مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۳، ۳۰۹-۳۰۳
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.127339.2319

بررسی تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر سمیت زدایی آفلاتوکسین B۱ در شرایط برون تنی

رضا کاراژیان[۱*] ایرج شاکر شیدا[۲] معصومه مهربان سنگ آتش[۱] فائزه تجلی[۳] محسن مجتهدی[۴] محمد صادق[۵]

۱) گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد، ایران
۲) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۳) گروه پژوهشی پزشکی و مولکولی، دانشکده کشاورزی جهاد دانشگاهی مشهد، ایران
۴) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، ایران
۵) شرکت ژرف اندیشان فاخر، مشهد، ایران

(دریافت مقاله: ۳ بهمن ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۳ اردیبهشت ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه ناشی از رشد کپک‌ها در خوراک دام می‌باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک میکروارگانیسم‌هایی می‌باشند که توانایی جذب آفلاتوکسین‌ها را دارند. **هدف:** در این تحقیق تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس گونه PTCC (۱۶۳۷) بر سمیت زدایی و جذب توکسین آفلاتوکسین B۱ در شرایط in vitro (محیط شکمبه گاو) بررسی گردید. **روش کار:** به این منظور از باکتری مورد نظر تیمارهای مختلف (زنده، تیمار شده با اتوکلاو، تیمار شده با حرارت ۱۰۰ °C و تیمار شده با اسید) تهیه شد و به محیط شکمبه گاو افزوده شد. سم آفلاتوکسین B۱ در مقادیر مختلف (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰) ppb نیز به محیط شکمبه افزوده شدند و در زمان‌های یک و دو ساعت در دمای ۳۷ °C اینکوباتور گذاری شدند. سپس میزان سم باقیمانده در محیط توسط روش الایزا اندازه گیری شد. **نتایج:** نتایج نشان داد که میکروارگانیسم یاد شده در حالت تیمار اتوکلاو شده بیشترین میزان حذف سم را دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین با افزایش زمان اینکوباسیون میزان جذب سم به طور معنی‌داری (۷۸٪) افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$) و با افزایش غلظت سم در محیط کشت توانایی باکتری در جذب سم افزایش می‌یابد. **نتیجه گیری نهایی:** به عنوان یک راهکار در صنعت خوراک دام استفاده از دیواره سلولی باکتری و یا ترکیبات آن می‌تواند برای کاهش سم آفلاتوکسین B۱ مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین B۱، محیط شکمبه، سمیت زدایی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس

مقدمه

از آنجایی که شیر و فراورده‌های آن به عنوان یکی از سالم‌ترین و پرمصرف‌ترین فراورده‌های غذایی برای انسان خصوصاً کودکان و نوجوانان و افراد سالخورده مطرح می‌باشد حضور آفلاتوکسین M۱ در این فراورده‌ها در مقادیر بالاتر از حد استاندارد، برای مصرف کننده مخاطره آمیز است (۱۳). آفلاتوکسین M۱ متابولیت هیدروکسیله شده آفلاتوکسین B۱ می‌باشد که در شیر حیوانات شیرده که از خوراک آلوده به آفلاتوکسین B۱ مصرف کرده‌اند وجود دارد. از آنجا که پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و فرآوری شیر بر بقا و کاهش سمیت آفلاتوکسین M۱ تأثیر زیادی ندارد، این توکسین سرانجام به فرآورده‌های مختلف شیر انتقال می‌یابد و سلامت مصرف کنندگان به خطر می‌اندازد. برای غیرفعال کردن و یا کاهش میزان سم آفلاتوکسین روش‌های زیادی مطالعه شده اند که مهمترین آن‌ها جداسازی فیزیکی، غیر فعال کردن توسط حرارت، پرتونگاری، استخراج توسط حلال و تخریب شیمیایی هستند (۴). روش‌های فوق تا حدودی قادر به غیرفعال سازی و کاهش آفلاتوکسین‌ها می‌باشند اما عمدتاً بدلیل ایجاد باقیمانده‌ها (کاهش میزان ایمنی) و کاهش کیفیت مواد غذایی، روش‌هایی عملی و قابل قبول نبوده‌اند. در حال حاضر به دلیل ابهامات موجود جهت جذب مواد مغذی موجود در دستگاه گوارش توسط جاذب‌های سیلیکاتی و کربن فعال (در مقادیر بالای مصرف) باعث روی آوردن گروهی از محققان به جاذب‌های مخمری و لاکتوباسیلی گردیده است (۴).

