ارزیابی سطوح آفلاتوکسین B_1 در جیره بر عملکرد و میزان فعالیت آنزیم های خون در جوجه های گوشتی

حسن نظری زاده ، جواد پوررضا

دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان، استاد دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده

به منظور بررسی اثر آفلاتوکسین B_1 در جیره بر عملکرد جوجه های گوشتی ، ازمایشی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ٤ تیمار و ٤ بلوک انجام شد. تعداد ۱۱۲ قطعه جوجه یک روزه گوشتی سویه راس به ١٦ گروه ۷ قطعه ای با میانگین وزنی یکسان تقسیم شدند. تیمار شامل سه سطح آفلاتوکسین B_1 در جیره (۰/۵، ۱/۰و ۱/۵ قسمت در میلیون) همراه با یک گروه شاهد (فاقد آفلاتوکسین) بود. وزن کشی به صورت هفتگی انجام شد. در سنین ۷، ١٤، ۲۱ و ۲۸ روزگی از هر واحد یک جوجه ضمن ایجاد یک برش در سیاه رگ گردنی جهت خونگیری ، کشته شد و اندام های مختلف به صورت جداگانه توزین گردید. وجود افلاتوکسین B_1در جیره به طور معنی داری سبب کاهش مصرف خوراک و اضافه وزن در سن ۲۸ روزگی گردید($p<۰/۰۵$). در هفته چهارم ، وزن کبد به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). وزن مغز در پایان هفته های اول و چهارم به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) تحت تاثیر تیمارقرار گرفت (در هفته اول کاهش و در هفته چهارم افزایش یافت). آفلاتوکسین B_1سبب افزایش فعالیت آنزیم های اسپارت امینوترانسفراز (AST) و الانین امینوترانسفراز (ALT) و کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در سرم گردید ($p<۰/۰۵$) . نتایج این پژوهش نشان داد که آفلاتوکسین B_1در کنار سایر اثرات منفی بر عملکرد ، می تواند دارای آثار مضر بر مغز جوجه های گوشتی باشد.

واژه های کلیدی : آفلاتوکسین B_1، عملکرد، آنزیم های خون ، وزن اندام های داخلی بدن ، جوجه گوشتی

مقدمه

افلاتوکسین ها از جمله مهم ترین مایکوتوکسین ها می باشند که به طور عمده توسط دو سویه قارچ اسپرژیلوس به نام های اسپرژیلوس فلاووس (Aspergillus flavus) و اسپرژیلوس پارازیتکوس (Aspergillus parasiticus) تولید می شوند (۱). قارچ های تولید کننده آفلاتوکسین ها روی مواد مختلف و تحت شرایط گوناگون رطوبت ، PH و درجه حرارت رشد و تکثیر می یابند. بیش از بیست مشتق آفلاتوکسینی وجود دارد و آفلاتوکسین B_1سمی ترین انهاست (۲). در طول ٤۰ سال گذشته تحقیقات وسیعی در جهت تعیین اثار سمی آفلاتوکسین ها بر انواع حیوانات آزمایشگاهی و مزرعه ای صورت گرفته است. از اثار اصلی آفلاتوکسین ها بر طیور به کاهش عملکرد ، اسیب به کبد ، اثرات منفی بر کیفیت لاشه و پوسته تخم مرغ ، سرکوب سیستم ایمنی و سرطان زایی اشاره شده است (۳). گزارش هایی مبنی بر تاثیر در افزایش وزن نسبی اندام هایی همچون کبد ، کلیه ، قلب ، پیش معده ، سنگدان ، طحال و پانکراس در جوجه های گوشتی وجود دارد (۳۱و٤). هم چنین مشخص شده که آفلاتوکسین ها می توانند فعالیت بعضی از آنزیم های موجود در سرم خون مانند اسپارتات امینوترانسفراز ، الانین امینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز را که مرتبط با تخریب سلولی

ناشی از آفلاتوکسیکوزیس هستند تحت تاثیر قرار دهند (٤). به نظر می رسد که آثار منفی آفلاتوکسین ها بر عملکرد جوجه های گوشتی ، هم به میزان آفلاتوکسین ها و به مدت زمان قرار گیری در معرض ان بستگی دارد (١). امروزه تمایل به شناخت اثرات حضورطولانی مدت سطوح پایین آفلاتوکسین ها در جیره حیوانات مزرعه ای بر عملکرد و تولیدات انها در حال افزایش است(٣). هدف از انجام این ازمایش ف بررسی اثر حضور چهار هفته ای سطوح پایین آفلاتوکسین ها B_1 در جیره غذایی ، بر عملکرد ، آنزیم های خونی و وزن بعضی از اندام های داخلی بدن در جوجه های گوشتی بود.

