

## تأثیر بنتونیت نانوساختار پیلارد بر عملکرد و فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون جوجه‌های گوشتی چالش یافته با آفلاتوکسین

حسن کیهانی یزدی<sup>۱</sup>، سید جواد حسینی واشان<sup>۲\*</sup>، نظر افزالی<sup>۳</sup>، محسن مجتهدی<sup>۴</sup> و علی اله‌رسانی<sup>۴</sup>

۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۴. استادیار گروه شیمی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۲)

### چکیده

هدف از این آزمایش، بررسی تأثیر بنتونیت سدیم پیلارد (PB) بر عملکرد، وزن نسبی اجزاء لاشه و فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون جوجه‌های گوشتی چالش‌یافته با آفلاتوکسین بود. بدین منظور از ۱۲۸ قطعه جوجه‌خروس یک‌روزه راس ۳۰۸ در یک طرح کامل تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار و هشت پرند در هر تکرار به مدت ۳۵ روز استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: شاهد منفی (C)، شاهد مثبت (جیره پایه + آفلاتوکسین<sub>1</sub> AFB<sub>1</sub>) و دو سطح ۰/۲۵ و ۰/۷۵ درصد بنتونیت نانو ساختار پیلارد (PB) که به جیره پایه آلوده به آفلاتوکسین<sub>1</sub> AFB<sub>1</sub> اضافه شد، میزان آفلاتوکسین در جیره‌های آلوده در دوره آغازین و رشد برابر ۵۰۰ppb و در پایانی ۱۰۰۰ppb بود. ستون حایل بودن (پیلارینگ) در بنتونیت سدیم باعث افزایش میزان اکسید آهن از ۱/۹۹ به ۸/۴۲ درصد و در بنتونیت سدیم از ۲/۴۳ به ۰/۴۳ درصد در بنتونیت پیلارد کاهش یافت. آفلاتوکسین باعث افزایش FCR و فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP در مقایسه با شاهد منفی شد. افزودن ۰/۲۵ درصد PB به جیره آلوده باعث افزایش مصرف خوراک، وزن بدن و کاهش ALT شد. افزودن ۰/۷۵ درصد PB باعث کاهش ALT و ALP در مقایسه با تیمار آلوده شد. بنابراین بنتونیت سدیم پیلارد باعث بهبود عملکرد و کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی در جوجه‌های تغذیه‌شده با آفلاتوکسین می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی، آفلاتوکسین در سطح ۱۰۰۰ نانوگرم در کیلوگرم اثری بر وزن بدن و مصرف خوراک نداشت و سطح ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلارد مناسب‌ترین پاسخ عملکردی را در جوجه‌های تغذیه‌شده با آفلاتوکسین داشت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های کبدی، چربی شکمی، ضریب تبدیل خوراک، کلسترول، لاکتات دهیدروژناز.

## Effect of Pillaring bentonite nanostructure on performance and blood parameters of broiler chicken challenged with Aflatoxin B<sub>1</sub>

Hassan Kihani-Yazdi<sup>1</sup>, Seyyed Javad Hosseini-Vashan<sup>2\*</sup>, Nazar Afzali<sup>3</sup>, Mohsen Mojtahdi<sup>2</sup> and Ali Allahressani<sup>4</sup>

1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Assistant Professor and Professor, Department of Animal Science, University of Birjand, Birjand, I.R. Iran

4. Assistant Professor, Department of Chemistry, University of Birjand, Birjand, I.R. Iran

(Received: Aug. 13, 2017 - Accepted: May 23, 2018)

