



دانشگاه گیلان

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد پنجم، شماره دوم، ۱۳۹۶

<http://ejrr.gau.ac.ir>

بررسی آزمایشگاهی تأثیر فوزالون و دیازینون بر فراسنجه‌های تخمیری و برخی جمعیت‌های میکروبی شکمبه

* محسن کاظمی^۱، عبدالمنصور طهماسبی^۲، رضا ولی‌زاده^۳، عباسعلی ناصریان^۲ و آمنه اسکندری تریقان^۳

^۱ استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت جام، آستاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد و ^۲ مربی

گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی تربت جام

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: آفت‌کش‌های ارگانوفسفره مانند فوزالون و دیازینون، شامل گروه متنوعی از مواد شیمیایی بوده که علیه طیف وسیعی از آفات کشاورزی بکار برده می‌شوند. حیوانات نشخوارکننده در محیطی پرورش داده می‌شوند که می‌توانند در معرض این آفت‌کش‌ها قرار بگیرند. مواجهه این حیوانات با این آفت‌کش‌ها ممکن است عمده‌ی (مانند استعمال پوستی برای کنترل حشرات و آلودگی‌های پوستی) و یا تصادفی (مصرف خوراک آلوده به آفت‌کش‌ها) باشد. اولین نگرانی مربوط به اثرات متغیر و بالقوه این مواد شیمیایی بر سلامتی دام و دومین نگرانی مخصوصاً برای تولیدکننده‌های فرآورده‌های دامی این است که این فرآورده‌ها به مواد شیمیایی آلوده نشده باشند. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی سطوح مختلف فوزالون و دیازینون بر فراسنجه‌های تخمیری، جمعیت پروتوزوا و یک گونه باکتری فیبرولیتیک بوتیریویبریو فیبریولونس با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از دو نوع آفت‌کش ارگانوفسفره فوزالون و دیازینون در سه سطح (۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام) و بتونیت سدیم در دو سطح (۰ و ۲ درصد ماده خشک جیره) در یک محیط کشت آزمایشگاهی و در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. در ادامه تولید گاز اندازه‌گیری شد و برخی از پارامترها بر اساس روش تولید گاز، تخمین زده شد. همچنین کل جمعیت پروتوزوا و گونه باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس در محیط کشت با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی تعیین شدند.

یافته‌ها: افزودن فوزالون یا دیازینون به محیط کشت، منجر به کاهش معنی‌دار تولید گاز تجمع‌ی در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون و نیز ثابت نرخ و پتانسیل تولید گاز شد. همچنین کلیه مؤلفه‌های تخمین زده شده از قبیل قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص برای شیردهی، تولید پروتئین میکروبی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در اثر افزودن فوزالون و دیازینون به محیط کشت، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. اضافه کردن بتونیت سدیم در سطح دو درصد به محیط کشت نیز منجر به کاهش معنی‌دار کلیه موارد ذکر شده در بالا گردید. با اضافه کردن هر یک از آفت‌کش‌ها به محیط کشت، جمعیت پروتوزوا کاهش معنی‌دار نشان داد ولی جمعیت گونه باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس تحت تأثیر مصرف دو آفت‌کش قرار نگرفت. کاربرد بتونیت سدیم در محیط کشت منجر به کاهش معنی‌دار جمعیت پروتوزوا و گونه باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس شد.

* نویسنده مسئول: phd1388@gmail.com

نتیجه‌گیری: مصرف هر دو آفت‌کش فوزالون و دیازینون اثرات منفی بر تولید گاز، مؤلفه‌های تخمینی و جمعیت کل پروتوزوا داشت. اثرات سمی فوزالون نسبت به دیازینون بر محیط کشت بیشتر بود. همچنین بنتونیت سدیم به عنوان یک توکسین بایندر، نتوانست از اثرات منفی آفت‌کش‌های دیازینون و فوزالون بر محیط کشت بکاهد و باعث ایجاد اثرات منفی بر تولید گاز، مؤلفه‌های تخمینی، گونه باکتری بوتیریویبریو فیبری‌سولونس و جمعیت کل پروتوزوا شد.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش، بنتونیت، تولید گاز، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

امروزه به دلیل رشد فزاینده جمعیت و نیاز روزافزون به محصولات کشاورزی، بکارگیری آفت‌کش‌های مختلف در سطح مزرعه برای رسیدن به تولید پایدار و اقتصادی ضروری به نظر می‌رسد. کاربرد آفت‌کش‌ها در سطح مزرعه اگرچه باعث افزایش تولید می‌شود ولی مشکلات زیست محیطی فراوانی را در آینده ایجاد خواهد نمود و از همه مهمتر سلامت بشری که از محصولات آلوده به آفت‌کش‌ها استفاده می‌نماید را ممکن است در معرض خطرات جدی قرار دهد. فوزالون و دیازینون دو نوع آفت‌کش از دسته ارگانوفسفرها بوده و با وجود اینکه بسیاری از اثرات مخرب آن به اثبات رسیده است اما توسط بسیاری از کشاورزان ایرانی به فراوانی در سطح مزرعه بر علیه طیف وسیعی از آفات استفاده می‌شوند (۱۹ و ۲۱). گزارش شده که بقایای آفت‌کش‌های موجود در خوراکی‌های آلوده، قابلیت انتقال به شیر و یا سایر فرآورده‌های دامی را دارند (۳۳). هرچند اطلاعات گسترده‌ای در خصوص انتقال آفت‌کش‌های ارگانوکلره به شیر و سایر فرآورده‌های دامی گزارش شده است (۳۳) اما اطلاعات در خصوص آفت‌کش‌های ارگانوفسفره محدود می‌باشد، بنابراین انجام تحقیقات در این زمینه جزو ضروریات و نیاز بخش کشاورزی بوده تا از این طریق بسیاری از حقایق برای کشاورز روشن گردد. به نظر می‌رسد اولین سد دفاعی بدن در برابر ورود سموم، محیط شکمبه بوده به طوری که گزارش شده زمانی که حشره‌کش دی کلرو دی فنیل تری کلرواتان^۱ به شکمبه وارد می‌شود در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه به ترکیب کم‌خطرتری از قبیل دی کلرو دی فنیل دی کلرواتان^۲ که همان مشتقات ثانویه ددت هستند، تبدیل می‌شود (۱ و ۱۲). بنابراین تجزیه سموم توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه، شاید یکی از عوامل مؤثر در کاهش اثرات سوء ناشی از مصرف آن‌ها بر فعالیت‌های تخمیری در محیط شکمبه باشد. امروزه از تکنیک تولید گاز به عنوان روشی پرکاربرد و ارزان قیمت برای برآورد برخی از مؤلفه‌های تخمیری در اثر افزودن مواد مختلف به محیط کشت استفاده می‌شود (۱۸ و ۲۰)، به طوری که با این روش می‌توان نتایج اثرات آفت‌کش‌های مختلف را بر جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه و نیز فعالیت تخمیری آن‌ها به وضوح مشخص نمود. با توجه به اینکه آفت‌کش‌ها قابلیت انتقال به فرآورده‌های دامی را دارند، کاربرد ماده و یا روشی که بتواند از اثرات منفی انتقال آن‌ها بکاهد، ضروری به نظر می‌رسد. بتونیت، خاک رسی متشکل از گروه مینرال‌های مونتموریلونیتی بوده که از ظرفیت تبادل یونی بالایی برخوردار بوده و می‌تواند انواع مختلفی از کاتیون‌ها را با خود باند کند (۲۷). همچنین یون‌های سدیم و یا کلسیم موجود در ترکیبات مونتموریلونیتی، باعث افزایش ظرفیت تبادل یونی آن‌ها می‌گردد (۳۲، ۳۷ و ۵۰). ایران با تولید تقریبی ۲/۵ درصد از بتونیت کل دنیا، سهم درخور توجهی را به خود اختصاص داده است (۲۷). همچنین از بتونیت به عنوان یک توکسین‌بایندر به‌ویژه در جهت کاهش آلودگی‌های مربوط به آفات توکسین‌ها در حیوانات مزرعه‌ای به‌وفور استفاده شده است (۷، ۱۵، ۲۶ و ۳۶). اطلاعات در خصوص اثرات فوزالون و دیازینون بر محیط کشت و جمعیت میکروبی آن کم و یا ناقص می‌باشد و نیز اینکه آیا بتونیت در مواجهه با این آفت‌کش‌ها، کارایی لازم را برای خنثی‌سازی اثرات منفی آن‌ها خواهد داشت یا خیر، مبهم می‌باشد، از این‌رو این تحقیق با هدف بررسی اثرات سمی سطوح مختلف دیازینون و فوزالون با و بدون استفاده از بتونیت سدیم به‌عنوان یک توکسین‌بایندر بر میزان تولید گاز، مؤلفه‌های تخمیری و جمعیت برخی از میکروارگانیسم‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محیط کشت: اقلام و ترکیب جیره آزمایشی بکار برده شده در محیط کشت در جدول ۱ آورده شده است. از فوزالون (ساخت شرکت فلوکا^۳) و دیازینون خالص (ساخت شرکت سیگما آلدریج^۴) هر کدام در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام و