برخی از محققان در این زمینه معتقدند که بهترین راه حل برای حذف آلودگی، از بین بردن و یا کاهش سم توسط موجودات زنده می‌باشد که امکان حذف مایکوتوکسین‌ها را تحت شرایط ملایم، بدون استفاده از مواد شیمیایی مضر و از دست دادن ارزش تغذیه‌ای خوراک دام آلودگی زدایی شده فراهم می‌سازد (۴). در این خصوص باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها نقش مهمی را ایفا می‌کنند.

جمعیت میکروبی شکمبه از سه بخش اصلی باکتری‌ها، پروتوزوا و قارچ‌ها تشکیل شده‌اند. امروزه تعداد گونه‌های باکتری‌های شناسایی شده بیش از ۲۰۰ گونه باکتری می‌باشد. تعداد کمی از باکتری‌های شکمبه بی هوازی کامل هستند اما اکثراً جمعیت باکتری شکمبه بصورت بی هوازی اختیاری می‌باشند و قادرند که درحضور اکسیژن (بخصوص اکسیژن حاصل از ورود بزاق به شکمبه) به فعالیت خود ادامه دهند. با توجه به خصوصیات مواد خوراکی تغذیه شده، فعالیت و محصولات تولید شده توسط این باکتری‌ها متفاوت می‌باشد. تعداد باکتری‌ها درحدود $۱۰^{۹}$ cell/ml تا $۱۰^{۱۰}$ cell/ml ازمحتویات شکمبه می‌باشد. مجموعه میکروب‌های شکمبه باعث

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۳۲۳۶۰ نمابر: ۰۵۱-۳۸۸۴۱۳۶۵ Email: reza_karazhyan2002@yahoo.com

هضـم مواد غیر قابل هضم توسـط حیوان وتولید مواد قابل جذب توسـط حیوان می‌گردد. هر بخشی از مواد مغذی موجود در منابع خوراکی بصورت ویژه مورد هضم میکروبی قرار می‌گیرند (۱۰).

در این راستا، تحقیقاتی بـر گونـه‌هـای باکتری‌هـای اسید لاکتیـک انجام شده است. از گونـه‌هـای باکتریـایی مـی‌تـوان بـه لاکتوباسـیلوس رامنوسـوس جی جی، مایکروباکتریوم‌ها، کورینه باکتریوم‌ها، ردوکوکوس اریتروپولیس، لاکتوباسـیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس سویه LC۷۰۵ و بیفیدوباکتریوم‌ها اشـاره کرد. برخی از باکتری‌هـا از جمله ردوکوکـوس، نوکاردیـا و مایکوبـاکتریوم‌هـا قادرنـد آفلاتوکسین را بوسیله فعالیت آنزیمی تخریب نمایند. اما برخی گونه‌های دیگر مانند باکتری‌های لاکتوباسـیلوس، آفلاتوکسین موجود در محیط را براساس پدیده اتصال به دیـواره سـلولی کـاهش مـی دهنـد. سازوکار کاهش میزان آفلاتوکسین بوسیله روش‌های میکروبـی هنـوز کاملاً واضح و روشن نیست. غلظت‌های باکتریایی بالاتراز 10^9 cell/ml جهت کاهش موثر آفلاتوکسـین B۱ لازم اسـت. تعـداد کل مولکول‌هـایی که می‌توانند بـه یـک بـاکتری زنـده متـصل شوند بیشـتر از ۱۰۷ تخمین زده شده است (۳، ۹، ۲۱) .

مواد و روش کار

تهیه وآماده‌سازی سوش‌های میکروبی: باکتری لیوفلیزه لاکتوباسیلوس رامنوسوس (PTCC۱۶۳۷) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش کلکسـیون میکروبی خریداری شد و مطابق دستورالعمل در محیط کشـت استریل MRS Broth (مرک) فعال شد. سوسپانسیون حاصله را در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت در اینکوباتور قرار داده شد.