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of Pillaring bentonite nanostructure on growth performance, carcass components and blood parameters of broilers challenged by aflatoxin (AF). A total of 128 day-old Ross 308 broiler chicks in a completely randomized design were randomly allotted to 4 treatments, 4 replicates and 8 birds in each. The birds were reared for 35 days. Experimental groups consisted of: negative control (C), positive control (basal diet with aflatoxin) (AF) and two level 0.25 and 0.75 % of Pillared bentonite added to basal diet with aflatoxin B<sub>1</sub> (positive control). The Pillaring process increased the concentration FeO (1.99 to 8.42%) and decreased concentration Na<sub>2</sub>O (2.43 to 0.43 %) in Pillared bentonite as compared to sodium bentonite. The aflatoxin increased feed conversion ratio and enzyme activity ALP and ALT as compared to control diet. Supplementation of 0.25% Pillared bentonite to the infected diet of broilers increased the feed intake and body weight and decreased the concentration of ALT. Addition 0.75% Pillared bentonite increased the concentration of ALT and ALP as compare to positive control. Therefore, the supplementation of Pillared bentonite nanostructure to broiler diets infected with aflatoxin improved the performance and reduced the liver enzyme activity. The results of present research showed that Aflatoxin may had no effect on body weight and feed intake of broilers and the levels of 0.25 Pillared bentonite nanostructure has the best efficient on performance of broiler fed diets contained aflatoxin.

**Keywords:** Abdominal fat, cholesterol, feed conversion ratio, liver enzyme, lactate dehydrogenase.

\* Corresponding author E-mail: jhosseiniv@birjand.ac.ir

### مقدمه

یکی از آلودگی‌ها که موجب تهدید سلامتی، کاهش بازده (راندمان) تولید و کاهش کیفیت گوشت طیور می‌شود، وجود قارچ‌ها و سم‌ها یا زهرابه‌های تولیدی توسط آن‌ها در خوراک طیور است. بر پایه گزارش‌های سازمان خواربار کشاورزی و جهانی (فائو)<sup>۱</sup> سالانه حدود ۲۰ درصد از محصولات غذایی در جهان توسط سم‌ها یا زهرابه‌های قارچی آلوده می‌شوند که در این آلودگی، آفاتوکسین‌ها بیشترین سهم را به خود اختصاص داده‌اند (Reddy & Wailer, 2000). آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) و سازمان بهداشت جهانی (WHO)<sup>۲</sup>، آفاتوکسین‌ها را به‌عنوان گروه درجه یک سرطان‌زا برای انسان معرفی کرده است (McLean et al., 1995). قارچ‌های مولد آفاتوکسین روی مواد مختلف و در شرایط گوناگون رطوبت، اسیدیته و دما رشد و افزونش می‌یابند. بیش از ۲۰ مشتق آفاتوکسینی (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) وجود دارد که آفاتوکسین B<sub>1</sub> سمی‌ترین آن‌ها است (Hussein et al., 2001)، انتقال آفاتوکسین B<sub>1</sub> به تخم‌مرغ، شیر و مقاوم بودن آفاتوکسین M<sub>1</sub> موجود در شیر در برابر استریلیزاسیون و پاستوریزاسیون، ضرورت چاره‌اندیشی در زمینه مهار (کنترل) زهرابه‌های قارچی به‌ویژه آفاتوکسین‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به افزایش رو به رشد مصرف محصولات طیور باید فرآورده‌هایی سالم و بدون عامل‌های سمی و میکروبی همچون آفاتوکسین‌ها را تولید کرد. از سوی مایکوتوکسین‌ها حتی در غلظت‌های پایین برای طیور زیانبار بوده و تأثیر خود را روی بدن طیور از طریق تغییر در سوخت‌وساز (متابولیک) طبیعی اندام‌های مختلف اعمال می‌کنند (Whiaker et al., 1996).

