بررسی اثرات افزودن لاکتوباسیلوس ال بوچنری به جیره غذایی گاو شیری آلوده به آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی

- **ذبیح‌اله نعمتی***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تبریز، اهر، ایران
- **مقصود بشارتی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تبریز، اهر، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

آفلاتوکسین B1 توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس تولید و میزان حرکات شکمبه و تجزیه‌پذیری مواد خوراکی در آن تحت تاثیر قرار می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی کاهش اثرات سوء آفلاتوکسین B1 بر تخمیر شکمبه‌ای در حضور افزودنی لاکتوباسیلوس ال‌بوچنری در شرایط آزمایشگاهی بود. تیمارهای آزمایشی شامل: جیره پایه (شاهد)، جیره پایه همراه با ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفلاتوکسین B1 و جیره غذایی پایه آلوده با آفلاتوکسین B1 (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌همراه سطوح مختلف افزودنی لاکتوباسیلوس ال‌بوچنری به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم در کیلوگرم جیره غذایی بودند. میزان گاز تولیدی در ٤، ٦، ٨، ١٢، ٢٤، ٣٦، ٤٨، ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ساعت بعد از عمل انکوباسیون ثبت شد. داده‌های به‌دست آمده در یک طرح آماری کاملاً تصادفی با ۳ تکرار آنالیز گردید. نتایج نشان داد سم آفلاتوکسین B1 سبب تغییر در تخمیر شکمبه و کاهش حجم گاز تولیدی (٤٢٩میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک) در مقایسه با گروه شاهد (۳۸۲میلی‌لیتر به‌ازای گرم ماده خشک) شد (P<۰/۰۵). در پایان ۱۲۰ ساعت انکوباسیون بیش‌ترین گاز تولیدی مربوط به تیمار شاهد و کم‌ترین گاز تولیدی مربوط به تیمار دریافت‌کننده ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری بود (P<۰/۰۵). افزودن لاکتوباسیلوس ال‌بوچنری سبب افزایش فراسنجه‌های تخمینی شامل انرژی‌متابولیسم، انرژی‌خالص و قابلیت هضم ماده‌آلی شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین افزودن سطوح ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم ال بوچنری به جیره آلوده به آفلاتوکسین B1 به‌طور معنی‌داری سبب کاهش pH در شرایط آزمایشگاهی گردید (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد لاکتوباسیلسوس ال‌بوچنری سبب افزایش قابلیت هضم شکمبه شد و توانایی مهار آلودگی آفلاتوکسین B1 در جیره گاوهای شیری را در شرایط برون تنی دارد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B1، لاکتوباسیلوس ال بوچنری، تولید گاز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: znemati@tabrizu.ac.ir