۱- Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)

۲- Dichlorodiphenyldichloroethane (DDD)

۳- Fluka

۴- Sigma-Aldrich

نیز بتونیت سدیم در دو سطح صفر و ۲ درصد ماده خشک جیره پایه در یک محیط کشت آزمایشگاهی استفاده شد. نمونه خوراکی مورد مطالعه به صورت کاملاً مخلوط شده تهیه و با غربال یک میلیمتری آسیاب شد. اجزاء جیره کاملاً مخلوط شده با استفاده از جداول انجمن ملی تحقیقات (۲۰۰۱) برای یک گاو شیری با تولید ۳۵ کیلوگرم شیر در روز، وزن ۵۷۰ کیلوگرم و روزهای شیردهی ۸۵ روز تعیین شد (۳۴).

جدول ۱: اقلام و ترکیب جیره آزمایشی بکار برده شده در محیط کشت

Table 1. Ingredient and chemical composition of experimental diet used in culture medium

مقدار (Amount, %)	اقلام خوراکی (Feed ingredient)
50	سیلاژ یونجه (Alfalfa silage)
10	دانه ذرت آسیاب شده (Ground corn grain)
13	جو آسیاب شده (Ground barley)
7	تخم پنبه کامل (Whole cottonseed)
6	کنجاله تخم پنبه (Cottonseed meal)
9	کنجاله سویا با درصد پروتئین ۴۴ (Soybean meal with 44%CP)
4	سبوس گندم (Wheat bran)
0.5	نمک (Salt)
0.5	مکمل مینرالی - ویتامینی (Vitamin-mineral supplement)
	ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک) (Chemical composition (% of DM)
7.25	خاکستر (Ash)
22.5	پروتئین خام (Crude protein)
33.5	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (Neutral detergent fiber)
23.5	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (Acid detergent fiber)
3.5	چربی خام (Crude fat)
35.4	کربوهیدرات‌های غیر فیبری (Non fiber carbohydrates)
2.38	انرژی قابل متابولیسم (Mcal/kg) (Metabolizable energy)

۱- مکمل (گرم/کیلوگرم ماده خشک مکمل) حاوی ۶۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D، ۳۳۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۱۶۰ گرم کلسیم، ۸۵ گرم فسفر، ۶۳ گرم سدیم، ۴۵ گرم منیزیم، ۲۱۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۵۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۵۳۵ میلی‌گرم مس و ۴۵ میلی‌گرم ید می‌باشد.

1- Containing (g/kg premix; DM basis): 60 000 IU of vitamin D, 330000 IU of vitamin A, 1000 IU of vitamin E, 160 g Ca, 85 g P, 63 g Na, 45 g Mg, 2100 mg Zn, 12 mg Se, 1500 mg Mn, 535 mg Cu, 45 mg I.

غلظت نهایی هر یک از آفت‌کش‌ها (۱۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام) در محیط کشت ۳۰ میلی‌لیتری در نظر گرفته شد. همچنین در ابتدا یک محلول مادر با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام تهیه و در نهایت غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام از این محلول مادر همراه با هگزان تهیه شد. مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های تهیه شده هر یک از آفت‌کش‌ها در هگزان، قبل از اینکه مایع شکمبه و بافر به محیط کشت اضافه شوند، بر روی جیره آزمایشی درون شیشه‌ها اسپری شد و درب شیشه‌ها به مدت ۲۴ ساعت جهت تبخیر کامل هگزان از محیط کشت باز گذاشته شد. همچنین به تیمارهای شاهد نیز تنها هگزان خالی اسپری (۳۰ میلی‌لیتر) گردید. به بطری‌های شیشه‌ای (۱۲۰ میلی‌لیتری)، بزاق مصنوعی تهیه شده به روش منک و استینگاس (۱۹۸۸) و مایع شکمبه صاف شده به نسبت ۱:۲ (یک قسمت مایع شکمبه و دو قسمت بزاق مصنوعی) (حدود ۳۰ میلی‌لیتر) و ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک از جیره تهیه شده در جدول ۱ (۵ تکرار برای هر تیمار)، اضافه شد (۲۸). مایع شکمبه از چهار رأس گاو نر هلشتاین (با میانگین وزن زنده 420 ± 12 کیلوگرم)

دارای فیستولای شکمبه‌ای که در حد احتیاجات نگهداری و با جیره حاوی سیلاژ ذرت و یک نوع کنسانتره تجاری تغذیه می‌شدند، قبل از تغذیه صبحگاهی گرفته شد. میزان پروتئین خام و انرژی قابل متابولیسم جیره گاوهای فیستولا به ترتیب برابر با ۱۳/۵ درصد و ۲/۵۶ مگا کالری در هر کیلوگرم ماده خشک بود. همچنین ۵ شیشه فاقد ماده خوراکی به عنوان عامل تصحیح (بلنک) برای تصحیح فشار گاز تولید شده توسط ذرات باقیمانده در مایع شکمبه در نظر گرفته شد. درب بطری‌های شیشه‌ای با استفاده از درپوش لاستیکی و پوشش آلومینیومی به طور کامل به کمک ابزار کریمپر پلمپ و در حمام آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتیگراد قرار داده شد و با ثبت فشار گاز تولید شده در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون و با استفاده از رابطه تنودورو و همکاران (۱۹۹۴)، حجم گاز تولید شده در هر زمان به دست آمد (۴۶).