مواد و روش ها

تعداد ١١٢ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس از یک واحد جوجه کشی در محل خریداری شد. جوجه ها پس از ورود به سالن توزین شده و به ١٦ گروه ٧ قطعه ای با میانگین وزنی مشابه تقسیم شدند. گروه ها به صورت تصادفی به هر یک از ١٦ واحد یک قفس ٤ طبقه تخصیص یافتند. دسترسی به اب و غذا در طول دوره آزمایش آزاد بود. روشنایی سالن به صورت مداوم و توسط لامپ های حرارتی ٤٠ واتی تامین می شد. جهت تامین حرارت مورد نیاز سالن لز هیتر مجهز به ترموستات استفاده گردید. آفلاتوکسین مورد نیاز جهت انجام این آزمایش با استفاده از کپک آسپرژیلوس پارازیتیکوس PTCC 5286 (دانشگاه صنعتی اصفهان) و طبق روش شاتول و همکاران (٢٢) تولید شد. بیش از ٨٠ درصد لز آفلاتوکسین تولید شده توسط این کپک از نوع B_1 است (٢٠). قارچ فوق ابتدا روی محیط کشت potato dextrose agar کشت داده شد. سپس ، کشت به دست امده جهت تولید آفلاتوکسین به روی برنج استریل شده منتقل شد. جهت اندازه گیری غلظت آفلاتوکسین B_1، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مطابق دستورالعمل AOAC استفاده گردید (١). میزان فعالیت آنزیم های اسپارت امینوترانسفراز ، الانین امینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز موجود در سرم با استفاده از روش های رایج آزمایشگاهی تعیین گردید (٢).

دو نوع جیره آغازین و رشد برای دوره های صفر تا ٢٨ و ٢٨ تا ٤٢ روزگی با استفاده از جداول NRC به گونه ای متعادل گردید که کلیه احتیاجات را بر اساس توصیه NRC (١٨) تامین نمود . تیمارها شامل سه سطح آفلاتوکسین در جیره (٠/٥ ، ١/٠ و١/٥ میلی گرم در کیلوگرم) همراه با یک گروه شاهد (فاقد آفلاتوکسین) بود. جهت به دست آوردن غلظت های مورد نظر آفلاتوکسین در جیره ، مقدار مناسب از مخلوط حاصل از کشت آفلاتوکسین بر روی برنج ، جایگزین ارد برنج در جیره پایه گردید. اعمال تیمار از روز صفر تا روز ٢٨ انجام شد و از روز ٢٨ تا روز ٤٢ کلیه گروه ها جیره رشد فاقد آفلاتوکسین دریافت کردند. وزن کشی به صورت هفتگی انجام شد. به منظور به حداقل رسانیدن اثر وزن محتویات دستگاه گوارش ، ٤ ساعت قبل از هر وزن کشی مصرف خوراک قطع گردید. در زمان اعمال گرسنگی ٤ ساعته ، مقدار غذای باقی مانده هر گروه اندازه گیری و برای تعیین غذای مصرفی هفتگی استفاده شد.در سنین ١٤ ،٢١ و ٢٨ روزگی از هر تکرار یک جوجه با شرایط نزدیک میانگین گروه انتخاب و پس از توزین ، ضمن ایجاد برش در سیاهرگ گردنی جهت خون گیری ف کشته شد.پس از باز نمودن حفره شکمی ، اندام های مختلف شامل قلب ، کبد ، سنگدان ، پیش معده ، دئودنوم به همراه پانکراس ، طحال ،بورس فابریسیوس و مغز خارج شده و به صورت جداگانه توزین شدند.آزمایش در قالب یک طرح بلوک های کامل تصادفی دارای ٤ تیمار و ٤ بلوک انجام شد. بلوک ها شامل طبقات ١ تا ٤ یک قفس چهار طبقه بود که از نظر ارتفاع از سطح زمین با یکدیگر متفاوت بودند. در هر طبقه ٤ واحد مجزا با آب خوری و دان خوری جداگانه وجود داشت.جهت تجزیه و تحلیل آماری داده ها از روش مدل

های خطی عمومی (GLM) نرم افزار SAS استفاده شد. میانگین ها نیز با استفاده ها از آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شدند (٤).