مقدمه

رشد کپک‌هادر فرآورده‌های مختلف، علاوه بر خسارت اقتصادی جبران‌ناپذیر، سبب تولید آفلاتوکسین‌ها شده که مشکلات عدیده‌ای را برای سلامت افراد جامعه درپی دارد. آلودگی مواد غذایی با آفلاتوکسین‌ها، یک مشکل رایج در مناطق گرمسیری و نیمه حاره‌ای دنیا به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. سازمان جهانی خوراک و غذا برآورد کرده است ۱۰۰۰ میلیون متر مکعب خوراک در هر سال توسط مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌شود (Bhat و همکاران، ۲۰۱۰). اخیراً بیش از ۴۰۰ نوع مایکوتوکسین شناسایی شده‌اند که در میان آن‌ها، بیش‌ترین مایکوتوکسین‌ها که سلامت انسان و دام‌را تحت تاثیر قرار می‌دهد شامل: هیپاتوتوکسیک، تراتوژنیک و متابولیت‌های ثانویه متاژنیک هستند. آن‌ها توسط سازمان بین‌المللی تحقیقات سرطان به‌عنوان گروه ۱ سرطان‌زا طبقه‌بندی می‌شوند (IARC، ۲۰۱۰). آفلاتوکسین در میان سموم قارچی از سمی‌ترین مایکوتوکسین‌ها است که توسط گونه‌های فلاووس چون آسپرژیلوزیس و پارازیتیکوس تولید می‌شود و شامل آفلاتوکسین B1، B2، G1 و G2 می‌باشند (Wild و Montesano، ۲۰۰۹). آفلاتوکسین B_1 سمی‌ترین و فراوان‌ترین نوع آفلاتوکسین در طبیعت است و یکی از آلودگی‌های موجود در مواد خوراکی می‌باشد (Gupta، ۲۰۰۷). آفلاتوکسین B_1 و G1 سرطان‌زا هستند و احتمالاً به‌دلیل تفاوت در ساختار بیش‌تر سمی‌ترند (Jaimez و همکاران، ۲۰۰۰). اثرات آفلاتوکسین B_1 شامل آسیب‌های کبدی، کاهش راندمان رشد، کاهش تولید و عدم مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی است (نعمتی و همکاران ۱۳۹۴؛ Moschini و همکاران، ۲۰۰۸). روش‌های مختلف بیولوژیکی (باکتری، مخمر، قارچ و آنزیم)، شیمیایی (آمیناسیون و الکالیزاسیون) و فیزیکی (بنتونیت، کربن فعال و هیدرات سدیم کلسیم) برای کاهش اثرات مضر آلودگی‌های آفلاتوکسین در خوراک و تغذیه استفاده شده است (Samarajeewa و همکاران، ۱۹۹۰). روش‌های بیولوژیکی ایمن می‌باشد و مکانیسم‌های متفاوتی در تجزیه آفلاتوکسین B_1 توسط باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها درگیر هستند (Verheecke و همکاران، ۲۰۱۶). میکروفلور شکمبه اولین خط دفاعی در برابر مایکوتوکسین‌ها هستند و بخشی از سیستم اولیه تبدیل زیستی مایکوتوکسین به ترکیبات با سمیت کم‌تر را تشکیل می‌دهند (Schollenberger و همکاران، ۲۰۰۶). به‌طوری که نشخوارکنندگان در مقایسه با غیرنشخوارکنندگان کم‌تر در معرض مسمومیت خوراک‌ها با مایکوتوکسین‌ها هستند (Fink-Gremmels، ۲۰۰۸). باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک جنس‌های لاکتوباسیلوس‌ها، استرپتوکوکوس‌ها، انتروکوکوس‌ها، پدیوکوکوس‌ها، لاکتوکوکوس‌ها، لئوکونوستوک‌ها می‌باشند. Ciegler و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند ۷۴٪ آفلاتوکسین‌ها در ۲۸ درجه سلسیوس توسط باکتری‌ها تجزیه گردید از آن پس مطالعات بیش‌تری با استفاده از انواع باکتری‌ها صورت گرفت. مطالعات زیادی برای تاثیر ویژگی‌های گونه‌های باکتری: اکتینوباکتریوم (گرم مثبت)، باسیلوس‌ها (گرم مثبت) و الفا، بتا، پرتئوباکتریا (گرم مثبت)، روی تجزیه آفلاتوکسین B_1 انجام شده است (Verheecke و همکاران، ۲۰۱۶). نوع اکتینو باکتریوم به‌طور گسترده‌ای در محیط مایع مورد مطالعه قرار گرفت، ظرفیت تجزیه ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B_1 در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بعد از ۴ روز بین ۲۴ و ۱۰۰ درصد متغیر بود. نوع پروتئوباکتریا α و β مورد بررسی قرار گرفت و بهترین ظرفیت تجزیه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر آفلاتوکسین B_1 به‌وسیله پلت‌های باکتری بین ۴۷/۷ و ۹۰ درصد در ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده شد. تجزیه آفلاتوکسین B_1 به‌میزان غلظت، دما، درجه حرارت و دوره انکوباسیون بستگی دارد (Verheecke و همکاران، ۲۰۱۶). El-Deeb و همکاران (۲۰۱۳) گونه‌ای از باسیلوس‌ها (TUBF1) را کشف کردند که توانایی از بین بردن ۱۰۰ درصد آفلاتوکسین B_1 را در طی ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس را داشت. در شرایط آزمایشگاهی تجزیه آفلاتوکسین B_1 معمولاً به‌دلیل انتقال به ماتریس‌های غذایی سخت است. لاکتوباسیل‌ها می‌توانند اثرات بیش‌تری روی ماتریس غذایی بگذارند. با توجه به اثرات سلامتی بخش باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان ارگانیسم‌های پروبیوتیک، این باکتری‌ها مورد توجه بسیار زیادی قرار گرفته‌اند (Dalie و همکاران، ۲۰۱۱). Khanafari و همکاران (۲۰۰۷) لاکتوباسیلوس ال پلانتروم را روی نمونه آلودگی ذرت به‌میزان ۰/۴۲ میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B_1 آزمایش کردند و بیان نمودند آفلاتوکسین B_1 در محدوده ۷۷ درصد بعد از ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تجزیه گردید. اخیراً دو نوع از باکتری‌ها برای تجزیه آفلاتوکسین B_1 کشف شده‌است که در آزمایشی Farzaneh و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که باسیلوس UTBSP1 می‌تواند ۹۵ درصد از آفلاتوکسین آجیل را تجزیه کند. در مطالعه دیگری Chen و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند لاکتوباسیل‌ها ۱۰۰ درصد آفلاتوکسین B_1 را از بین می‌برد. Tropcheva و همکاران (۲۰۱۶) نیز طی پژوهشی مشخص ساختند که زیرگونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از ماست تخمیری بلغاری می‌توانند به‌طور کامل، رشد آسپرژیلوس آواموریو پنیسیلیوم کلاویفورم را مهار نموده و هم‌چنین رشد آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B_1 را به‌صورت معنی‌داری کاهش دهد. هدف از این مطالعه بررسی کاهش اثرات سوء آفلاتوکسین B_1 بر تخمیر جیره گاوهای شیری در حضور افزودنی لاکتوباسیلوس ال بوچنری در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

جیره مورد استفاده در این آزمایش جیره کاملاً مخلوط برای گاوهای شیری بود که ترکیبات و آنالیز شیمیایی آن در جدول ۱ آمده است. جیره پایه با استفاده از الک ۱ میلی‌متری آسیاب و به‌داخل شیشه‌های سرم ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه (شاهد)، ۲، ۳- جیره پایه همراه با ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفلاتوکسین B_1 و ۴، ۵ و ۶- جیره غذایی پایه آلوده با آفلاتوکسین B_1 (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌همراه سطوح مختلف افزودنی لاکتوباسیلوس ال بوچنری به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم در کیلوگرم جیره غذایی بودند.

