱٥/۳ c	۰/۳٤	۰/۰٤
کل اسیدهای چرب فرار (میلی مول)	۸۳/٦ a	۷۷/۲ b	۷۱/۷ c	٦۰/۸ d	۲/۱	۰/۰۱٤
درصد مولی اسیدهای چرب فرار						
استات	٦۷/٥	٦۸/۱	٦۷/٤	٦۷/۸	۰/٥۲	۰/۱۷
پروپیونات	۱۸/۸	۱۸/۱	۱۹/۰	۱۸/٤	۰/٤	۰/۱۱
بوتیرات	۹/٦	۹/۷	۹/۳	۹/٦	۰/۳٦	۰/۳۷

والرات	۲/٤٤	۲/٥۱	۲/٥۹	۲/٤۷	۰/۰۸۱	۰/۱٦
ایزووالرات	۱/٦٦	۱/٥۸	۱/۷۱	۱/۷۲	۰/۰۷۷	۰/۱۳

* تیمارهای آزمایشی بر اساس افزودن مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 شامل مقادیر اولیه‌ی صفر، ۳۰۰، ٦۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، تنظیم شدند. * در هر ردیف بین اعداد با حروف متفاوت، اختلاف معنی داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

منابع

1. Arroquy, J.I., Cochran, R.C., Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., and Johnson, D.E. 2005. Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. Animal Feed Science and Technology, 120: 93–106.
2. Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiller, G.D., Trampel, D.W. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. American Journal of Veterinary Research, 47: 1817–1825.
3. Edrington, T.S., Harvey, R.B., Kubena, L.F.1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. Journal of Animal Science, 72: 1274-1281.
4. Fehr, P.M., Delage, J. 1970. Effect de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. C.R. Acad Sci Paris (Series D), 270: 550-553.
5. Helferich, W.G., Garrett, W.N., Hsieh. D.P.H., Baldwin, R.L. 1986b. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. Journal of Animal Science, 62:691-696.
6. Jiang, Y.H., Yang, H.J., Lund, P. 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.
7. McLean, M., and Dutton, M.F. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. Pharmacology & Therapeutics, 65:163–192.
8. Mertens, D.R. 1979. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In Proc. Syrup. Interaction of Mycotoxins in Anim. Production. National Academy Science, Washington, DC.
9. Morgavi, DP., Boudra, H., and Jouany, J.P. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. In: Oswald IP, Taranu I, editors. Mycotoxins in Farm Animals. Transword Research Network, Kerala, India.
10. Pettersson, H., and Kiessling, K.H. 1976. Effect of aflatoxin B1, ochratoxin and sterigmatocystin on microorganisms from sheep rumen. Swedden Journal of Agriculture Research, 6: 161.
11. SAS (Statistical Analysis System). 2010. User's Guide: Statistics, Version 9.3 SAS Inst. Carry, NC, USA.
12. Scudamore, K.A., and Livesey, C.T. 1998. Occurrence and Significance of Mycotoxins in Forage Crops and Silage: a Review. Journal of Science and Food Agriculture, 77: 1-17.

Effects of Different Levels of Aflatoxin B1 on In Vitro Gas Production, Ruminal Fermentation and Digestibility

M. Mojtahedi[1, 2]*, M. Danesh-Mesgaran[2] and S. A. Vakili[2]

1. Department of Animal Science, University of Birjand. 2. Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad

* mojtahedi@birjand.ac.ir

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of different levels of AFB1 (0.0, 300, 600 and 900 ng/ml) on in vitro rumen fermentation and gas production parameters. In vitro incubation was performed with batch culture method in 120 ml bottles and gas production volume were recorded at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48 and 72 h incubation time. The pH, ammonia-N concentration, in vitro dry matter digestibility (IVDMD) and VFA production were determined after 24 h incubation. There results of this study showed that the addition of AFB1 affected in vitro fermentation characteristic, significantly, as represented in reduced gas production, in vitro dry matter digestibility (IVDMD), VFA production and ammonia-N concentrations. The lowest and the highest IVDMD values were observed in treatments with 900 and 0 ng/ml AFB1, respectively. Results of present study indicated that addition of different levels of AFB1 affected in vitro fermentation characteristic negatively, as represented in reduced gas production, dry matter digestibility and ammonia-N concentrations. Therefore it is necessary to control and manage aflatoxin contaminations in ruminants.

KEYWORDS: Aflatoxin B1- Ruminal fermentation- In Vitro