لازم به ذکر اسـت علاوه بر تعیین کدورت سوسپانسیون باکتریایی با اسپکتروفتومتر، میزان رشـد باکتری و تعداد آن‌ها، با استفاده از لام نئوبار و نیز شـمارش پلیت استاندارد به کمک محیط کشت MRS آگار محاسبه گردید (۱،۲،۱۱،۱۷). تعداد سلول‌های باکتری در این تحقیق برای افزودن به محیط شکمبه 10^9 cell/gr می‌باشد.

آماده سـازی محیط شـکمبه دام: محیط شکمبه مورد استفاده در این آزمایشات، قبل از خوراک دهی صبح و از شکمبه ۴ عدد گوساله نر فیستولا شده نژاد هلشتاین که تحت رژیم بر پایه مواد خشبی و علوفه ای می‌باشند تهیه شـد. محیط شکمبه از میان چهار لایه پارچه کرباس عبور داده شد و صاف گردید. سپس در فلاسک آب با دمای ۴۰ °C بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شـد. محیط با سـانتریفوژ بـا دور ۶۰۰۰ rpm به مـدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد (۲۲) و از مایع رویی در حجم‌های مساوی به کرایوتیوب‌های استریل منتقل کرده و تیمارهای مختلف باکتری در مقدار (10^9cell/gr) به محیط شکمبه گاو اضافه شدند و سپس غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ ppb) به آن اضافه شدند.

تهیه محلول‌های آفلاتوکسـین B۱: پودر آفلاتوکسـین B۱ از شرکت سـیگمای آلمان خریداری شـد. سپس با استفاده از اسـتونیتریل محلول مـادری با غلظت ۱۰۰μg/l تهیه گردید. به منظـور آلوده کردن نمونه‌های مایع شـکمبه، محلول‌های آفلاتوکسـین B۱ با غلظت‌های ۵ ppb، ۱۰ و ۲۰ تهیه شد (۲۳).

آمـاده سـازی تیمارهـای لاکتوباسـیلوس رامنوسـوس (باکتـری لاکتوباسـیلوس رامنوسوس در تیمارهای مختلف شـامل): باکتری زنده و فعال، باکتری حرارت دیـده (۱۰۰ °c به مدت ۳۰ دقیقه)، باکتری اتوکلاو شـده و باکتری تحت تیمار اسیدی تهیه شـده و در مقدار 10^9 cell/gr به محیط شکمبه اضافه شد.

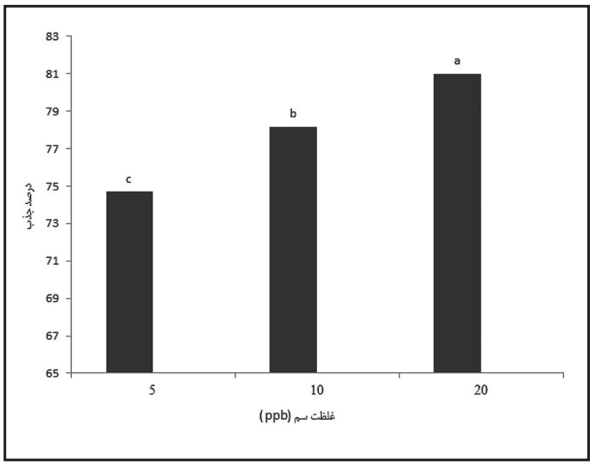
اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین B۱: میزان سم باقیمانده در محیط در زمان‌های ۱ و ۲ سـاعت انکوباسیون توسط روش الایزا با استفاده از کیت یوروپروکسـیما (Europroxima) به شماره کاتالوگ ۵۱۲۱AFB ساخت کشور هلند اندازه گیری شد.