نتایج

نتایج مربوط به مصرف خوراک ، افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل در جوجه های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف آفلاتوکسین B_1در جیره ، نشان دهنده اسنست که تغذیه آفلاتوکسین B_1در سطح ۱/۵ قسمت در میلیون ، منجر به کاهش معنی دار($p<۰/۰۵$) مصرف خوراک و افزایش وزن در دوره صفر تا ۲۸ روزگی گردید. تفاوت بین تیمارها برای مصرف خوراک و افزایش وزن از سن ۲۸ تا ٤۲ روزگی (زمان دریافت جیره فاقد آفلاتوکسین) معنی دار نبود. هنگام در نظر گرفتن کل دوره (صفر تا ٤۲ روزگی)، مصرف خوراک در گروه مصرف کننده آفلاتوکسین B_1در سطح ۱/۵ قسمت در میلیون ، به طور معنی داری کمتر از سایر گروه ها بود ($p<۰/۰۵$). این کاهش در مصرف خوراک نتوانست میزان افزایش وزن در این دوره را تحت تاثیر قرار دهد. هیچ گونه تفاوت معنی داری در ضریب تبدیل به دست آمده برای تیمارهای مختلف در دوره های صفر تا ۲۸ و صفر تا ٤۲ روزگی مشاهده نشد. در عین حال ، مصرف آفلاتوکسین B_1در سطح ۱/۵ قسمت در میلیون منجر به بهبود معنب دار ضریب تبدیل در دوره ۲۸ تا ٤۲ روزگی گردید ($p<$ ۰/۰۵). وزن نسبی کبد و مغز (گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در سنین ۷ و ۲۸ روزگی در جدول ۳ نشان داده شده است. تغذیه آفلاتوکسین B_1در سطح ۱/۵ قسمت در میلیون ، منجر به افزایش معنی دار وزن نسبی کبد و مغز در سن ۲۸ روزگی گردید ($p<۰/۰۵$). آفلاتوکسین B_1اثر معنی داری بر وزن نسبی کبد در سن ۷ روزگی نداشت ولی سطح ۱/۵ قسمت در میلیون ، منجر به کاهش وزن نسبی مغز در این سن گردید ($p<۰/۰۵$). اثر سطوح مختلف آفلاتوکسین B_1در جیره بر وزن نسبی پیش معده ، سنگدان ، دئودنوم به همراه پانکراس ، قلب ، طحال و بورس فابریسیوس معنی دار نبود (اعداد نشان داده نشده اند). تغییرات ایجاد شده در فعالیت آنزیم های ALT ، AST وLDH سرم در نتیجه داخل کردن آفلاتوکسین B_1درجیره ، در جدول ٤ نشان داده شده است. حضور آفلاتوکسین B_1 در جیره در سطح ۱/۵ قسمت در میلیون سبب افزایش فعالیت آنزیم های سرمی ALT ، AST در سن ۲۱ روزگی گردید ($p<$ ۰/۰۵). افزودن آفلاتوکسین B_1به جیره غذایی در سطح ۱/۲ قسمت در میلیون منجر به کاهش معنی دار فعالیت سرمی آنزیم LDH در اواخر هفته های اول و چهارم گردید.

بحث

کاهش در مصرف خوراک و افزایش وزن مشاهده شده در این آزمایش با نتایج گزارش شده توسط تیدیسکو و همکاران در استفاده از سطح ۱/۰ قسمت در میلیون آفلاتوکسین B_1و همچنین نتایج لیدوکس و همکاران هنگام استفاده از سطح ٤ قسمت در میلیون آفلاتوکسین B_1، همخوانی دارد ، ولی نتایج گزارش شده توسط ادرینگتون و همکاران مبنی بر عدم تحت تاثیر قرار گرفتن مصرف خوراک را تایید نمی کند. در سجانت لی و همکاران در مرور خود ، اثرات سطوح پایین آفلاتوکسین ها در جیره غذایی طیور گوشتی را مورد توجه قرار داده و بیان داشته اند که کاهش رشد ناشی از حضور آفلاتوکسین در جیره می تواند هم با کاهش مصرف خوراک و هم با کاهش بازدهی تبدیل خوراک در ارتباط باشد. در این آزمایش ضریب تبدیل خوراک تحت تاثیر تیمار قرار نگرفت که مشابه با نتایج گزارش شده توسط ادرینگتون و همکاران بوده ولی یافته روزا و همکاران را تایید نمی کند. به نظر می رسد کبد اولین اندامی است که تحت تاثیر