یکی از روش‌های رایج برای جذب زهرابه‌های قارچی در جیره طیور استفاده از مواد جاذب غیرمغذی در جیره به‌منظور ترکیب شدن با آفاتوکسین و کاهش جذب آن‌ها از طریق دستگاه گوارش است (Jindal et al., 1994). تاکنون از زئولیت طبیعی،

آلومینیوسیلیکات‌ها (بنتونیت)، دیواره یاخته‌ای مخمر و زغال فعال برای کاهش سمیت آفاتوکسین‌ها در خوراک طیور استفاده شده است (Huwang et al., 2001). رس‌ها گروه خاصی از آلومینیوسیلیکات‌های آبدار با ساختار بلورین لایه‌ای هستند. کانی‌های رسی بخش مهمی از خانواده آلومینیوسیلیکات‌های آبدار یا فیلیوسیلیکات‌ها را تشکیل می‌دهند، یکی از روش‌های اصلی شناسایی رس‌ها اندازه ذراتشان است. در علم زمین‌شناسی و رسوب‌شناسی، اندازه رس‌ها کمتر از ۴ میکرومتر تعریف می‌شود. اصطلاح ذرات نانویی یا نانوبلورها مشخص‌کننده ذراتی است که نظم بلورینی در حدود اندازه نانومتر (۱۰<sup>-۹</sup> متر) دارند و با شناخت دقیق‌تر کانی‌های رسی در این مقیاس، نقش آن‌ها را در محیط بهتر و آسان‌تر شناخت پیدا می‌کنیم (Razm arar & Ghafory, 2006). آلومینیوسیلیکات‌ها به دلیل باردار بودن ساختارشان، در جهت خنثی کردن بار خود با زهرابه‌های قطبی از جمله آفاتوکسین متصل می‌شوند از میان این جاذب‌ها، بنتونیت به دلیل ویژگی جذبی بالا، توانایی جذب آفاتوکسین در بررسی‌های آزمایشگاهی و کاهش تأثیر سوء گروه آفاتوکسین را در بررسی‌های مزرعه‌ای نشان داده است (Lemke et al., 2001; Phillips, 1998). در نتایج بررسی گزارش شد، فرآوری بنتونیت باعث افزایش قابلیت جذب آفاتوکسین نسبت به بنتونیت می‌شود. در این بررسی درصد جذب آفاتوکسین به بیوتکس و مایکوزورب از بنتونیت فرآوری شده بیشتر بود و بنتونیت طبیعی کمترین درصد جذب آفاتوکسین را نشان داد (Savari et al., 2013).

مفهوم ستون حایل بودن (پیلارینگ) اغلب برای موادی با ذرات ریز که قابلیت مقاومت در شرایط محیطی متفاوت را دارند اطلاق می‌شود (Bergaya et al., 2006). در دهه ۱۹۷۰ ترکیب‌های بین لایه‌ای رس (پیلارد) با استفاده از اکسیدهای فلزی به دست آمد (Michell, 1990). این مواد که امروزه با نام رس‌های پیلارد شناخته می‌شوند شامل کاتیون‌های قابل تبادل بین لایه‌ای در رس‌ها به همراه اکسیدهای فلزی غیر آلی و مقاوم شده هستند. افزودن

1. Food & Agriculture Organization (F.A.O)

شد و پس از هفت روز نگهداری (انکوباسیون) در دمای  $28^{\circ}\text{C}$ ، از محیط برای کشت دادن روی برنج‌ها استفاده شد (Ritter *et al.*, 2011). درون هر فلاسک ارلن مایر (۲۵۰ سی‌سی) ۳۰ گرم برنج ریخته و ۱۷ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ارلن افزوده و درب ارلن‌ها با پنبه بسته و روی آن فویل آلومینیومی قرار داده شد و در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و فشار ۱۵ lb/In<sup>2</sup> به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو (استریل) شد سپس در محیط سترون قسمتی از محیط کشت پتری‌دیش توسط آنس جدا شد و به درون ارلن‌ها اضافه و در ارلن‌ها با پنبه بسته شد و درون اتاقک رشد (انکوباتور) به مدت ۷ روز قرار گرفت (Shotwell *et al.*, 1966). در این دوره، سه بار فلاسک‌ها با رعایت نکات بهداشتی تکان داده شد. پس از آن نمونه‌ها اتوکلاو و در محیطی به دور از نور خشک شد، غلظت سم توسط دستگاه فام‌نگاری (کروماتوگرافی) با عملکرد بالا (HPLC)<sup>۲</sup> تعیین شد. بر پایه غلظت آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در نمونه‌های آلوده، میزان مورد نیاز به جیره‌های آزمایشی آلوده (۵۰۰ ppb) در آغازین و رشد و (۱۰۰۰ ppb در جیره پایانی) اضافه شد.