اصول الایزای آفلاتوکسین B۱: جهت تعیین آفلاتوکسین متصل نشده از کیت الایزا ۹۶ تایی آفلاتوکسین B۱ یوروپروکسیما (Europroxima) ساخت کشور آلمان استفاده شد که یک روش ایمونوآسی آنزیم رقابتی و بر پایه واکنش آنتی ژن آنتی بادی اسـت .چاهک‌های میکروتیتر با آنتی بادی بر علیه آفلاتوکسین B۱ استاندارد یا نمونه‌های مورد بررسی، پوشانده شـده اند. با اضافه کردن آفلاتوکسـین B۱ یا نمونـه آنتی بادی‌ها به طور نسـبی بر اساس غلظت آفلاتوکسین موجود در نمونه متصل می‌شوند .هر مکان خالی باقی مانده در مرحله بعد به وسیله توکسین لیبل شده با آنزیم کونژوگه پر می‌شوند. سپس سوبسترای آنزیم کروموژن به چاهک‌ها اضافه شد .واکنش پس از طی دوره گرمخانه گذاری با اضافه کردن عوامل متوقف کننده متوقف می‌شـود .تغییر رنگ آبی به زرد در دسـتگاه الایزا ریدر و در طول موج ۴۵۰ nm ارزیابی و تعیین گردید.

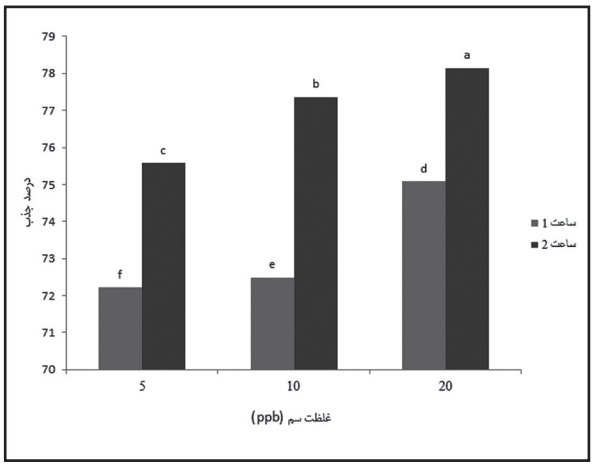
آنالیـز آماری: این پژوهش در مرحلـه in vitro در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سـه تکرار انجام شـد. فاکتورهای لحاظ شده شامل آفلاتوکسین B۱ در ۴ سطح و ۲ زمان مختلف اینکوباسیون و باکتری در ۴ سطح (شـاهد، باکتری زنده، باکتری اتوکلاو شده و باکتری اسیدی) در محیط شکمبه انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری MSTAT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بر اسـاس آن نمودارها بوسیله نرم افزار EXCEL رسم گردید.

نتایج

همانطور که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود باکتری درحالت اتوکلاو شده بیشـترین تأثیر را در جذب آفلاتوکسین B۱ از محیط شکمبه داشته است (۸۲/۶٪) و پس از آن حالت حرارت دیده میکروارگانیسـم دارای بیشـترین تأثیر (۷۹/۹٪) در حذف سم می‌باشد. سایر حالت‌های میکروارگانیسم که بر روی سم مؤثر هستند به ترتیب تیمارهای اسیدی شده و تیمار باکتری زنده



تصویر ۱. اثر غلظت سم در جذب آفلاتوکسین B۱ به وسیله لاکتوباسیلوس رامنوسوس.

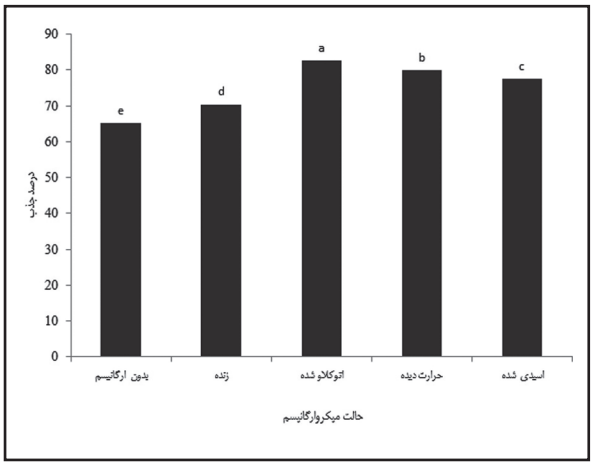


تصویر ۳. اثر غلظت آفلاتوکسین B۱ و زمان اینکوباسیون در کاهش آفلاتوکسین B۱ در روده.