جدول ۱: ترکیب جیره غذایی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی

اجزاخوراکی	درصد	ترکیب شیمیایی جیره پایه	درصد
یونجه	۴۱/۶	پروتئین خام	۱۷
جو	۱۱/۷۶	الیاف نامحلول در شوینده خنثی جیره	۳۲/۴
ذرت	۱۶/۳۲	الیاف نامحلول در شوینده خنثی علوفه	۲۱/۲
کنجاله تخم پنبه	۴/۵۶	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی جیره	۲۲/۳
سبوس گندم	۱/۹۲	کربوهیدرات‌های غیر فیبری	۴۰/۸
کنجاله سویا	۷/۴۴	کلسیم	۰/۹
فول فت	۲/۸۸	فسفر	۱۰/۴
پودر چربی	۰/۴۸	عصاره اتری	۳/۵
کربنات کلسیم	۰/۳۳۶		
نمک طعام	۰/۳۳۶		
مکمل مواد معدنی ویتامینی و ب کمپلکس	۱/۲		
جوش شیرین	۰/۷۲		
اکسیدمنیزیوم	۰/۰۹۶		
مخمر	۰/۱۴۴		
توکسین بایندر	۰/۰۶۲۴		
استخوان	۰/۱۴۴		
ملاس	۳/۷۸		
تفاله چغندر	۳/۷۸		
پنبه دانه	۲/۸۳		

جیره پایه براساس احتیاجات NRC (۲۰۰۱) تنظیم شد.

روش تهیه آفلاتوکسین: آفلاتوکسین مورد نیاز به‌روش Nemati وهمکاران (۲۰۱۵) تهیه شد. برای این منظور یک ویال سویه استاندارد *Aspergillus Parasiticus* NRLL 2999 تهیه و در محیط آزمایشگاهی درون شیشه‌ای تحت شرایط استریل بر روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز آگار (potato dextrose agar) کشت گردید. سوسپانسیون اسپور قارچی حاوی $۶/۵\times۱۰^{۶}$ اسپورقارچی در محل آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز تهیه و مقدار ۲ میلی‌لیتر از آن به‌داخل فلاسک حاوی محیط کشت افزوده شد. سپس محیط کشت تلقیح شده به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور قرار داده شد. محیط کشت تهیه شده خشک شد سپس میزان آفلاتوکسین B_1 آن به‌روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد (Thiel و همکاران، ۱۹۸۶). آفلاتوکسین تولیدی در اتانول حل و به‌میزان نیاز به ویال‌ها افزوده شد.

اندازه‌گیری تولید گاز و فراسنجه‌های تخمینی: به‌منظور اندازه‌گیری تولید گاز آزمایشگاهی از روش Fedorak و Hrudey (۱۹۸۳) استفاده شد. در این روش ابتدا مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از هر ماده خوراکی آسیاب شده (۱میلی‌متر) با دقت توزین و به‌داخل شیشه‌های سرم استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. برای هر نمونه ماده غذایی ۳ تکرار درنظر گرفته شد. مایع شکمبه ۲ ساعت بعد از وعده خوراک صبحگاهی از ۲رأس گوسفند قزل نر (۳ سال سن) فیستوله گذاری شده که بر پایه احتیاجات نگه‌داری تغذیه می‌شدند، توسط پارچه توری چهار لایه جمع‌آوری شد و در داخل فلاکس آبی بادمای ۳۹ درجه سلسیوس سریعاً به آزمایشگاه علوم دامی دانشکده منتقل شد. قبل از انتقال مایع شکمبه به‌داخل شیشه‌های سرم، با بافر تهیه شده به‌روش McDougall (۱۹۴۸) به نسبت ۱ به ۲ (یک قسمت مایع شکمبه‌ودوقسمت‌بافر)مخلوط شد. سپس سطوح مختلف آفلاتوکسین B_1 و لاکتوباسیلوس بوچنری به محتوی شیشه‌ها افزوده شد. به‌منظور تصحیح ماده خشک با منشاء مایع شکمبه تعداد ۳ عدد شیشه بدون آن‌که ماده غذایی ریخته شود و فقط دارای مایع شکمبه و بافر بودند درنظر گرفته شدند.کل شیشه‌ها جهت اندازه‌گیری گاز تولیدی به داخل دستگاه انکوباتور شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۹ درجه سلسیوس، منتقل شد و عمل قرائت و ثبت میزان گاز تولیدی ناشی از تخمیر مواد غذایی در ساعات ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ساعت بعد از عمل انکوباسیون انجام گرفت. فراسنجه‌های تخمینی شامل: انرژی قابل متابولیسم، انرژی خام و قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشک از روش Menk و Stingas (۱۹۸۶) محاسبه شد:

$ME\ (MJ/kg\ DM) = ۲/۲+۰/۱۳۶GP+۰/۰۰۵۷CP+۰/۰۰۰۲۸۶CF^2$

$NEL\ (MJ/kg\ DM) = ۰/۵۴+۰/۰۹۶GP+۰/۰۰۳۸CP+۰/۰۰۰۱۷۳\ CF^2$

$DOMD\ (\%) = ۱۶/۴۹+۰/۹۰۴۲GP+۰/۰۴۹۲CP+۰/۰۳۸۷CA$

اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه از روش Menke و همکاران (۱۹۷۹) محاسبه شد:

$SCFA\ (mmol/۲۰۰\ mg\ DM) = ۰/۰۲۲۲\ GP - ۰/۰۰۴۲۵$

که‌در این‌رابطه GP، CP، CF و CA به‌ترتیب گاز تولیدی در ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر خام به‌صورت درصد در ماده خشک می‌باشد.

فراسنجه‌های تولید گاز: به‌منظور برآورد فراسنجه‌های تولید گاز از روش McDonald و Orskov (۱۹۹۷) استفاده گردید:

$Y= b (1-e^{(-ct)})$

که در این رابطه b پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر گاز)، c نرخ ثابت تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t زمان (ساعت) و Y میزان گاز تولیدی در زمان t بود.

