

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 ال بوچنری 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) به همراه سطوح مختلف افزودنی لاکتوباسیلوس ال بوچنری به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم در کیلوگرم جیره غذایی بودند. میزان گاز تولیدی در ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از عمل انکوباسیون ثبت شد. داده‌های به دست 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 (۴۲۹ میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک) در مقایسه با گروه شاهد (۳۸۲ میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک) شد ($P < 0/05$). 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 ($P < 0/05$). افزودن لاکتوباسیلوس ال بوچنری سبب افزایش فراسنجه‌های تخمینی شامل انرژی متابولیسم، انرژی خالص و قابلیت هضم ماده‌آلی شد ($P < 0/05$). 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 ($P < 0/05$). نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس ال بوچنری 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



مقدمه

رشد کپک‌ها در فرآورده‌های مختلف، علاوه بر خسارت اقتصادی جبران‌ناپذیر، سبب تولید آفلاتوکسین‌ها شده که مشکلات عدیده‌ای را برای سلامت افراد جامعه در پی 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 دام را تحت تاثیر قرار می‌دهد شامل: هیپاتوتوکسیک، تراوتونیک 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 اسپرژیلوزیس و پارازیتیکوس تولید می‌شود و شامل آفلاتوکسین B₁، B₂، G₁ و G₂ می‌باشند (Wild و Montesano، ۲۰۰۹). آفلاتوکسین B₁ سمی‌ترین و فراوان‌ترین نوع آفلاتوکسین در طبیعت است و یکی از آلودگی‌های موجود در مواد خوراکی می‌باشد (Gupta، ۲۰۰۷). آفلاتوکسین B₁ و G₁ سرطان‌زا هستند و احتمالاً به‌دلیل تفاوت در ساختار بیش‌تر سمی‌ترند (Jaimez و همکاران، ۲۰۰۰). اثرات آفلاتوکسین B₁ 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 شده‌است (Samarajeewa و همکاران، ۱۹۹۰). روش‌های بیولوژیکی ایمن می‌باشد و مکانیسم‌های متفاوتی در تجزیه آفلاتوکسین B₁ توسط باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها درگیر هستند (Verheeecke 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). به‌طوری‌که 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، پرتئوباکتريا (گرم مثبت)، روی تجزیه آفلاتوکسین B₁ انجام شده است (Verheeecke و همکاران، ۲۰۱۶). نوع اکتینوباکتریوم به‌طور گسترده‌ای در محیط مایع مورد مطالعه قرار گرفت، ظرفیت تجزیه ۵ میلی گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B₁ در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بعد از ۴ روز بین ۲۴ و ۱۰۰ درصد متغیر بود. نوع پروتئوباکتريا α و β مورد بررسی قرار گرفت و بهترین ظرفیت تجزیه ۰/۲ میلی گرم در لیتر آفلاتوکسین B₁ به‌وسیله پلت‌های باکتری بین ۴۷/۷ و ۹۰ درصد در ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده شد. تجزیه آفلاتوکسین B₁ به‌میزان غلظت، دما، درجه حرارت و دوره انکوباسیون بستگی دارد (Verheeecke و همکاران، ۲۰۱۶). El-Deeb و همکاران (۲۰۱۳) گونه‌ای از باسیلوس‌ها (TUBF1) را کشف کردند که توانایی از بین بردن ۱۰۰ درصد آفلاتوکسین B₁ را در طی ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس را داشت. در شرایط آزمایشگاهی تجزیه آفلاتوکسین B₁ 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 ارگانسم‌های 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 میلی گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B₁ آزمایش کردند و بیان نمودند آفلاتوکسین B₁ در محدوده ۷۷ درصد بعد از ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تجزیه گردید. اخیراً دو نوع از باکتری‌ها برای تجزیه آفلاتوکسین B₁ 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 B₁ 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 اسپرژیلوس آواموریو پنسیلیوم کلاویفورم رامهار نموده و هم‌چنین رشد اسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B₁ را به‌صورت معنی‌داری کاهش دهد. هدف از این مطالعه بررسی کاهش اثرات سوء آفلاتوکسین B₁ 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 ۵/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفلاتوکسین B₁ و ۴، ۵ و ۶- جیره غذایی پایه آلوده با آفلاتوکسین B₁ (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌همراه سطوح مختلف افزودنی لاکتوباسیلوس ال بوچنری به‌ترتیب ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۲ نانوگرم در کیلوگرم جیره غذایی بودند.