مسمومیت با آفلاتوکسین قرار می گیرد. افزایش وزن نسبی کبد در نتیجه مصرف آفلاتوکسین توسط کوبنا و همکاران و هاف و همکاران نیز گزارش شده است. یکی از دلایل این افزایش در وزن نسبی کبد می تواند به خاطر تجمع چربی در کبد باشد. در آزمایش اخیر وزن نسبی مغز در نتیجه مصرف آفلاتوکسین B_1در سطح ۱/۵ قسمت در میلیون ، در سن ۷ روزگی (۷ روز پس از اعمال تیمار) افزایش معنی داری را نشان داد. در ارتباط با اثر آفلاتوکسین ها بر بافت عصبی و مغز جوجه های گوشتی اطلاعات چندانی در دست نیست. به طور کلی پیشنهاد شده که آفلاتوکسین ها خود به تنهایی قادر به ایجاد ضایعات عصبی نمی باشد. گرچه بیش از ۸۰ درصد آفلاتوکسین تولیدی توسط کپک آسپرژیلوس پارازیتیکوس از نوع B_1می باشد ، احتمال حضور سایر مایکوتوکسین ها در مخلوط کشت این کپک بعید نیست. سیکلوپیازونیک اسید از جمله مایکوتوکسین هایی است که توسط بسیاری از از گونه های آسپرژیلوس تولید می شود و می تواند سبب ایجاد ضایعات عصبی گردد. هم چنین در نمونه تولیدی آفلاتوکسین B_1برای این آزمایش ، حضور مقادیر بسیار کم آفلاتوکسین B_2 ، G_1 ، و G_2 نیز توسط آزمایشگاه تایید شد که می تواند بعضی از نتایج این آزمایشرا توجیه کند. لذا تغییرات مشاهده شده در وزن نسبی مغز در این ازمایش ، ممکن است در ارتباط با مایکوتوکسین های دیگر غیر از آفلاتوکسین B_1باشد که در کشت آسپرژیلوس پارازیتیکوس وجود داشته اند. در عین حال ، به منظور درک بهتر آفلاتوکسین ها بر بافت عصبی و مغز در جوحه های گوشتی ، به تحقیقات بیشتری نیاز است.

افزایش فعالیت آنزیم های AST ،ALT در نتیجه افزودن آفلاتوکسین B_1به جیره ، توسط دافلا و همکارن نیز گزارش شده است. در مقابل ادرینگتون و همکاران هنگام افزودن آفلاتوکسین به جیره ، تغییری در فعالیت آنزیم های AST وALT مشاهده نکردند. به طور کلی ، AST وALT آنزیم هایی هستند که مختص پلاسما (سرم) نبوده ، بلکه بیشتر درون سلول ها وجود دارند و در اثر اسیب دیدن سلول ها وارد پلاسما می شوند. یکی از دلایل افزایش فعالیت آنزیم های AST وALT مشاهده شده در این آزمایش ، می تواند آسیب به هپاتوسیت ها باشد. LDH در همه بافت های بدن وجود دارد و مختص کبد نیست. در این آزمایش آفلاتوکسین B_1سبب کاهش معنی دار فعالیت آنزیم LDH در سرم گردید. هاف و همکاران نیز کاهش LDH را در نتیجه افزودن آفلاتوکسین به جیره گزارش کرده اند. از سوی دیگر کویست و همکاران و ادرینگتون و همکاران هیچ گونه تغییر معنی داری در فعالیت آنزیم LDH ، ناشی از افزودن آفلاتوکسین به جیره مشاهده نکردند.

منابع مورد استفاده

1. AOAC. Official Method 999.07 (2000). Aflatoxins and total aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder. Immunoaffinity column- Liquid chromatography whit post-column derivatization. First action 1999. J . AOAC Int. 83:320.
2. Bryden , W.L.1994 Neuromycotoxicoses in Australia. PP. 363-368. In : S. M. Colegate and P.R.Dorling (Eds.), Plant-Associated Tixins. CAB International, Wallingford, UK.
3. Charmley, L . L ., H . L . Trenholm and D . B . Prelusky. 1995. Mycotoxins : their origin , impact and importance: insight into common methods of control and elimination. PP.41-63 In: T Lyons and K . A Jacques (Eds.), Biotechnology in the feed industry. Proceedings of alltech's 11 annual symposium.
4. cole, R.J. 1986. Etiology of Turkey-*X* disease in retrospect: a case for involvement of cyclopiazonic acid. Mycotoxin Res. 2: 3-7.