روش آماری: آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی برنامه آماری SAS (۲۰۰۲) آنالیز شدند و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها (در سطح ۵ درصد) به‌کار برده شد. مدل آماری طرح به‌صورت زیر بود: $Y_{ij}= \mu+T_i+e_{ij}$

Y_{ij} = مقدار هر مشاهده، μ= میانگین کل، T_i= اثر تیمار، e_{ij} = خطای آزمایش است. برای مقایسه میانگین‌ها از رویه دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

اثر لاکتوباسیل ال بوچنری بر میزان تولید گاز در جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۲ نشان داده شده است. به‌طورکلی افزودن لاکتوباسیلوس سبب کاهش معنی‌داری گاز تولیدی گردید ($p<۰/۰۵$). تیمار شاهد حاوی جیره پایه بدون افزودنی از ساعت ۴ تا ۱۲۰ انکوباسیون بیش‌ترین حجم تولید گاز را داشت و تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها از خود نشان داد ($p<۰/۰۵$). در ساعت ۴ و ۶ انکوباسیون تفاوت قابل توجهی بین تیمار شاهد و تیمارهای حاوی آفلاتوکسین ۰/۵ و ۱ میکروگرم (A1 و A2) و تیمار حاوی ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس (L2) مشاهده نگردید. در ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون بیش‌ترین گاز تولیدی مربوط به تیمار شاهد و کم‌ترین گاز تولیدی مربوط به تیمار حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم آفلاتوکسین و تیمار حاوی ۰/۱ نانوگرم لاکتوباسیلوس بود. در ساعات ۷۲ و ۹۶ انکوباسیون کم‌ترین گاز تولیدی مربوط به تیمار ۰/۱ نانوگرم (L2) و بیش‌ترین مربوط به تیمار شاهد بود بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به‌هم نداشتند. تیمارهای حاوی ۰/۱ (L1) و ۰/۲ نانوگرم (L3) لاکتوباسیلوس از ساعت ۲۴ تا ۹۶ اختلاف معنی‌داری نسبت به‌هم نداشتند اما نسبت به تیمار ۰/۱ نانوگرم تولیدگاز بیش‌تری داشتند. در پایان انکوباسیون بیش‌ترین نرخ تولید گاز مربوط به تیمار شاهد و کم‌ترین مربوط به تیمار حاوی ۰/۱ نانوگرم لاکتوباسیلوس (L2) بود (جدول ۲). هم‌چنین تیمار ۰/۱ نانوگرم لاکتوباسیل (L2) در مقایسه با تیمارهای آفلاتوکسین ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر کیلوگرم (A1 و A2) به‌طور معنی‌داری تولید گاز کم‌تری داشت ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: اثر لاکتوباسیل ال بوچنری بر میزان تولید گاز (میلی‌لیتر به‌ازای گرم ماده خشک) در جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) در شرایط آزمایشگاهی

	زمان انکوباسیون								
تیمار	۴	۶	۸	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
شاهد	۱۱/۲۷^{a}	۴۰/۸۳^{a}	۹۹/۵۳^{a}	۱۷۸/۵۳^{a}	۲۹۱/۴۳^{a}	۳۶۵/۴۷^{a}	۳۹۷/۸۶^{a}	۴۱۴/۲۴^{a}	۴۲۹/۷۴^{a}
A1	۱۱/۲۷^{a}	۳۹/۸۹^{a}	۸۹/۹۲^{bc}	۱۵۱/۴۱^{bc}	۲۴۵/۲۹^{c}	۳۲۷/۷۳^{bc}	۳۶۱/۰۴^{b}	۳۷۷/۶۹^{b}	۳۸۹/۹۵^{bc}
A2	۱۲/۲۹^{a}	۴۰/۰۶^{a}	۸۷/۱۹^{bc}	۱۴۸/۵۱^{c}	۲۳۹/۲۹^{c}	۳۱۸/۵۱^{cd}	۳۶۱/۱۳^{b}	۳۷۳/۶۸^{b}	۳۸۲/۱۸^{bc}
L1	۸/۷^{b}	۳۴/۴۲^{b}	۸۶/۱۷^{c}	۱۵۴/۱۵^{bc}	۲۶۴/۷^{b}	۳۳۷/۸^{b}	۳۵۸/۶۵^{b}	۳۶۸/۱۵^{b}	۳۷۹/۰۲^{cd}
L2	۸/۷^{b}	۳۴/۴۲^{b}	۸۶/۵۱^{bc}	۱۵۰/۳۹^{c}	۲۴۷/۷^{c}	۳۱۴/۳۲^{d}	۳۳۹/۱۹^{c}	۳۵۳/۵۳^{c}	۳۶۸/۱۸^{d}
L3	۱۱/۲۷^{a}	۳۸/۵۲^{a}	۹۳/۱۷^{b}	۱۵۹/۱^{b}	۲۶۶/۳۲^{b}	۳۳۳/۵۳^{b}	۳۵۸/۶۵^{b}	۳۷۷/۰۱^{b}	۳۹۴/۰۵^{b}
SEM	۰/۵۴	۰/۸۵	۲/۰۳	۲/۵۴	۳/۵۶	۳/۱۹	۳/۳	۳/۵۴	۴/۱۳
P Value	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۸

شاهد: جیره غذایی پایه و A1، A2 به‌ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین B_1، L1، L2 و L3 به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری می‌باشد. میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<۰/۰۵$).