جدول ۱: ترکیب جیره غذایی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی

اجزاء خوراکی	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		
اکسیدمنیزیم	۰/۰۹۶		
مخمّر	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

و همکاران (۲۰۱۵) تهیه شد. برای این منظور یک ویال سویه استاندارد و همکاران (۲۰۱۵) تهیه و در محیط آزمایشگاهی *Aspergillus Parasiticus* NRRL 2999 درون شیشه‌ای تحت شرایط استریل بر روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز آگار (potato dextrose agar) کشت گردید. سوسپانسیون اسپور قارچی حاوی $10^6 \times 6/5$ اسپور قارچی 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 B₁ 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 Hrudehy و Fedorak (۱۹۸۳) استفاده شد. در این روش ابتدا مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از هر ماده خوراکی آسیاب شده (۱ میلی‌متر) با دقت توزین و به‌داخل شیشه‌های سرم استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. برای هر نمونه ماده غذایی ۳ تکرار در نظر گرفته شد. مایع شکمبه ۲ ساعت بعد از وعده خوراک صبحگاهی از ۲ رأس 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 فلاسک 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 شکمبه و دو قسمت بافر) مخلوط شد. سپس سطوح مختلف آفلاتوکسین B₁ و لاکتوباسیلوس بوچنری به محتوی شیشه‌ها افزوده شد. به‌منظور تصحیح ماده خشک با منشاء مایع شکمبه تعداد ۳ عدد شیشه بدون آن که ماده غذایی ریخته شود و فقط دارای مایع شکمبه و بافر بودند در نظر 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 ۱۲۰ ساعت 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:

$$ME \text{ (MJ/kg DM)} = 2/2 + 0/136GP + 0/0057CP + 0/00286CF^2$$

$$NEL \text{ (MJ/kg DM)} = 0/54 + 0/096GP + 0/0038CP + 0/00173CF^2$$

$$DOMD \text{ (\%)} = 16/49 + 0/9042GP + 0/0492CP + 0/0387CA$$

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

$$SCFA \text{ (mmol/200 mg DM)} = 0/0222 GP - 0/00425$$

که در این رابطه 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

آماري 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. به‌طور کلی افزودن لاکتوباسیلوس سبب کاهش معنی‌داری گاز تولیدی گردید ($p < 0.05$). تیمار شاهد حاوی جیره پایه بدون افزودنی

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

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

شاهد: جیره غذایی پایه و A2، A1 به‌ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین B₁، L1، L2 و L3 به‌ترتیب ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری می‌باشد. میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشتک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$). هم‌چنین تیمارهای حاوی ۰/۱ 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 B₁ افزایش داد (جدول ۲)

فراسنجه‌های تخمینی تولید گاز پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۳ آورده شده است. در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین B₁ فراسنجه‌های تخمینی شامل انرژی متابولیسمی، انرژی خالص، میزان قابلیت هضم ماده الی در ماده خشک و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه



($p < 0.05$). پس از پایان ۱۲۰ ساعت 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 میکروگرم به طور معنی داری کاهش داد ($p < 0.05$). نتایج فراسنجه های تولید گاز حاصل از تخمیر آزمایشگاهی در جدول ۴ آورده شده است که با افزودن هر ۳ سطح لاکتوباسیل ال بوچنری ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم به جیره آلوده به ۱ میکروگرم آفلاتوکسین B₁ سبب افزایش معنی داری نرخ ثابت تولید

گاز نسبت به تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم آفلاتوکسین (A1 و A2) گردید ($p < 0.001$). پتانسیل تولید گاز تحت تاثیر افزودن لاکتوباسیلوس و آفلاتوکسین به طور قابل توجهی نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. تیمار ۰/۵ نانوگرم آفلاتوکسین (A1) پتانسیل تولید گاز بیش تری نسبت به سطوح مختلف ال بوچنری داشت در حالی که تیمار ۱ میکروگرم آفلاتوکسین (A2) پتانسیل تولید گاز کم تری نسبت به سطوح مختلف ال بوچنری از خود نشان داد.

جدول ۳: تاثیر لاکتوباسیلوس ال بوچنری بر قابلیت هضم، انرژی، فراسنجه های تخمیری و میزان pH تولید گاز به روش 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	۹/۵۳ ^b	۵/۶۹ ^b	۶۵/۶۳ ^c	۱/۱۸ ^b	۵/۳ ^c
L2	۹/۰۵ ^c	۵/۳۸ ^c	۶۳/۵۵ ^d	۱/۰۶ ^c	۵/۳ ^c
L3	۹/۵۵ ^b	۵/۷۵ ^b	۶۵/۹۴ ^b	۱/۱۸ ^b	۵/۳ ^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 به ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی لیتر آفلاتوکسین B₁، L1، L2 و L3 به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری می باشد. GP: تولید گاز (میلی لیتر 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): (میلی مول بر ۰/۲ گرم ماده خشک). میانگین های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($p < 0.05$).