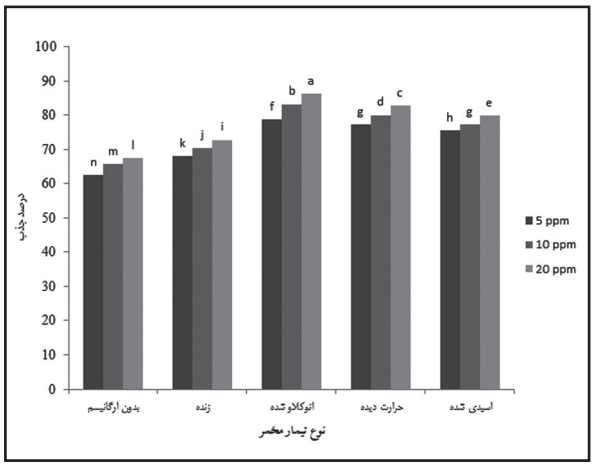
هستند و این اختلاف در جذب سم در حالت‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها معنی‌دار می‌باشد.

همانطور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سم آفلاتوکسین B۱ میزان جذب سم توسط میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق افزایش پیدا می‌کند به طوری که غلظت ۲۵۰ ppb بیشترین میزان جذب را داشته است. در طول مدت اینکوباسیون محیط شکمبه مشاهده می‌شود که در ساعت دوم اینکوباسیون میزان جذب سم در غلظت‌های مختلف افزایش معنی‌داری داشته است و با افزایش میزان غلظت سم مقدار سم جذب شده روند صعودی دارد.

در تصویر ۳ اثر متقابل تیمارهای میکروارگانیسم‌ها و غلظت سم بر روی میزان جذب سم نشان داده شده است. همان طور که از شکل هم پیداست تیمار اتوکلاو شده باکتری دارای بیشترین تأثیر در جذب سم از محیط شکمبه می‌باشد و با افزایش غلظت سم قدرت جذب سم توسط میکروارگانیسم‌ها نیز افزایش می‌یابد که در شکل‌های قبل هم اشاره شد و تیمار زنده میکروارگانیسم‌ها کمترین قابلیت جذب را نشان داده اند.



تصویر ۲. اثر تیمار لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر جذب آفلاتوکسین B۱ در روده.



تصویر ۴. اثر تیمار لاکتوباسیلوس رامنوسوس و غلظت سم در کاهش آفلاتوکسین B۱.

بحث

در این تحقیق هدف بررسی اثر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر حذف سم آفلاتوکسین B۱ از محیط شکمبه دام می‌باشد. اندازه گیری میزان آفلاتوکسین B۱ توسط روش الایزا انجام شد. یافته‌های این تحقیق بیان کننده این مطلب است که سلول‌های میکروارگانیسم‌ها به دلیل وجود ترکیبات دیواره سلولی شان توانایی جذب سموم را دارند. سلول‌های کشته شده میکروارگانیسم‌ها در جذب سم مؤثر تر می‌باشند.

غلظت‌های مختلف سم اختلاف معنی‌داری در کاهش سم دارند، همچنین براساس نتایج گزارش شده توسط El-Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۸ مقدار سم جذب شده با افزایش میزان غلظت سم در محیط افزایش یافته است ولی این میزان جذب در مقادیر مختلف سم معنی‌دار نبوده است (۸). همچنین Pizzolitto و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازیی به ترتیب بهترین جذب کننده‌های سم در غلظت‌های ۵۰ ng/ml، ۱۰۰ و ۵۰۰ هستند (۱۹). همچنین Rahnama Vosough و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که بیشترین مقدار جذب در کمترین و بیشترین

میزان سم (۵ µg/l و ۲۰) بوده است(۲۱). Line و Brackett در سال ۱۹۹۵ و Ciegler و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز اظهار داشتند با افزایش مقدار توکسین درصد حذف آفلاتوکسین B۱ کاهش یافته است (۵،۱۴). مطالعات El-Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۸ بر خلاف این یافته‌ها بود که بیان کردند مقدار آفلاتوکسین B۱ حذف شده با افزایش غلظت سم افزایش پیدا کرد اما درصد حذف تفاوت عمده‌ای نداشت (۶).