تهیه نمونه، استخراج DNA و کار به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی: نمونه‌های مایع شکمبه جهت تعیین میزان جمعیت کل پروتوزوا و باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس مشابه با محیط کشت ذکر شده در بخش تولید گاز، تهیه شد و درب آن‌ها با درپوش لاستیکی مربوطه بسته شد و جهت جلوگیری از کاهش اثرات منفی تجمع گاز در محیط کشت، هر دو ساعت یکبار گاز درون شیشه‌ها از طریق سوزن مربوطه تخلیه می‌شد. همچنین نمونه‌گیری از محیط کشت، ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون صورت گرفت و نمونه‌های استخراج شده، با پارچه متقال چهار لایه صاف و بلافاصله به سردخانه با دمای ۸۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شد (۲۳). در روش استخراج DNA تمامی مطالعات مولکولی انجام شده در زمینه فلور میکروبی شکمبه نیازمند استخراج DNA از محتویات هضمی شکمبه بود بنابراین به منظور استخراج DNA از محتویات محیط کشت از کیت تجاری دنایست^۱ ساخت ایران (مشهد) و بر اساس دستورالعمل آن استفاده شد. پس از استخراج DNA، برای تعیین غلظت آن از دستگاه نانودراپ استفاده شد و سپس نمونه‌ها از لحاظ غلظت DNA یکسان‌سازی شدند. در این آزمایش از پرایمرهای خاص ژن هدف 16SrRNA استفاده شد (جدول ۲). مقایسه نسبی جمعیت کل پروتوزوا و باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی و از طریق اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین و به کمک دستگاه بایورد^۲ انجام شد. ترکیب واکنش برای معرفی به دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی شامل کیت استاندارد مستر میکس سایبرگرین^۳، پرایمر رفت، پرایمر برگشت، نمونه DNA استخراج شده و آب دوبار تقطیر بود. نمونه‌ها پس از مخلوط شدن کامل، ورتکس شدند. مقدار مشخصی از مخلوط مستر میکس تهیه شده به استریب تیوب مربوطه انتقال داده و سپس نمونه‌ها به دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی انتقال داده شد. طول قطعه و توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: طول قطعه و توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

Table 2. Segment length and sequence-specific primers used in Real-Time PCR

منبع (Source)	توالی (Sequence)	پرایمر (Primer)	طول قطعه Segment (length)	میکروارگانیزم (Microorganism)
استیونسون و ویمر (۲۰۰۷)	5'-ACCGCATAAGCGCACGGA-3'	رفت (Forward)	168	بوتیریویبریو فیبریولونس Butyriovibrio
	5'-CGGGTCCATCTGTACCGATAAAT-3'	برگشت (Reverse)		(fibrisolvens)

۱- Real-Time PCR

۲- Dena Zist Asia, Genomic DNA isolation kit

۳- Bio-Rad (CFx96)

۴- SYBR Green I qPCR Master Mix, Syntol, Russia

سیلستر و همکاران (۲۰۰۴)	5'-GCTTTCGWTGGTAGTGTATT-3'	رفت (Forward)	150	کل پروتوزوا (Total protozoa)
	5'-CTTGCCCTCYAATCGTWCT-3'	برگشت (Reverse)		

پروتکل مورد استفاده در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی برای گونه بوتیریوبیریوفیبریوسولونس و کل پروتوزوا در جدول ۳ آورده شده است. برای تعیین اختصاصی بودن تکثیر، آنالیز منحنی ذوب محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بعد از آخرین سیکل در هر تکثیر انجام شد. از کنترل منفی (نمونه بدون DNA) در هر اندازه‌گیری جهت نشان دادن عدم وجود آلودگی استفاده شد. جمعیت پروتوزوا و گونه باکتری بوتیریوبیریوفیبریوسولونس به صورت نسبتی از جمعیت کل باکتری‌های شکمبه^۱ (Total rumen bacterial 16SrDNA) تعیین شدند. بر این پایه جمعیت نسبی گروه‌های مورد مطالعه در این آزمایش بر پایه مقادیر Ct delta Ct پروتوزوا و یا گونه باکتری بوتیریوبیریوفیبریوسولونس منهای Ct کل باکتری‌ها) و بر پایه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (۶ و ۱۳).

جدول ۳: پروتکل مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی برای کل پروتوزوا و باکتری بوتیریوفیبریوسولونس
Table 3. Protocol used in Real Time PCR for total protozoa and bacteria *Butyrivibrio Fibrisolvens*

زمان (Time)	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	مراحل پیشرفت واکنش (Reaction progress)
10-Minute	94	واسرشت اولیه (Initial denaturation)
15-second	94	واسرشت ثانویه (Second denaturation)
20-second	58	توسعه (Annealing)
30-second	72	بسط (Extension)

روش های آماری و فاکتورهای تخمین زده شده: داده‌های بدست آمده از تولید گاز با استفاده از رابطه ارسکو و مکدونالد (۱۹۷۹) مورد برازش قرار گرفت (۳۵):

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

که در این معادله، P معادل حجم گاز تولیدی در زمان t، b معادل تولید گاز از بخش نامحلول ولی قابل تخمیر پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، c معادل ثابت نرخ تولید گاز برای b (میلی لیتر در ساعت) و t معادل زمان انکوباسیون (ساعت) می‌باشد. انرژی متابولیسمی، انرژی خالص شیردهی و مقدار تجزیه‌پذیری ماده آلی بر اساس معادلات منک و استینگاس (۱۹۸۸) تعیین گردید (۲۸):

$$ME (MJ/kg DM) = 1.06 + 0.157 GP + 0.084 CP + 0.220 CF - 0.081 CA$$

که در معادله بالا GP معادل حجم کل گاز تولید شده تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی گرم نمونه بوده و CF، CP و CA به ترتیب معادل درصد پروتئین خام، درصد چربی خام و درصد خاکستر خام نمونه مورد آزمایش می‌باشند.

$$OMD (\%) = 42.85 + 0.6766 GP$$

که در معادله بالا GP معادل حجم کل گاز تولید شده تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی گرم نمونه بود.

$$NEI (MJ/kg DM) = -0.36 + 0.1149 GP + 0.054 CP + 0.139 CF - 0.054 CA$$

^۱-Total rumen bacterial 16SrDNA

که در معادله بالا GP معادل حجم کل گاز تولید شده تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی گرم نمونه بوده و CP، CF و CA به ترتیب معادل درصد پروتئین خام، درصد چربی خام و درصد خاکستر خام نمونه مورد آزمایش می باشند. کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بر اساس معادله ماکار (۲۰۰۵) محاسبه گردید (۲۵).