جدول ۴: تاثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس ال بوچنری بر فراسنجه های تولید گاز در شرایط برون تنی

فراسنجه	شاهد	A1	A2	L1	L2	L3	SEM	P value	سطح معنی داری
b (میلی لیتر)	۴۳۱/۹۵ ^a	۳۹۶/۳۳ ^b	۳۹۱/۸۵ ^d	۳۸۷/۰۵ ^e	۳۷۰/۴۳ ^f	۳۹۴/۱۵ ^c	۰/۰۱۷	< ۰/۰۰۱	
c (میلی لیتر 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 به ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی لیتر آفلاتوکسین B₁، L1، L2 و L3 به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم لاکتوباسیلوس ال بوچنری می باشد. b- پتانسیل تولید گاز، c- نرخ ثابت تولید گاز. میانگین های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند.

بحث

امروزه آلودگی مواد غذایی با انواع مختلف قارچ های توکسینزا یکی از مشکلات جدی جامعه جهانی به شمار می آید. از این بین اسپرژیلوس فلاووس یکی از مهم ترین قارچ های توکسینزا است که به علت تولید آفلاتوکسین B₁ بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آفلاتوکسین B₁ از طریق خوردن یا استنشاق، به بدن وارد و با عبور از روده کوچک، جذب خون شده و سپس در بافت های مختلف از جمله کبد، ریه، کلیه، سیستم های ایمنی، تناسلی، عصبی و گوارشی تجمع پیدا می کند. میزان تجزیه پذیری آفلاتوکسین B₁ ممکن است

به دلیل نوع خوراک تغذیه شده حیواناتی که مایع شکمبه از آن گرفته می شود بستگی دارد (Jiang و همکاران، ۲۰۱۴). داده های مربوط به سمیت آفلاتوکسین ها نشان داد که آن ها دارای حلقه سیکلوپنتن و بخشی از فوران در ساختار شیمیایی خود می باشند در آفلاتوکسین B₁ حضور پیوند دوگانه در انتهای حلقه فوران عامل کلیدی فعالیت های سمی و سرطانزا است (Wang و همکاران، ۲۰۱۱). این مایکوتوکسین هم چنین در کبد تغلیظ گردیده و در نهایت سرطان کبد را به وجود می آورد (Parkin و همکاران، ۲۰۰۲). اخیراً مطالعات متعددی درباره فعالیت های ضدقارچی باکتری های اسیدلاکتیک و



تخمیر لاکتیکی مختلف توضیح داده می شود. این هیدرولیز کربوهیدرات ها با تولید اسیدهای الی همراه است و باعث کاهش pH می شود (Yao و همکاران، ۲۰۰۹). Santi و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند لاکتوباسیل ها و باکتری های تولیدکننده اسید لاکتیک می توانند آفلاتوکسین B₁ را از طریق تولید اسید در شرایط تخمیر آزمایشگاهی کاهش دهد. در آزمایش مشابهی به وسیله افزودن لاکتوباسیلوس ال فرمنتوم و ال برویس به سورگوم پس از ۶ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس کاهش pH را گزارش کردند (Muna و Asmahan، ۲۰۰۹).

در آزمایش حاضر تیمارهای حاوی ۰/۱ و ۰/۲ ال بوچنری در مقایسه با تیمارهای حاوی آفلاتوکسین سبب افزایش قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشک گردید که به دنبال 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، پراکسید هیدروژن، دی استیل و پپتیدهای زیست فعال از دلایل بروز اثرات ضدقارچی باکتری های اسید لاکتیکی به شمار می آید. در برخی منابع نیز فعالیت ضدقارچی باکتری های اسید لاکتیک به اثر سینرژیستی این ترکیبات نسبت داده می شود (Gerbaldo و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین باید در نظر داشت که جمعیت سلول باکتریایی، یکی از عوامل مؤثر در کاهش آفلاتوکسین B₁ است. لذا می بایست برای محافظت مصرف کنندگان در برابر آفلاتوکسین B₁، جمعیت مناسبی از آن را در رژیم غذایی مورد استفاده قرار داد.