میکروارگانیسم درحالت اتوکلاو شده بیشترین تأثیر را در جذب آفلاتوکسین B۱ از محیط شکمبه داشته است (۸۲/۶٪) و پس از آن حالت حرارت دیده میکروارگانیسم دارای بیشترین تأثیر (۷۹/۹ ٪) در حذف سم می‌باشد. سایر حالت‌های میکروارگانیسم که بر روی سم مؤثر هستند به ترتیب تیمارهای اسیدی شده و تیمار باکتری زنده هستند و این اختلاف در جذب سم در حالت‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها معنی‌دار می‌باشد. بر طبق نظر El-Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۸ و Thyagaraja در سال ۱۹۹۴ مکانیسم حذف آفلاتوکسین B۱ توسط باکتری‌های اسید لاکتیک اشاره از طریق باند شدن آفلاتوکسین B۱ به دیواره سلولی یا اجزای دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد و این روش بیش از تجزیه متابولیکی آن‌ها است و این بر پایه مشاهداتی است که بیان می‌کنند زنده بودن باکتری شرط لازم برای حذف آفلاتوکسین B۱ نیست (۶،۲۷). یافته‌های Haskard و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داد اعمال بعضی از تیمارها (اسیدی و حرارتی) روی باکتری‌ها باعث افزایش عمده ای در توانایی باند شدن آفلاتوکسین B۱ توسط باکتری‌ها می‌شوند (۱۱). همچنین Haskard و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG و LC۷۰۵ آفلاتوکسین B۱ را با بیشترین کارایی حذف کردند و باکتری‌های غیر زنده (کشته شده با حرارت یا اسید) دارای بیشترین میزان اتصال آفلاتوکسین B۱ به خود را داشتند و کمپلکس‌های ایجاد شده از پایداری بیشتری برخوردار بودند (۱۲).

در تناقض با این یافته‌ها Gratz و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که باکتری‌های زنده بیشتر از باکتری‌های کشته شده با حرارت موتاژن‌های غذایی (از جمله آفلاتوکسین B۱) را باند می‌کنند (۱۰).

Rahnama Vosough و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس کشته شده در اثر حرارت دارای اثر جذب کنندگی بالایی است اما بیشترین تأثیر در حذف سم از باکتری تیمار شده با اسید به میزان ۴۹/۶۲٪ دیده شده است (۲۱). El-Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۸ و Thyagaraja و همکاران در سال ۱۹۹۴ نیز گزارش کردند که باکتری تیمار شده حرارتی در جذب آفلاتوکسین B۱ از محیط کشت بیشترین اثر را داشته است (۶،۲۷)، همچنین Haskard و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که تیمار حرارتی و اسیدی باکتری توانایی لاکتوباسیلوس رامنوسوس را در جذب آفلاتوکسین B۱ از محیط کشت افزایش می‌دهد (۱۲). در مطالعه دیگری El-Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که توانایی جذب در اثر تیمار اسیدی باکتری در محلول بافر فسفات به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است (۶).

حرارت دادن باعث دناتوراسیون پروتئین‌ها یا تشکیل محصولات واکنش مایلارد در دیواره سلولی شده و یا با انحلال بعضی از مانوپروتئین‌های موجود در دیواره سلولی نفوذپذیری دیواره افزایش یافته و منجر به افزایش دسترسی مکان‌های مخفی دیواره سلولی می‌شود.