$$SCFA \text{ (mmol/200 mgDM)} = 0.0222 GP - 0.0425$$

که در معادله بالا GP معادل حجم کل گاز تولید شده تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی گرم نمونه می باشد. میزان بازده پروتئین میکروبی به صورت ۱۹/۳ گرم نیتروژن میکروبی به ازای هر کیلوگرم ماده آلی قابل هضم، گزارش گردید (۳). همچنین از یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳×۲ (عامل اول دو نوع آفت کش فوزالون و دیازینون، عامل دوم سه سطح آفت کش و عامل سوم دو سطح بتونیت سدیم) با طرح پایه کاملاً تصادفی استفاده گردید. به طوری که مدل آماری طرح شامل $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + C_k + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + \epsilon_{ijk}$ بود که در آن Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین پارامتر مورد مطالعه، A_i = اثر نوع آفت کش، B_j = اثر سطح آفت کش، AB_{ij} = اثر متقابل نوع آفت کش و سطوح آفت کش، C_k = اثر سطوح بتونیت سدیم، AC_{ik} = اثر متقابل نوع آفت کش و سطوح بتونیت سدیم، BC_{jk} = اثر متقابل سطوح آفت کش و سطوح بتونیت سدیم، ABC_{ijk} = اثر متقابل بین نوع آفت کش، سطوح آفت کش و سطوح بتونیت سدیم و ϵ_{ijk} = خطای آزمایشی بود. اختلاف آماری بین تیمارها با روش دانکن در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) محاسبه شد (۴۱).

نتایج و بحث

تولید گاز: تأثیر فوزالون و دیازینون همراه و یا بدون بتونیت سدیم بر پارامترهای تولید گاز حاصل از جیره آزمایشی در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان تولید گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر نوع آفت کش قرار گرفت به طوری که فوزالون نسبت به دیازینون منجر به کاهش شدیدتر تولید گاز شد ($P < 0.05$). با افزایش سطوح فوزالون و یا دیازینون به محیط کشت، میزان تولید گاز در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز ثابت نرخ و پتانسیل تولید گاز کاهش یافت ($P < 0.0001$). کاربرد بتونیت سدیم منجر به کاهش تولید گاز در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون و نیز ثابت نرخ و پتانسیل تولید گاز شد ($P < 0.0001$). همچنین اثرات متقابل بین نوع آفت کش و بتونیت سدیم برای تولید گاز ۱۲ ساعت و ثابت نرخ تولید گاز معنی دار شد. اثرات متقابل بین سطح آفت کش و بتونیت سدیم تنها برای ثابت نرخ تولید گاز معنی دار شد به طوری که بتونیت نه تنها نتوانست از اثرات منفی آفت کش های دیازینون و فوزالون بر محیط کشت بکاهد بلکه با افزایش همزمان سطح بتونیت در سطوح بالای آفت کش، کاهش معنی دار ثابت نرخ تولید گاز به صورت سینرژیستی مشاهده شد. اثرات متقابل بین نوع آفت کش، سطح آفت کش و بتونیت سدیم نیز برای کلیه پارامترهای جدول ۴ معنی دار نشد. اضافه کردن دو آفت کش تیودان و سوین به یک محیط کشت دارای پروتوزوای هولوتریش، نه تنها باعث کاهش تولید گاز در محیط کشت نشد، بلکه منجر به افزایش معنی دار آن شد (۴۹) که با نتایج این تحقیق همخوانی ندارد. بالعکس اضافه کردن فوزالون به یک محیط کشت آزمایشگاهی باعث کاهش معنی دار تولید گاز در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون و همچنین تجزیه پذیری ماده خشک گردید (۲۱) که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. عمده‌تأ فعالیت تخمیری میکروارگانیسم‌ها در محیط شکمبه و یا محیط کشت منجر به تولید گاز می شود، از این رو برخی از آفت کش ها ممکن است بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها اثرات منفی گذاشته که متعاقباً باعث کاهش تولید گاز در محیط کشت خواهند شد. برخی از مطالعات نشان داده که بعضی از آفت کش‌ها اثر مهارکنندگی بر روی برخی از آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها داشته که از این طریق باعث کاهش عملکرد آن‌ها می گردد (۴). اگر چه سرنوشت آفت کش‌ها در محیط کشت، نیز تحت تأثیر فعالیت میکروب‌های موجود در آن قرار می گیرد ولی برخی آفت کش‌ها به سهولت توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه می شوند و برخی دیگر در مقابل تجزیه شدن از خود مقاومت نشان می دهند (۱۱)، بنابراین در نتیجه اثرات سمی برخی از آفت کش‌ها، ممکن است تا حدود زیادی از میزان تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی کاسته شود. در مطالعه‌ای دیگر، با افزایش سطوح فوزالون به محیط کشت، ثابت نرخ و پتانسیل تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد، کاهش معنی دار نشان داد (۲۲).

جدول ۴: تأثیر فوزالون و دیازینون همراه و یا بدون بنتونیت سدیم بر پارامترهای تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی

Table 4. Effect of phosalone and diazinon with or without sodium bentonite on gas production parameters in laboratory conditions

اثرات اصلی							
Main effects							
نوع آفت کش TP	سطح آفت کش LP	بنتونیت سدیم SB	C _{gas} (ml/h)	B _{gas} (ml)	تولید گاز Gas production (ml/48h)	تولید گاز Gas production (ml/24h)	تولید گاز Gas production (ml/12h)
فوزالون Phosalone	0	0	0.065 ^{ab}	44.90 ^a	42.43 ^a	35.44 ^a	25.25 ^a
	100	0	0.067 ^a	40.96 ^b	39.05 ^{ab}	32.46 ^a	23.96 ^{ab}
	500	0	0.057 ^c	31.73 ^d	29.26 ^d	23.87 ^{cd}	16.60 ^e
	100	2	0.054 ^c	38.99 ^{bc}	35.89 ^{bc}	28.73 ^b	19.51 ^{cd}
	500	2	0.059 ^{bc}	36.57 ^c	34.25 ^c	27.84 ^b	19.37 ^{cd}
دیازینون Diazinon	0	0	0.065 ^{ab}	44.90 ^a	42.45 ^a	35.44 ^a	25.25 ^a
	100	0	0.067 ^a	42.59 ^{ab}	40.46 ^a	34.27 ^a	24.79 ^a
	500	0	0.069 ^a	36.31 ^c	34.12 ^c	29.10 ^b	21.77 ^{bc}
	0	2	0.054 ^c	38.99 ^{bc}	35.89 ^{bc}	28.73 ^b	19.51 ^{cd}
	100	2	0.052 ^c	36.72 ^c	33.62 ^c	26.73 ^{bc}	17.99 ^{de}
500	2	0.043 ^d	31.89 ^d	27.96 ^d	21.54 ^{de}	13.37 ^f	
SEM			0.002	1.23	1.21	1.02	0.85
سطح معنی داری							
P-value							
نوع آفت کش (TP)			0.29	0.089	0.08	0.029	0.10
سطح آفت کش (LP)			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
بنتونیت سدیم (SB)			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
نوع آفت کش × سطح آفت کش (LP×TP)			0.008	0.26	0.11	0.028	0.03
نوع آفت کش × بنتونیت سدیم (SP×TP)			0.03	0.25	0.24	0.093	0.02
سطح آفت کش × بنتونیت سدیم (SB×LP)			0.009	0.16	0.54	0.86	0.98
نوع آفت کش × سطح آفت کش × بنتونیت سدیم (LP×SB×TP)			0.28	0.60	0.67	0.48	0.14

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر معنی دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0.05).