فراسنجه‌های تخمینی تولیدگاز پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۳ آورده شده است. در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین B_1 فراسنجه‌های تخمینی شامل انرژی متابولیسمی، انرژی خالص، میزان قابلیت هضم ماده الی در ماده خشک و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین تیمارهای حاوی ۰/۰۱ و ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس (L1 و L3) سبب بهبود فراسنجه‌های تولید گاز گردید. به‌طوری‌که میزان آن‌ها نسبت به تیمار شاهد و تیمار حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 افزایش داد (جدول۲)

(p<۰/۰۵). پس‌از پایان ۱۲۰ساعت انکوباسیون افزودن سطوح مختلف لاکتوباسیلوس ال بوچنری ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم میزان pH را نسبت به تیمار حاوی آفلاتوکسین ۰/۵ و ۱ میکروگرم‌به‌طور معنی‌داری کاهش داد (p<۰/۰۵). نتایج فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از تخمیر آزمایشگاهی در جدول ۴ آورده شده است که با افزودن هر ۳سطح لاکتوباسیل‌ال‌بوچنری ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم به جیره آلوده به ۱ میکروگرم آفلاتوکسین B_1 سبب افزایش معنی‌داری نرخ ثابت تولید گاز نسبت به تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم آفلاتوکسین (A1 و A2) گردید (p<۰/۰۰۱). پتانسیل تولید گاز تحت تاثیر افزودن لاکتوباسیلوس و آفلاتوکسین به‌طور قابل توجهی نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. تیمار ۰/۵ نانوگرم آفلاتوکسین(A1) پتانسیل تولید گاز بیش‌تری نسبت به سطوح مختلف ال‌بوچنری داشت درحالی‌که تیمار ۱ میکروگرم آفلاتوکسین(A2) پتانسیل تولید گاز کم‌تری نسبت به سطوح مختلف ال بوچنری از خود نشان داد.

جدول ۳: تاثیر لاکتوباسیلوس ال بوچنری بر قابلیت هضم، انرژی، فراسنجه‌های تخمیری و میزان pH تولید گاز به‌روش برون تنی

تیمار	ME	NEL	DOMD	SCFA	pH
شاهد	۱۰/۲۲^{a}	۶/۲۴^{a}	۷۰/۴۷^{a}	۱/۲۹^{a}	۵/۲^{bc}
A1	۸/۹۸^{c}	۵/۳۳^{cd}	۶۲/۱^{e}	۱/۰۹^{c}	۵/۳^{ab}
A2	۸/۸۵^{d}	۵/۲۳^{d}	۶۱/۰۳^{f}	۱/۰۶^{c}	۵/۴^{a}
L1	۹/۵۲^{b}	۵/۶۹^{b}	۶۵/۶۳^{c}	۱/۱۸^{b}	۵/۲^{c}
L2	۹/۰۵^{c}	۵/۳۸^{c}	۶۳/۵۵^{d}	۱/۰۶^{c}	۵/۲^{c}
L3	۹/۵۵^{b}	۵/۷۵^{b}	۶۵/۹۴^{b}	۱/۱۸^{b}	۵/۲^{c}
SEM	۰/۰۲۴	۰/۰۳۱	۰/۰۲۳	۰/۰۱۱	۰/۰۲۲
P Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۸

شاهد: جیره غذایی پایه و A1، A2 به‌ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین B_1، L1، L2 و L3 به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری می‌باشد. GP: تولید گاز (میلی‌لیتر بر ۰/۲ گرم ماده خشک)، ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)، NEL: انرژی خالص (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)، DOMD: قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشک (گرم بر کیلوگرم ماده آلی در ماده خشک)، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (SCFA): (میلی‌مول بر ۰/۲ گرم ماده خشک). میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (p<۰/۰۵).

جدول ۴. تاثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس ال بوچنری بر فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط برون تنی

فراسنجه	تیمار							سطح معنی‌داری	
	شاهد	A1	A2	L1	L2	L3	SEM	P value
b (میلی‌لیتر)	۴۳۱/۹۵^{a}	۳۹۶/۳۳^{b}	۳۹۱/۸۵^{d}	۳۸۷/۰۵^{e}	۳۷۰/۴۳^{f}	۳۹۴/۱۵^{c}	۰/۰۱۷	<۰/۰۰۱
c (میلی‌لیتر در ساعت)	۰/۰۳۷^{ab}	۰/۰۳۴^{c}	۰/۰۳۴^{c}	۰/۰۳۸^{a}	۰/۰۳۷^{b}	۰/۰۳۷^{ab}	۱/۶۸	<۰/۰۰۱

شاهد: جیره غذایی پایه و A1، A2 به‌ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین B_1، L1، L2 و L3 به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری می‌باشد.
b- پتانسیل تولید گاز، c- نرخ ثابت تولید گاز. میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

بحث

امروزه آلودگی مواد غذایی با انواع مختلف قارچ‌های توکسین‌زا یکی از مشکلات جدی جامعه جهانی به‌شمار می‌آید. از این بین اسپرژیلوس فلاووس یکی از مهم‌ترین قارچ‌های توکسین‌زا است که به‌علت تولید آفلاتوکسین B_1 بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آفلاتوکسین B_1 از طریق خوردن یا استنشاق، به بدن وارد و با عبور از روده کوچک، جذب خون شده و سپس در بافت‌های مختلف از جمله کبد، ریه، کلیه، سیستم‌های ایمنی، تناسلی، عصبی و گوارشی تجمع پیدا می‌کند. میزان تجزیه‌پذیری آفلاتوکسین B_1 ممکن است به‌دلیل نوع خوراک تغذیه شده حیواناتی که مایع شکمبه از آن گرفته می‌شود بستگی دارد (Jiang و همکاران، ۲۰۱۴). داده‌های مربوط به سمیت آفلاتوکسین‌ها نشان داد که آن‌ها دارای حلقه سیکلوپنتن و بخشی از فوران در ساختار شیمیایی خود می‌باشند در آفلاتوکسین B_1 حضور پیوند دوگانه در انتهای حلقه فوران عامل کلیدی فعالیت‌های سمی و سرطان‌زا است (Wang و همکاران، ۲۰۱۱). این مایکوتوکسین هم‌چنین در کبد تغلیظ گردیده و در نهایت سرطان کبد را به‌وجود می‌آورد (Parkin و همکاران، ۲۰۰۲). اخیراً مطالعات متعددی درباره فعالیت‌های ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک و

امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده‌های زیستی گزارش شده است (Oliveira و همکاران، ۲۰۱۴؛ Gerbaldo و همکاران، ۲۰۱۲).