با افزایش زمان اینکوباسیون یا ماندگاری باکتری در محیط شکمبه میزان جذب توکسین به طور معنی‌داری افزایش یافته است. Rahnama Vosough و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که با افزایش زمان اینکوباسیون لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط کشت میزان جذب آفلاتوکسین افزایش یافته و این اثر حذف تا زمان ۱۲ ساعت اینکوباسیون معنی‌دار است (۲۰). همچنین Peltonen و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که جذب آفلاتوکسین B۱ توسط لاکتوباسیلوس آمیلوورانس با افزایش زمان اینکوباسیون به مدت ۷۲ ساعت تا ۷۳٪ افزایش یافته است (۱۸). El-Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش کردند که میزان آفلاتوکسین باند شده پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون لاکتوباسیلوس رامنوسوس سویه LC به طور قابل ملاحظه ای در مقایسه با زمان اولیه کاهش یافته است (۱۷).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق بیان کننده این مطلب است که سلول‌های میکروارگانیسم‌ها به دلیل وجود ترکیبات دیواره سلولی شان توانایی جذب سموم را دارند. سلول‌های کشته شده میکروارگانیسم‌ها در جذب سم مؤثر تر می‌باشند. می‌توان از سلول کشته شده باکتری برای جذب و حذف سموم استفاده کرد و حتی می‌توان دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها را جداسازی کرده و از آن جهت حذف و کاهش سم استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی مشهد و همچنین شرکت ژرف اندیشان فاخر به خاطر حمایت مالی در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Alberts, J. F., Engelbrecht, Y., Steyn, P. S., Holzapfel, W. H. (2006) Biological degradation of aflatoxin B1 by Rhodococcus erythropolis cultures. Int J Food Microbiol. 109: 121-129.
2. Atroshi, F., Rizzo, A., Westermarck, T., Ali-Vehmas, T. (2002) Antioxidant nutrients and Mycotoxin. Toxicology. 180:151-167.
3. Bata, A., Lasztity, R. (1999) Detoxification of Mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. Trends food Sci Tech. 10:223-228.

4. Battacone, G., Nudda, A., Palomba M., Mazzette, A., Pulina, G. (2009) The transfer of aflatoxin M1 in milk ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. J Dairy Sci. 92: 4997
5. Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E., Hall, H. H. (1996) Microbial detoxification of aflatoxin. Apll Microbiol. 14: 934-939.
6. El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998) Physico-chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. Food Prot. 61: 466-468.
7. El-Nezami, H., Mykkanen, H., Haskard, C. (2004) Lactic acid bacteria as a tool for enhancing food safety by removal of dietary toxins. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 139: 397-406.
8. Gbassi, G.K., Vandamme T., Yolou, F.S., Marchioni, E. (2011) In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated Lactobacillus plantarum strains in a gastrointestinal tract model. Int Dairy J. 21: 97-102.
9. Gratz, S. (2007) Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in caco-2 Cells. Appl Environ Microbiol. 73: 3958-3964.
10. Khanafari, A., Soudi, H., Miraboulfathi, M. (2007) Biocontrol of Aspergillus Flavus and Aflatoxin B1 production in corn. Iran J Environ Health Sci Eng. 4: 163-168.
11. Haskard, C., Binnion, Ch., Ahokas, J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Chemico-Biological Interactions. 128: 39-49.
12. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kakkaanpaa, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B1 by Lactic acid bacteria. Appl Env Microbiol. 67: 3086-3091.
13. IARC (International Agency for Research on Cancer) (2002) chemical agents and related occupations:lyon, France. 1: 230.
14. Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. (2004) Binding of Aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Food Addit Contam. 21: 158-164.
15. Line, J.E., Brackett, R.E. (1995) Factor affecting aflatoxin B1 removal by Flavobacterium Aurantiacum. J Food Prot. 58: 91-94.
16. Mirdamadi. S., Rajabi. A., Azizmohseni, F., Momen, B. (2007) Lactic acid production by lactobacillus strains. Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2: 57-64.
17. Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998) Ability of strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogenic, aflatoxin B1. Food Chem Toxicol. 38: 321-326.
18. Peltonen, J., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001) Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. J Dairy Sci. 84: 2152-2156.
19. Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A., Dalcero, A.M. (2012) Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. Int J Food Microbiol. 156: 214-21.
20. Rahnama Vosough, P., Mohamadi Sani, A., Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R. (2013) Assessing the ability of Lactobacillus rhamnosus GG to bind aflatoxin B1 from ontaminated cottonseed. BTAIJ. 7: 28-33.
21. Rahnama Vosough, P., Mohamadi Sani, A., Mehraban, M., Karazhyan, R. (2014) In vitro effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on reduction of aflatoxin B1. Nutrition & Food Science. 44: 32-40.
22. Rezaee, M., Rezaeian, M., Mirhadi, S.A., Moradi, M. (2008) Effects of yeast supplementation on rumen fermentation, microbial population and the performance of male fattening calves. J Vet Res. 62:403-409.
23. Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O. (2004) Binding ability of aflatoxin M1 to yoghurt Bacteria. Ankara Univ vet Fat Derg. 51: 195-198.
24. Shetty, P.H., Hald, B., Jespersen, L. (2006) Surface binding of aflatoxin B1 by Saccharomyces cerevisiae strains with potential decontaminat-