Means with different subscript letters within a column are significantly different at P<0.05.

نرخ (C_{gas}/h) و پتانسیل تولید گاز (b_{gas}: ml/200mgDM)؛ نوع آفت کش (Type of pesticide)؛ سطح آفت کش (Level of pesticide)؛ بنتونیت سدیم (Sodium bentonite)

بنتونیت از دسته کانی‌های رسی بوده که برای افزایش عملکرد نشخوارکنندگان به دلیل ظرفیت بافری آن و نیز ظرفیت تبادل یونی بالای آن به‌وفور استفاده می‌شود (۲۴). لی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند در اثر اضافه کردن بنتونیت به جیره گوساله‌های پرواری، میزان تولید گاز (دی اکسید گوگرد، آمونیاک و سولفید هیدروژن) در کود آن‌ها در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که آن‌ها دلیل احتمالی کاهش این گازها را مربوط به قدرت جذب بالا و ظرفیت بالای تبادل یونی بنتونیت عنوان کردند (۲۴). در مطالعات دیگری نیز مشخص شد که بنتونیت از ظرفیت تبادل یونی و قدرت جذب بالایی برخوردار می‌باشد (۹ و ۱۴). محققان زیادی از بنتونیت برای کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین‌های موجود در خوراک استفاده نموده‌اند (۱۷ و ۳۱). از بنتونیت به‌عنوان افزودنی در غذای انسان‌ها جهت کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین‌ها نیز استفاده شده است (۸، ۳۹ و ۴۰). در مطالعه دیگر، افزودن بنتونیت به محیط کشت دارای خوراک‌های متفاوت، منجر به افزایش معنی‌دار تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد شد (۴۷). اما در آزمایش ما افزودن بنتونیت به محیط کشت منجر به کاهش تولید گاز شد. اطلاعات

در خصوص تأثیر فوزالون و به‌ویژه دیازینون بر محیط کشت بسیار کم می‌باشد، ولی نتایج آزمایش اخیر نشان داد کاربرد هر دو آفت‌کش فوزالون و دیازینون منجر به کاهش فرآیند تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و بنتونیت، کارایی لازم را برای کاهش و یا حذف اثرات منفی آن‌ها در محیط کشت ندارد.

مؤلفه‌های تخمین زده شده: تأثیر فوزالون و دیازینون همراه و یا بدون بنتونیت سدیم بر مؤلفه‌های تخمین زده شده از تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵: تأثیر فوزالون و دیازینون همراه و یا بدون بنتونیت سدیم بر مؤلفه‌های تخمین زده شده از تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی

Table 5. Effect of phosalone and diazinon with or without sodium bentonite on estimated parameters from gas production in culture medium

اثرات اصلی							
Main effects							
نوع آفت‌کش	سطح آفت‌کش	بنتونیت سدیم	تولید پروتئین میکروبی	انرژی خالص	اسیدهای چرب کوتاه	انرژی قابل متابولیسم	تجزیه‌پذیری ماده آلی
TP	LP	SB	MPY (g/kg OMD)	NEI (Mcal/kg DM)	SCFA (mmol)	ME (Mcal/kg DM)	OMD (%)
فوزالون	0	0	12.90 ^a	3.84 ^a	0.78 ^a	6.83 ^a	66.83 ^a
	100	0	12.51 ^a	3.50 ^a	0.72 ^a	6.36 ^a	64.81 ^a
	500	0	11.39 ^{cd}	2.51 ^{cd}	0.53 ^{cd}	5.01 ^{cd}	59.00 ^{cd}
	100	2	12.02 ^b	3.07 ^b	0.63 ^b	5.78 ^b	62.29 ^b
	500	2	11.90 ^b	2.97 ^b	0.61 ^b	5.64 ^b	61.68 ^b
دیازینون	0	0	12.90 ^a	3.84 ^a	0.78 ^a	6.83 ^a	66.83 ^a
	100	0	12.74 ^a	3.71 ^a	0.76 ^a	6.65 ^a	66.04 ^a
	500	0	12.07 ^b	3.11 ^b	0.64 ^b	5.83 ^b	62.54 ^b
	0	2	12.02 ^b	3.07 ^b	0.63 ^b	5.78 ^b	62.29 ^b
	100	2	11.76 ^{bc}	2.84 ^{bc}	0.59 ^{bc}	5.46 ^{bc}	60.94 ^{bc}
500	2	11.08 ^{de}	2.25 ^{de}	0.47 ^{de}	4.65 ^{de}	57.43 ^{de}	
SEM			0.13	0.12	0.02	0.16	0.69
سطح معنی‌داری							
P-value							
نوع آفت‌کش (TP)			0.029	0.029	0.029	0.029	0.029
سطح آفت‌کش (LP)			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
بنتونیت سدیم (SB)			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
نوع آفت‌کش × سطح آفت‌کش (LP×TP)			0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
نوع آفت‌کش × بنتونیت سدیم (SP×TP)			0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
سطح آفت‌کش × بنتونیت سدیم (SB×LP)			0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
نوع آفت‌کش × سطح آفت‌کش (LP×SB×TP)			0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
آفت‌کش × بنتونیت سدیم							

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0.05).

Means with different subscript letters within a column are significantly different at P<0.05.