با توجه به نتایج حاصل از تولید گاز افزودن ۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر ال بوچنری در دمای ۳۹ درجه سلسیوس تا ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون به‌طورکلی اثر منفی آفلاتوکسین B_1 بر تخمیر شکمبه‌ای و تولید گاز را مهار کرد اما بعد از ۴۸ ساعت نفاوت بین تیمارها معنی‌دار نبود. چنین به‌نظر می‌رسد در طول ساعات اولیه انکوباسیون باکتری‌ها می‌توانند رشد و تکثیر کرده و جمعیت سلولی باکتری می‌توانند با حداکثر ظرفیت به آفلاتوکسین B1 متصل شوند و چنین اتصالی اثر منفی آفلاتوکسین بر تخمیر و تولید گاز را مهار می‌کند اما با تجزیه تدریجی پیوند غیرکوالانسی بین آفلاتوکسین B1 و باکتری لاکتوباسیل درنهایت ظرفیت اتصالی در ۷۲ ساعت از بین می‌رود به‌طوری‌که در آزمایش حاضر میزان تولید گاز با افزودن لاکتوباسیل در ۷۲ ساعت انکوباسیون و بعد از آن معنی‌دار نبود (Kasmani و همکاران، ۲۰۱۲). Huang و همکاران، (۲۰۱۷) گزارش کردند لاکتوباسیلوس پلانتروم C88 با قابلیت اتصال خوب به آفلاتوکسین B_1 در شرایط آزمایشگاهی به‌وسیله سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سمیت آفلاتوکسین را کاهش دهد. در آزمایش مشابهی با ارزیابی ویژگی‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس L60 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم L23 دریافتند ضمن کاهش معنی‌دار رشد قارچ آسپرژیلوس، میزان آفلاتوکسین B_1 تولید شده را نیز به‌ترتیب ۹۹/۸-۵۹۷/٪ و ۱۰۰-۲۷/۵٪ کاهش داد (Gerbaldo و همکاران، ۲۰۱۲). Khanafari و همکاران، (۲۰۰۷) و Magnussont و Schnürer، (۲۰۰۱) به‌ترتیب در مطالعاتی جداگانه، اثرات ضدقارچی لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس برویس را در شرایط تخمیر آزمایشگاهی نشان دادند که با یافته‌های این آزمایش مطابقت داشت. باکتری‌های اسیدلاکتیکی با قابلیت تولید پپتیدهای ضدقارچی در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و مولد فساد موثر می‌باشند (Galvez و همکاران، ۲۰۰۷).

افزودن سطوح ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم ال بوچنری به جیره آلوده به افلاتوکسین B_1 به‌طور معنی‌داری سبب کاهش pH در شرایط آزمایشگاهی گردید. در مطالعه مشابهی که بر روی سویه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها بر روی رشد آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B_1 در نان تخمیری ذرت انجام گرفت نتایج نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون رشد آسپرژیلوس به‌طورکلی مهار شده بود. لاکتوباسیل ال بوچنری و ال برویس پس از ۱۲۰ ساعت تخمیر به‌ترتیب ۴۵/۳ ٪ و ۴۳/۹٪ آفلاتوکسین B_1 را تجزیه کردند (Roger و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین افزودن لاکتوباسیل‌ها pH را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که با یافته‌های این آزمایش مطابقت دارد آن‌ها نشان دادند کاهش pH می‌تواند به‌وسیله هیدرولیز کربوهیدرات‌ها در نان تخمیری ذرت توسط تخمیر لاکتیکی مختلف توضیح داده می‌شود. این هیدرولیز کربوهیدرات‌ها با تولید اسیدهای الی همراه است و باعث کاهش pH می‌شود (Yao و همکاران، ۲۰۰۹). Sangi و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند لاکتوباسیل‌ها و باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک می‌توانند آفلاتوکسین B_1 را از طریق تولید اسید در شرایط تخمیر آزمایشگاهی کاهش دهد. در آزمایش مشابهی به‌وسیله افزودن لاکتوباسیلوس ال‌فرمنتوم و ال‌برویس به سورگوم پس از ۶ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس کاهش pH را گزارش کردند (Asmahan و Muna، ۲۰۰۹).