Shetty و Jespersen (۲۰۰۶) و karimi و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند باکتری های اسید لاکتیک در حالت زنده و غیرزنده، توانایی کاهش انواعی از آفلاتوکسین را دارند. اتصال باکتری های اسید لاکتیک به مایکوتوکسین ها از طریق اتصال دیواره سلولی باکتری با این سموم صورت می گیرد. پپتیدوگلیکان باکتری با تمایل زیاد برای اتصال به ترکیبات خارجی باعث محافظت از باکتری در برابر آلودگی های خارجی می شود (Guan و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است لاکتوباسیل ها توانایی حذف آفلاتوکسین B₁ را دارند اما مکانیسم خاص سم زدایی به طور دقیق مشخص نشده است (Peltonen و همکاران، ۲۰۰۱؛ El-Nezami و همکاران، ۱۹۹۸). گونه لاکتوباسیل ها بیشترین ظرفیت برای تجزیه ترکیبات شیمیایی از طریق تولید آنزیم های خارج سلولی را دارد (Wu و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین گونه های باسیلوس تحمل بالایی در شرایط محیطی ناسازگار به ویژه در رطوبت و دمای بالا دارد از این رو پیشنهاد می شود توانایی بیش تر

امکان استفاده از آن ها به عنوان نگه دارنده های 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 میلی لیتر ال بوچنری در دمای ۳۹ درجه سلسیوس تا ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون به طور کلی اثر منفی آفلاتوکسین B₁ بر تخمیر شکمبه ای و تولید گاز را مهار کرد اما بعد از ۴۸ ساعت تفاوت بین تیمارها معنی دار نبود. چنین به نظر می رسد در طول ساعات اولیه انکوباسیون باکتری ها می توانند رشد و تکثیر کرده و جمعیت سلولی باکتری می توانند با حداکثر ظرفیت به آفلاتوکسین B₁ متصل شوند و چنین اتصال ای اثر منفی آفلاتوکسین بر تخمیر و تولید گاز را مهار می کند اما با تجزیه تدریجی پیوند غیر کوالانسی بین آفلاتوکسین B₁ و باکتری لاکتوباسیل در نهایت ظرفیت اتصال در ۷۲ ساعت از بین می رود به طوری که در آزمایش حاضر میزان تولید گاز با افزودن لاکتوباسیل در ۷۲ ساعت انکوباسیون و بعد از آن معنی دار نبود (Kasmani و همکاران، ۲۰۱۲). Huang و همکاران، (۲۰۱۷) گزارش کردند لاکتوباسیلوس پلانتروم C88 با قابلیت اتصال خوب به آفلاتوکسین B₁ در شرایط آزمایشگاهی به وسیله سیستم دفاعی و آنتی اکسیدانی می تواند سمیت آفلاتوکسین را کاهش دهد. در آزمایش مشابهی با ارزیابی ویژگی های لاکتوباسیلوس رامنوسوس L60 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم L23 دریافتند ضمن کاهش معنی دار رشد قارچ آسپرژیلوس، میزان آفلاتوکسین B₁ تولید شده را نیز به ترتیب ۹۹/۸-۵۹۷٪ و ۱۰۰-۲۷/۵٪ کاهش داد (Gerbaldo و همکاران، ۲۰۱۲). Khanafari و همکاران، (۲۰۰۷) و Magnussont و Schnürer، (۲۰۰۱) به ترتیب در مطالعاتی جداگانه، اثرات ضدقارچی لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس برویس را در شرایط تخمیر آزمایشگاهی نشان دادند که با یافته های این آزمایش مطابقت داشت. باکتری های اسید لاکتیکی با قابلیت تولید پپتیدهای ضدقارچی در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری زا و مولد فساد مؤثر می باشند (Galvez و همکاران، ۲۰۰۷).

افزودن سطوح ۰/۱، ۰/۱ و ۰/۲ نانوگرم ال بوچنری به جیره آلوده به آفلاتوکسین B₁ به طور معنی داری سبب کاهش pH در شرایط آزمایشگاهی گردید. در مطالعه مشابهی که بر روی سویه های مختلف لاکتوباسیل ها بر روی رشد آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B₁ در نان تخمیری ذرت انجام گرفت نتایج نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون رشد آسپرژیلوس به طور کلی مهار شده بود. لاکتوباسیل ال بوچنری و ال برویس پس از ۱۲۰ ساعت تخمیر به ترتیب ۴۵/۳٪ و ۴۳/۹٪ آفلاتوکسین B₁ را تجزیه کردند (Roger و همکاران، ۲۰۱۵). همچنین افزودن لاکتوباسیل ها pH را به طور معنی داری کاهش داد که با یافته های این آزمایش مطابقت دارد آن ها نشان دادند کاهش pH می تواند به وسیله هیدرولیز کربوهیدرات ها در نان تخمیری ذرت توسط



- 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 Miraboufathi, 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

برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زا و کاهش سمیت آفلاتوکسین B₁ 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 تأثیر معنی‌داری بر بهبود تخمیر شکمبه‌ای و تولید گاز نداشت. همچنین لاکتوباسیلوس‌ال‌بوچنری سبب افزایش قابلیت هضم شکمبه شد بنابراین توانایی مهار اثرات ضد هضمی آلودگی آفلاتوکسین B₁ در جیره‌گاوهای 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. تأثیر 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 kiswa, 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 Hrudef, S.E., 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in



- 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.