تجزیه‌پذیری ماده آلی (Organic matter degradability)، انرژی قابل متابولیسم (Metabolizable energy)، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (Short chain fatty acids)، انرژی خالص شیردهی (Net energy for lactation)، تولید پروتئین میکروبی (Microbial protein)، yield؛ نوع آفت‌کش (Type of pesticide)، سطح آفت‌کش (Level of pesticide)؛ بنتونیت سدیم (Sodium bentonite)

نوع آفت‌کش، سطح آفت‌کش، بنتونیت سدیم و اثر متقابل نوع آفت‌کش و سطح آفت‌کش، اثر معنی‌داری بر کلیه پارامترهای گزارش شده در جدول ۵ گذاشت، به‌طوری‌که فوزالون نسبت به دیازینون تأثیر بیشتری بر کاهش این پارامترها داشت. همچنین با

افزایش سطوح هر دو آفت‌کش به محیط کشت، میزان پارامترهای گزارش شده در جدول ۵ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. استفاده از بتونیت در محیط کشت نیز باعث کاهش معنی‌دار کلیه این پارامترها شد. کلیه مؤلفه‌های گزارش شده در جدول ۵، از تولید گاز در زمان ۲۴ ساعت، تخمین زده شده است، بنابراین هرگونه اثر بر روی تولید گاز، قاعدتاً این مؤلفه‌ها را تحت تأثیر قرار خواهد داد. در مطالعه‌ای اسپری دیازینون بر روی خوراک قبل از کیسه‌گذاری شکمبه‌ای، منجر به کاهش معنی‌دار بخش دارای پتانسیل تجزیه‌پذیر خوراک در سطوح بالای دیازینون گردید و نیز کاربرد توأم بتونیت و دیازینون، تأثیری بر کاهش اثرات منفی آفت‌کش نداشت (۱۹). محسن و تافیک (۲۰۰۲) گزارش کردند استفاده از ۲/۵ و ۵ درصد بتونیت سدیم در جیره بزهای آنقوره باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه می‌شود (۲۹). تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین حاصل از اجزاء جیره، یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که فرآهمی اسیدهای آمینه در رودی باریک نشخوارکنندگان را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری‌که تجزیه پروتئین یا پروتئولیز میزان دسترسی به آمونیاک، اسیدهای آمینه، پپتیدها و اسیدهای چرب شاخه‌دار را که بر نرخ رشد میکروبی در شکمبه مؤثر می‌باشد، تحت الشعاع خود قرار می‌دهد (۴۳)، از طرفی گزارش شده که کاربرد بتونیت باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌گردد بنابراین این کاهش ممکن است دسترسی میکروارگانیسم‌ها را برای نیتروژن آمونیاکی محدود ساخته و در نهایت تولید گاز را در محیط کشت تحت تأثیر خود قرار دهد.

جمعیت میکروارگانیسم‌ها: تأثیر فوزالون و دیازینون همراه و یا بدون بتونیت سدیم بر جمعیت پروتوزوا و گونه باکتری بوتیریوبیریو فیبریسولونس در جدول ۶ آورده شده است. نوع آفت‌کش (دیازینون یا فوزالون) و نیز سطح آفت‌کش تأثیر معنی‌داری بر جمعیت باکتری بوتیریوبیریو فیبریسولونس نداشت، اما اضافه کردن بتونیت به محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار در جمعیت این گونه باکتری شد. هیچ‌یک از اثرات متقابل برای این گونه باکتری معنی‌دار نشد. همچنین اختلاف آماری معنی‌داری بین دو آفت‌کش بر جمعیت پروتوزوا مشاهده نشد اما با افزایش سطح هر یک از آفت‌کش‌ها و نیز کاربرد بتونیت سدیم در جیره، جمعیت پروتوزوا به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. هیچ‌یک از اثرات متقابل برای جمعیت پروتوزوا نیز معنی‌دار نشد. دیازینون علیرغم پایداری پایین آن در محیط، برای انسان‌ها و حیوانات بسیار سمی می‌باشد (۲). اثرات سمی فوزالون بر روی حیوانات آزمایشگاهی، مکرراً به اثبات رسیده است (۵ و ۳۸) ولی اطلاعات در ارتباط با اثرات این آفت‌کش بر محیط‌های کشت آزمایشگاهی تهیه شده از مایع شکمبه، ناقص و یا محدود می‌باشد. نتایج آزمایش اخیر نشان داد بیشترین تأثیر در اثر اضافه کردن دو آفت‌کش فوزالون و دیازینون مربوط به جمعیت پروتوزوا می‌باشد. گونه بوتیریوبیریو فیبریسولونس اگرچه با اضافه کردن آفت‌کش به محیط کشت، کاهش معنی‌داری نشان نداد ولی به‌لحاظ عددی جمعیت آن‌ها کاهش یافت. والاس و نیوبلد (۱۹۹۱) گزارش کردند که اضافه کردن روزانه ۲ گرم بتونیت به محیط کشت دارای علوفه و کنساتره در شرایط آزمایشگاهی، باعث کاهش تحرک پروتوزوای مزکدار به‌ویژه گونه‌های هولوتریش می‌شود (۴۸). همچنین شاید یکی از دلایلی که در آزمایش ما بتونیت باعث کاهش تولید گاز در محیط کشت شده است، مربوط به کاهش معنی‌دار جمعیت پروتوزوا باشد. پروتوزوا عامل اصلی در تولید گاز هیدروژن بوده و افزایش یا کاهش هیدروژن در محیط شکمبه، سبب ایجاد تغییرات در pH شکمبه می‌شود (۳۰). همچنین گزارش شده است که پروتوزوا به‌صورت غیرمستقیم در تولید گاز متان از طریق فراهم آوردن هیدروژن برای باکتری‌های متانوژن نقش دارد (۱۱). فن و لنگ (۱۹۹۰) یک افزایش در جمعیت پروتوزوای شکمبه‌ای گروهی از گوسفندانی مشاهده نمودند که با ۱۶-۱۵ گرم بتونیت در روز تغذیه می‌شدند (۱۰)، هر چند که ایوان و همکاران (۱۹۹۲) تغییری در جمعیت پروتوزوای شکمبه‌ای در اثر افزودن بتونیت به جیره گوسفندان مشاهده نکردند (۱۶).

جدول ۶: تأثیر فوزالون و دیازینون همراه و یا بدون بنتونیت سدیم بر جمعیت پروتوزوا و باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس در شرایط آزمایشگاهی

Table 6. Effect of phosalone and diazinon with or without sodium bentonite on protozoa population and *Butyrivibrio fibrisolvens* in laboratory conditions

اثرات اصلی				
Main effects				
نوع آفت‌کش	سطح آفت‌کش	بنتونیت سدیم	کل پروتوزوا	بوتیریویبریو فیبریولونس
TP	LP	SB	Total protozoa	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
	0	0	0.758 ^a	0.978
	100	0	0.548 ^{ab}	0.980
فوزالون	500	0	0.497 ^{ab}	0.708
Phosalone	100	2	0.412 ^b	0.722
	500	2	0.026 ^c	0.608
	500	2	0.003 ^c	0.606
	0	0	0.758 ^a	0.979
	100	0	0.548 ^{ab}	0.980
دیازینون	500	0	0.586 ^{ab}	0.809
Diazinon	0	2	0.373 ^b	0.812
	100	2	0.045 ^c	0.656
	500	2	0.014 ^c	0.687
SEM			0.09	0.11

سطح معنی‌داری		
P-value		
نوع آفت‌کش (TP)	0.82	0.42
سطح آفت‌کش (LP)	0.0003	0.12
بنتونیت سدیم (SB)	<0.0001	0.002
نوع آفت‌کش × سطح آفت‌کش (LP×TP)	0.88	0.91
نوع آفت‌کش × بنتونیت سدیم (SP×TP)	0.77	0.77
سطح آفت‌کش × بنتونیت سدیم (SB×LP)	0.44	0.35
نوع آفت‌کش × سطح آفت‌کش × بنتونیت سدیم (LP×SB×TP)	0.94	0.94

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0.05).