در آزمایش حاضر تیمارهای حاوی ۰/۰۱ و ۰/۲ ال بوچنری در مقایسه با تیمارهای حاوی آفلاتوکسین سبب افزایش قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشک گردید که به‌دنبال آن میزان انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه افزایش یافت. هم‌چنین افزودن آفلاتوکسین به محیط کشت سبب کاهش میزان اسیدچرب کوتاه زنجیر تخمینی شد که مشابه آن گزارش کردند میزان تولید کل اسیدچرب فرار و قابلیت هضم در گروه حاوی آفلاتوکسین علوفه ریگراس و یونجه کاهش یافت (Jiang و همکاران، ۲۰۱۲). تولید اسیدهای آلی، پراکسیدهیدروژن، دی استیل و پپتیدهای زیست فعال از دلایل بروز اثرات ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیکی به‌شمار می‌آید. در برخی منابع نیز فعالیت ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک به اثر سینرژیستی این ترکیبات نسبت داده می‌شود (Gerbaldo و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین باید درنظر داشت که جمعیت سلول باکتریایی، یکی از عوامل مؤثر در کاهش آفلاتوکسین B_1 است. لذا می‌بایست برای محافظت مصرف‌کننده‌ها در برابر آفلاتوکسین B_1، جمعیت مناسبی از آن را در رژیم غذایی مورد استفاده قرار داد.

Shetty و Jespersen (۲۰۰۶) و karimi و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند باکتری‌های اسیدلاکتیک در حالت زنده و غیرزنده، توانایی کاهش انواعی از آفلاتوکسین را دارند. اتصال باکتری‌های اسیدلاکتیک به مایکوتوکسین‌ها از طریق اتصال دیواره سلولی باکتری با این سموم صورت می‌گیرد. پپتیدوگلیکان باکتری با تمایل زیاد برای اتصال به ترکیبات خارجی باعث محافظت از باکتری در برابر آلودگی‌های خارجی می‌شود (Guan و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است لاکتوباسیل‌ها توانایی حذف آفلاتوکسین B_1 را دارند اما مکانیسم خاص سم‌زدایی به‌طور دقیق مشخص نشده است (Peltonen و همکاران، ۲۰۰۱؛ El-Nezami و همکاران، ۱۹۹۸). گونه لاکتوباسیل‌ها بیش‌ترین ظرفیت برای تجزیه ترکیبات شیمیایی از طریق تولید آنزیم‌های خارج سلولی را دارد (Wu و همکاران، ۲۰۰۹). هم‌چنین گونه‌های باسیلوس تحمل بالایی در شرایط محیطی ناسازگار به‌ویژه در رطوبت و دمای بالا دارد از این‌رو پیشنهاد می‌شود توانایی بیش‌تر

برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زا و کاهش سمیت آفلاتوکسین B_1 مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج نشان می‌دهد لاکتوباسیل‌ها توانایی کاهش pH و مهار اثر منفی آفلاتوکسین B1 در ابتدای انکوباسیون شد و در انتهای دوره تاثیر معنی‌داری بر بهبود تخمیر شکمبه‌ای و تولید گاز نداشت. هم‌چنین لاکتوباسیلسوس ال‌بوچنری سبب افزایش قابلیت هضم شکمبه شد بنابراین توانایی مهار اثرات ضد هضمی آلودگی آفلاتوکسین B_1 در جیره گاوهای شیری را در شرایط برون‌تنی دارد اما برای شناسایی مکانیسم دقیق باید مطالعات بیش‌تری صورت گیرد.

منابع

۱. **نعمتی، ذ.؛ جانمحمدی، ح.غ.؛ تقی‌زاده، ا.؛ ملکی‌نژاد، ح. و مقدم، غ.، ۱۳۹۴.** تاثیر جاذب طبیعی بنتونیت در کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین B1 بر عملکرد و سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی. تحقیقات تولیدات دامی. سال ۴، شماره ۳، صفحات ۶۷ تا ۷۷.

۲. **Ali, A.A. and Mustafa, M.M., 2009.** Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of kisra, a Sudanese fermented food. Pakistan Journal of Nutrition. Vol. 8, pp: 1349-1353.

۳. **Bang, Y.J.; Kang, Y.K.; Kang, W.K.; Boku, N.; Chung, H.C.; Chen, J.S.; Doi, T.; Sun, Y.; Shen, L. and Qin, S., 2011** .Phase II study of sunitinib as second-line treatment for advanced gastric cancer. Investigational new drugs. Vol. 29, pp: 1449-1458.

۴. **Bhat, R.; Rai, R.V. and Karim, A.A., 2010.** Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. Comprehensive reviews in food science food safety. Vol. 9, pp: 57-81.

۵. **Chen, Y.; Kong, Q.; Chi, C.; Shan, S. and Guan, B., 2015.** Biotransformation of aflatoxin B 1 and aflatoxin G 1 in peanut meal by anaerobic solid fermentation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus. International journal of food microbiology. Vol. 211, pp: 1-5.

۶. **Ciegler, A.; Lillehoj, E.; Peterson, R. and Hall, H., 1966.** Microbial detoxification of aflatoxin. Applied microbiology. Vol. 14, pp: 934-939.

۷. **Dalié, D.; Deschamps, A. and Richard-Forget, F., 2010.** Lactic acid bacteria, Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food control. Vol. 21, pp: 370-380.

۸. **El-Deeb, B.; Altalhi, A.; Khiralla, G.; Hassan, S. and Gherbawy, Y., 2013.** Isolation and characterization of endophytic *Bacilli bacterium* from maize grains able to detoxify aflatoxin B1. Food biotechnology. Vol. 27, pp: 199-212.

۹. **Farzaneh, M.; Shi, Z.Q.; Ghassempour, A.; Sedaghat, N.; Ahmadzadeh, M.; Mirabolfathy, M. and Javan-Nikkhah, M., 2012.** Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. Food control. Vol. 23, pp: 100-106.

۱۰. **Fedorah, P.M. and Hrudey, S.E., 1983.** A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. Environmental Technology. Vol. 4, pp: 425-432.

۱۱. **Fink-Gremmels, J., 2008.** Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. Food Additives Contaminants. Vol. 25, pp: 172-180.