ing abilities in indigenous fermented foods. Int J Food Microbiol. 113: 41-46.
25. Tajabadi Ebrahimi, M., Jafari, P., Bahrami, H., Hashemi, M. (2011) Evaluation of Aflatoxin B1 reduction in present of lactobacilli isolated from Tarkhineh and fermented milk of Tarkhineh by ELISA. J Microbial Biotech. 8: 43-48.
26. Teniola, O. D., Addo, P.A., Brost, I. M., Farber, P. (2005) Degradation of aflatoxin B1 by cell extracts of Rhodococcus erythropolis and Mycobacterium fluoranthenivorans sp. Nov. DSM 44556. Int J Food Microbiol. 105: 111-117.
27. Thyagaraja, N., Hosono, A. (1994) Binding properties of lactic acid bacteria from 'idly'towards foodborne mutagens. Food Chem Toxicol. 32: 805-809.

Effect of *Lactobacillus rhamnosus* (PTCC 1637) on ruminal detoxification of aflatoxin B1

karazhyan, R.[1], Shaker Sheyda, I.[2], Mehraban Sangh Atash, M.[1], Faeze Tajjali, F.[3], Mojtahedi, M.[4], Sadegh, M.[5]

[1]*Department Food Quality and Safety, ACECR, Mashhad, Mashhad, Iran*
[2]*Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Mashhad, Iran*
[3]*Molecular Medicine Research Department, ACECR, Mashhad, Mashhad, Iran*
[4]*Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Birjand University, Birjand, Birjand, Iran*
[5]*Zharf Andishan Fakher co, Mashhad, Mashhad, Iran*
(Received 22 January 2017, Accepted 13 May 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Aflatoxins are secondary metabolites due to the growth of molds in animal feed. Lactic acid bacteria are microorganisms that can absorb aflatoxins. **OBJECTIVES:** the effect of the yeast *Lactobacillus rhamnosus* (PTCC 1637) on Aflatoxin B1 detoxification and absorption of toxin in in vitro (the cow rumen) was investigated. **METHODS:** For this purpose, the bacteria used in various treatments (live-treated, autoclave, heat-treated, treated with acid 100ºC) was prepared and added to the rumen of cattle. Aflatoxin B1 in different doses (0, 5, 10, 20) ppb in the rumen were added and at times one and two hours were incubated at 37°C. The amount of toxin residues was measured by ELISA using Europroxima kits. **RESULTS:** The results showed that microorganisms have been treated in an autoclave have the largest amount toxin removal (90.5 percent) ($p<0.05$). Also with increases the incubation time, the amount of toxin absorbed significantly (78%) increased ($p<0.05$) and with increasing concentrations of toxin in vitro the bacteria's ability to absorb toxin increases. **CONCLUSIONS:** As a solution to the livestock feed industry bacterial cell wall or its compounds can be helpful in reducing Aflatoxin B1 toxin.

Keyword: aflatoxin B1, rumen fluid, detoxification, *Lactobacillus rhamnosus*

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The effect of the concentration of Aflatoxin B1 toxin uptake by *Lactobacillus rhamnosus*.

Figure 2. Treatment effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the absorption of Aflatoxin B1 in the rumen.

Figure 3. Effect of the Aflatoxin B1 concentration and incubation time in reducing aflatoxin B1 from the rumen.

Figure 4. The effect of treatment *Lactobacillus rhamnosus* and toxins concentration on reducing of Aflatoxin B1.

***Corresponding author's email: reza_karazhyan2002@yahoo.com, Tel: 051-38832360, Fax: 051-38841365**