Means with different subscript letters within a column are significantly different at P<0.05.

نوع آفت‌کش (Type of pesticide)؛ سطح آفت‌کش (Level of pesticide)؛ بنتونیت سدیم (Sodium bentonite)

نتیجه‌گیری

اضافه کردن آفت‌کش‌های فوزالون یا دیازینون به محیط کشت باعث ایجاد اثرات منفی بر پارامترهای تخمیری شد، به طوری که اثر منفی فوزالون در مقایسه با دیازینون بر محیط کشت بیشتر بود. کاربرد بنتونیت سدیم در محیط کشت نه تنها منجر به کاهش اثرات منفی آفت‌کش‌های فوزالون و یا دیازینون نشد بلکه اثرات منفی بر اغلب شاخص‌های تخمیری مورد مطالعه در این آزمایش داشت. همچنین کاهش در جمعیت پروتوزوا و باکتری بوتیریویبریو فیبریولونس در اثر اضافه کردن بنتونیت سدیم به محیط کشت مشاهده گردید که شاید بخشی از کاهش تولید گاز مربوط به این موضوع باشد، هر چند که اثبات نتایج با قاطعیت بیشتر، نیاز به اجرای تحقیقات گسترده‌تر در آینده می‌باشد.

1. Aislabie, J., and Lloyd-Jones, G. 1995. A review of bacterial-degradation of pesticides. *Australian Journal Soil Research*. 33(6): 925-942.
2. Colovic, M., Krstic, D., Petrovic, S., Leskovac, A., Joksic, G., Savic, J., Franko, M., Trebse, P., and Vasic, V. 2010. Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. *Toxicology Letters*. 193: 9-18.
3. Czerkawski, J.W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press. Oxford. New York. 236p.
4. Das, S.K. 2013. Mode of action of pesticides and the novel trends—A critical review. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*. 3: 393-401.
5. Demirin, H., Gokalp, O., Kaya, E., Bukukvanli, B., Cesur, G., Ozkan, A., and Kaya, M. 2013. Phosalone toxicity on liver and pancreas: role of vitamins E and C. *Asian Journal of Chemistry*. 25: 2589-2592.
6. Denman, S.E., and McSweeney, C.S. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*. 58: 572-582.
7. Eckhardt, J.C., Santurio, J.M., Zanette, R.A., Rosa, A.P., Scher, A., Dal Pozzo, M., Alves, S.H., and Ferreira, L. 2014. Efficacy of a Brazilian calcium montmorillonite against toxic effects of dietary aflatoxins on broilers reared to market weight. *British Poultry Science*. 99: 215-20.
8. Elmore, S.E., Mitchell, N., Mays, T., Brown, K., Marroquin-Cardona, A., Romoser, A., and Phillips, T.D. 2014. Common African cooking processes do not affect the aflatoxin binding efficacy of refined calcium montmorillonite clay. *Food Control*. 37: 27-32.
9. Fenn, P.D., and Leng, R.A. 1989. Wool growth and sulfur amino acid entry rate in sheep fed roughage based diets supplemented with bentonite and sulfur amino acids. *Australian Journal of Agricultural Research*. 40: 889-896.
10. Fenn, P.D., and Leng, R.A. 1990. The effect of bentonite supplementation on ruminal protozoa density and wool growth in sheep either fed roughage based diets or grazing. *Australian Journal of Agricultural Research*. 41: 167-174.
11. Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M., and Hirt, R.R. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*. 117: 157-162.
12. Fries, G.F., Flatt, W.P., and Moree, L.A. 1969. Energy balances and excretion of DDT into milk. *Journal of Dairy Science*. 52: 684-695.
13. Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., Behgar, M., and Ghovvati, S. 2012. Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. *Small Ruminant Research*. 104: 94-98.
14. Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Elissalde, M.H., and Huff, W.E. 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *American Journal of Veterinary Research*. 52: 152-156.
15. Indresh, H.C., Devegowda, G., Ruban, S.W., and Shicakumar, M.C. 2013. Effects of high grade bentonite on performance, organ weights and serum biochemistry during aflatoxicosis in broilers. *Veterinary World*. 6: 313-317.
16. Ivan, M., Dayrell, M.D., Mahadevan, S., and Hidiroglou, M. 1992. Effects of bentonite on wool growth and nitrogen metabolism in fauna-free and faunated sheep. *Journal of Animal Science*. 70: 3194-3202.
17. Jaynes, W.F., and Zartman, R.E. 2011. Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. *Toxins*. 3: 551-565.

18. Kazemi, M., Tahmasbi, A.M., Naserian, A.A., Valizadeh, R., and Moheghi, M.M. 2012. Potential nutritive value of some forage species used as ruminants feed in Iran. *African Journal of Biotechnology*. 11: 12110-12117.
19. Kazemi, M., Tahmasbi, A.M., Valizadeh, R., and Naserian, A.A. 2012. Toxic influence of diazinon as an organophosphate pesticide on parameters of dry matter degradability according to *in situ* technique. *International Journal of Basic and Applied Sciences (IJBAS)*. 12: 229-233.
20. Kazemi, M., Tahmasbi, A.M., Valizadeh, R., Naserian, A.A., Haghayegh G.H., and Esmail Jami, Y. 2014. Studies on the effects of different chemical additives on the nutritive value of ensiled barley distillers' grain (BDG) using *in vitro* techniques. *Direct Research Journal of Agriculture and Food Science*. 2: 19-24.
21. Kazemi, M., Tahmasbi, A.M., Valizadeh, R., Naserian, A.A., Afshari, R., and Sonei, A. 2013. Effect of phosalone as an organophosphate pesticide with different levels of bentonite on fermentation parameters of a TMR ration according to *in vitro* condition. *Iranian Journal of applied animal science*. 5: 201-209. (In Persian)
22. Kazemi, M., Tahmasbi, A.M., Valizadeh, R., Naserian, A.A., and Haghayegh, G.H. 2013. Effect of phosalone on rumen *in vitro* fermentation parameters. *Sky Journal of Agricultural Research*. 2: 149-153.
23. Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P., and Navanukraw, C. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Livestock Science*. 127: 38-44.
24. Lee, S., Kim, Y., and Kwak, W. 2010. Effects of dietary addition of bentonite on manure gas emission, health, production, and meat characteristics of Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) steers. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 23: 1594-1600
25. Makkar, H.P.S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 291-302.
26. Manafi, M. 2012. Counteracting effect of high grade sodium bentonite during aflatoxicosis in broilers. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 14: 539-547.
27. Maxim, L.D., Niebo, R., and McConnell E.E. 2016. Bentonite toxicology and epidemiology-a review. *Inhalation Toxicology*. 28: 591-617.
28. Menke, K.H., and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal research and development*. 28: 7-55.
29. Mohsen, M.K., and Tawfik, E.S. 2002. Growth performance, rumen fermentation and blood constituents of goats fed diets supplemented with bentonite. Faculty of Agriculture, Kafr El-Sheikh, Tanta University, Egypt, 7 pp.
30. Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., and Newbold, C. J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Journal of Animal Science*. 4: 1027-1036.
31. Mugerwa, S., Zziwa, E., and Kabirizi, J. 2013. Effect of fortifying Aflatoxin contaminated feeds with Ugandan bentonite on performance of broiler birds. *Applied Science Reports*. 3: 106-109.
32. Murray, H.H. 2005. Clay sorbents: the mineralogy, processing and applications. *Acta Geodynamica et Geomaterialia*. 2: 131-138.
33. Nag, S.K., Mahanta, S.K., Raikwar, M.K., and Bhadoria, B.K. 2007. Residues in milk and production performance of goats following the intake of a pesticide (endosulfan). *Small Ruminant Research*. 67: 235-242.
34. NRC, National Research Council. 2001. Nutrient requirement of dairy cattle. 7th ed. National Academic Sciences, Washington, DC.
35. Ørskov, E.R., and McDonald, I. 1979. The estimation of proteindegradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92: 499-503.