۱۲. **Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L. and Omar, N.B., 2007.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International journal of food microbiology. Vol. 120, pp: 51-70.

۱۳. **Gerbaldo, G.A.; Barberis, C.; Pascual, L.; Dalcero, A. and Barberis, L., 2012.** Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. FEMS microbiology letters. Vol. 332, pp: 27-33.

۱۴. **Guan, R.; Wang, Q.; Sundberg, E.J. and Mariuzza, R.A., 2005.** Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution. Journal of molecular biology. Vol. 347, pp: 683-691.

۱۵. **Huang, L.; Duan, C.; Zhao, Y.; Gao, L.; Niu, C.; Xu, J. and Li, S., 2017.** Reduction of aflatoxin B1 toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: a potential probiotic strain isolated from Chinese traditional fermented food "Tofu". Plos one. Vol. 12: e0170109.

۱۶. **IARC. 2002.** Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, World Health Organization.

۱۷. **Jaimez, J.; Fente, C.; Vazquez, B.; Franco, C.; Cepeda, A.; Mahuzier, G. and Prognon, P., 2000.** Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography A. Vol. 882, pp: 1-10.

۱۸. **Jiang, Y.H.; Wang, P.; Yang, H.J. and Chen, Y., 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. Vol. 6, pp: 2008-2023.

۱۹. **Jiang, Y.; Yang, H. and Lund, P., 2012.** Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. Animal feed science technology. Vol. 175, pp: 85-89.

۲۰. **Karimi, D.A.; Tajabadi, E.M.; Sharifan, A.; Nikoopour, H. and Hashemi, M., 2012.** Binding ability of some iranian native lactobacillus spp. to aflatoxin m1. Journal of microbial biotechnology.

۲۱. **Kasmani Bagherzadeh, F.; Torshizi, K.; Allameh, A. and Shariatmadari, F., 2012.** Aflatoxin detoxification potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian poultry. Iranian Journal of Veterinary Research. Vol. 13, pp: 152-155.

۲۲. **Khanafari, A.; Soudi, H. and Miraboulfathi, M., 2007.** Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. Iranian Journal of Environmental Health, Science Engineering. Vol. 4, pp: 163-168.

۲۳. **Littell, R.C.; Stroup, W.W. and Freund, R.J., 2002.** SAS for linear models, SAS institute.

۲۴. **Magnusson, J. and Schnürer, J., 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied Environmental Microbiology. Vol. 67, pp: 1-5.

۲۵. **Menke, K.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, D. and Schneider, W., 1979.** The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. The Journal of Agricultural Science. Vol. 93, pp: 217-222.

۲۶. **Moschini, M.; Gallo, A.; Piva, G. and Masoero, F., 2008.** The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release

of the sequestered toxin. Animal Feed Science Technology. Vol. 147, pp: 292-309.

۲۷. **Nemati, Z.; Karimi, A. and Besharati, M., 2015.** Published. Impact of Aflatoxin Contaminated Feed and Yeast Cell Wall Supplementation on Immune System in Broiler Chickens, pp. ۸-۹. In, Proceedings of International Conference on Innovations in Chemical & Agricultural Engineering.

۲۸. **Oliveira, P.M.; Zannini, E. and Arendt, E.K., 2014.** Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. Food microbiology. Vol. 37, pp: 78-95.

۲۹. **Peltonen, K.; El-Nezami, H.; Haskard, C.; Ahokas, J. and Salminen, S., 2001.** Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of dairy science. Vol. 84, pp: 2152-2156.

۳۰. **Roger, T. and Léopold, T.N., 2015.** Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B 1 production in kutukutu. Journal of Microbiology Research. Vol. 5, pp: 84-94.

۳۱. **Sangi, F.; Mohammadi, A.; Afzali, N. and Mirabolfathy, M., 2018.** Identification of New Aflatoxin B1-Degrading Bacteria from Iran. Iranian Journal of Toxicology. Vol. 12, No. 3, pp: 39-44.

۳۲. **Schollenberger, M.; Müller, H.M.; Rüfle, M.; Suchy, S.; Plank, S. and Drochner, W., 2006.** Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. Mycopathologia. Vol. 161, pp: 43-52.

۳۳. **Shetty, P.H. and Jespersen, L., 2006.** *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends in Food Science. Vol. 17, pp: 48-55.

۳۴. **Thiel, P.; Stockenström, S. and Gathercole, P., 1986.** Aflatoxin analysis by reverse phase HPLC using post-column derivatization for enhancement of fluorescence. Journal of liquid chromatography. Vol. 9, pp: 103-112.

۳۵. **Verheecke, C.; Liboz, T. and Mathieu, F., 2016.** Microbial degradation of aflatoxin B1: current status and future advances. International journal of food microbiology. Vol. 237, pp: 1-9.

۳۶. **Wang, F.; Xie, F.; Xue, X.; Wang, Z.; Fan, B. and Ha, Y., 2011.** Structure elucidation and toxicity analyses of the radiolytic products of aflatoxin B1 in methanol, water solution. Journal of hazardous materials. Vol. 192, pp: 1192-1202.

۳۷. **Wild, C.P. and Montesano, R., 2009.** A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. Cancer letters. Vol. 286, pp: 22-28.

۳۸. **Wu, Q.; Jezkova, A.; Yuan, Z.; Pavlikova, L.; Dohnal, V. and Kuca, K., 2009.** Biological degradation of aflatoxins. Drug Metabolism Reviews. Vol. 41, pp: 1-7.

۳۹. **Yao, A.; Egounlety, M.; Kouame, L. and Thonart, P.J.A.M.V., 2009.** Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle. Vol. 153, pp: 54-65.