36. Pappas, A.C., Tsiplakou, E., Georgiadou, M., Anagnostopoulos, C., Markoglou, A.N., Liapis, A., and Zervas, G. 2014. Bentonite binders in the presence of mycotoxins: results of *in vitro* preliminary tests and an *in vivo* broiler trial. *Applied Clay Science*. 99: 48-53.
37. Patel, H.A., Somani, R.S., Bajaj, H.C., and Jasra, R.V. 2007. Synthesis and characterization of organic bentonite using Gujarat and Rajasthan clays. *Current Science*. 92: 1004-1009.
38. Reddy, S.J., Reddy, B.V., and Ramamurthi R. 1992. Effect of chronic insecticide phosalone toxicity on haem synthesis and blood gas composition in the rat. *Biochemistry International*. 26: 551-558.
39. Robinson, A., Johnson, N.M., Strey, A., Taylor, J.F., Marroquin-Cardona, A., Mitchell, N.J., Afriyie-Gyawu, E., Ankrah, N.A., Williams, J.H., Wang, J.S. Jolly, P.E., Nachman, R.J., and Phillips, T.D. 2012. Calcium montmorillonite clay reduces urinary biomarkers of fumonisin B1 exposure in rats and humans. *Food Additives and Contaminants*. 29: 809-818.
40. Romoser, A.A., Marroquin-Cardona, A., and Phillips, T.D. 2013. Managing risks associated with feeding aflatoxin contaminated feed. *Proceedings of the Tri-State Dairy Nutritional Conference*. Fort Wayne, Indiana, April 23-24, pp. 35-50.
41. SAS Institute INC. 2002. *Sas user's Guide: statistics*. Statistical Analysis Systems Institute Inc. Cary NC.
42. Singh, B.K., and Walker, A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 428-471.
43. Stern, M.D., Varga, G.A., Clark, J.H., Firkins, J.L., Huber, J.T., and Palmquist, D.L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 77: 2762-2786.
44. Stevenson, D.M., and Weimer, P. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 165-174.
45. Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z., Morrison, M., and Firkins, J.L. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *The Journal of Nutrition*. 134: 3378-3380.
46. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185-197.
47. Varadyova, Z., Baran, M., Siroka, P., and Styriakova, I. 2003. Effect of silicate minerals (zeolite, bentonite, kaolin, granite) on *in vitro* fermentation of amorphous cellulose, meadow hay, wheat straw and barley. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*. 116: 317-321.
48. Wallace, R.J., and Newbold, J. 1991. Effects of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and on rumen ciliate protozoa. *Journal of Agricultural Science*. 116: 163-168.
49. Williams, P.P., Robinson, J.D., Gutierrez, J., and Davis, R.E. 1963. Rumen bacterial and protozoal responses to insecticide substrates. *Journal of Applied Microbiology*. 11: 517-522.
50. Zhansheng, W., Chun, L., Xifang, S., Xiaolin, X., Bin, D., Jine, L., and Hongsheng, Z. 2006. Characterization, acid activation and bleaching performance of bentonite from Xinjiang. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 14: 253-258.



Laboratory evaluation of phosalone and diazinon on fermentation parameters and some rumen microbial population

M. Kazemi^{1*}, A.M. Tahmasbi², R. Valizadeh², A.A. Naserian², A. Eskandary Torbaghan³

¹Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Higher Education Complex of Torbat-e Jam,
²Prof., Dept. of Animal sciences, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, ³Dept. of Environmental Health Engineering, Torbat-e Jam Faculty of Medical Sciences
Received: 05/18/2017; Accepted: 08/19/2017

Abstract¹

Background and objectives: Organophosphate (OP) compounds such as phosalone and diazinon are a diverse group of chemicals used against a wide range of agricultural pests. Ruminant animals are raised in environments that may expose to a wide variety of pesticides. Exposure of animals to these types of pesticides may be intentional, such as the dermal application of various pesticides for control of insect and parasite infestation, or exposure may be accidental, such as the consumption of chemically-contaminated feed. The first concern is the potential deleterious effect of the chemical on the animal health. The second concern, particularly to animal food producers is health of livestock products. So the purpose of this experiment was to study the effect of diazinon and phosalone on the fermentation parameters, protozoa population and a ruminal fibrolytic bacteria species (*Butyrivibrio fibrisolvens*) in the culture medium using real-time PCR.

Materials and methods: Phosalone and diazinon, two organophosphate pesticides at three levels (0, 100 and 500 ppm) and sodium bentonite at two levels (0 and 2% of diet DM) were used with a factorial experiment 2×3×2 in a laboratory media according to completely randomized design. The gas production was measured and the some parameters were also estimated by the cumulative gas production technique. The total protozoa and the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* in the culture medium were determined by the real-time PCR.

Results: The cumulative gas production after 12, 24 and 48 h of incubation, and also the rate (c_{gas}) and potential gas production (b_{gas}) were significantly decreased when phosalone or diazinon were added to the culture medium. Adding phosalone and diazinon to the culture medium were significantly decreased the total estimated parameters such as organic matter degradability, metabolizable energy, net energy for lactation, microbial protein yield and short-chain fatty acids. Adding sodium bentonite (2%) to the culture medium also resulted in a significant decrease in the above-mentioned parameters. The protozoa population was significantly decreased following application of two pesticides to the culture medium, but ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* was not affected by the type of pesticide. Application of sodium bentonite in the culture medium also decreased significantly the population of protozoa and ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*.

*Corresponding author; phd1388@gmail.com

Conclusion: Using both diazinon and phosalone had negative effects on the gas production, estimated parameters and total protozoa. Toxicity of phosalone on the culture medium was more in comparison to diazinon. Sodium bentonite as a toxin-binder could not decrease the negative effects of both phosalone and diazinon in the culture medium and resulted in negative impacts on the gas production, estimated parameters, ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* and total protozoa.

Keywords: Pesticide, Phosalone, Diazinon, Gas production, Real-time PCR