#### تهیه و تولید بنتونیت پیلارد

برای این منظور، در آغاز نمونه بنتونیت سدیم از معدن‌های اطراف گناباد تهیه و با آسیاب ریموند خرد و دانه‌بندی شد و دوباره در آزمایشگاه با استفاده از لرزای (شیکر) مکانیکی و الک ذرات ۲۰۰ Mash (۷۴ میکرون) جدا شد. نمونه بنتونیت در آغاز باید بدون مواد آلی شده تا فرآیند ستون حایل بودن به‌درستی انجام شود. یون مورد استفاده برای ستون حایل بودن بنتونیت در این پژوهش آهن ( $\text{Fe}^{+}$ ) و به‌صورت کلرید آهن بود، ستون حایل بودن همسان روش Yurdakoc *et al.* (2008) انجام شد. سپس نمونه اولیه و نمونه پیلارد به‌منظور بررسی تغییر ایجاد شده در فرآیند فرآوری مورد آزمون طیف‌نگاری فلورسانس اشعه ایکس (XRF) قرار گرفتند. با تعیین طول‌موج پرتو ایکس ثانویه مربوط به هر عنصر، میزان عنصرهای

کاتیون‌های فلزی به بین لایه‌های رس باعث افزایش فضای بین لایه‌ای می‌شوند که با افزایش دما در نتیجه آب‌زدایی و دهیدروکسیله کردن به اکسیدهای فلزی خوشه‌ای تبدیل می‌شوند و این اکسیدهای فلزی خوشه‌ای، ستون<sup>۱</sup> نامیده می‌شوند که در بین لایه‌ای رسی قرار گرفته و در اثر گرما دهی این ستون‌ها، از فروپاشی آن‌ها جلوگیری می‌کنند. در نتیجه فضای بین لایه‌ای رس به حالت شبکه‌ای در می‌آید (Gil *et al.*, 2010). در سال‌های اخیر چینی‌ها با استفاده از یون‌های  $\text{Fe}^{3+}$  و  $\text{Al}^{3+}$  مونتموریلونیت (بافت اصلی بنتونیت) را پیلارد کردند و تأثیر بنتونیت پیلارد را بر میزان جذب سم آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در مقیاس آزمایشگاهی اندازه‌گیری کردند (Zeng *et al.*, 2014). با توجه به اینکه در مقیاس مزرعه‌ای تاکنون تحقیقاتی روی جذب آفلاتوکسین جیره طیور توسط مواد پیلارد شده انجام نشده است، در فرآیند ستون حایل بودن جابه‌جایی کاتیون‌های فلزی بین لایه‌ها صورت می‌گیرد این جابه‌جایی باعث تغییر در فاصله بین لایه‌های بنتونیت و از سویی باعث افزایش تخلخل بافت و افزایش بار کاتیون بنتونیت پیلارد می‌شود (Tomul, 2011; 2012). انتظار می‌رود با افزایش تخلخل و بار کاتیونی قابلیت جذب سم‌ها افزایش یابد. با توجه به این نکته تاکنون در رابطه با ستون حایل بودن بنتونیت نانوساختار در جیره طیور در راستای کاهش جذب آفلاتوکسین تحقیقاتی انجام نشده است، بنابراین هدف از این بررسی، ارزیابی تأثیر ستون حایل بودن بنتونیت سدیم (PB) بر عملکرد، وزن نسبی اجزاء لاشه و فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون جوجه‌های گوشتی چالش یافته با آفلاتوکسین B<sub>1</sub> بود.

## مواد و روش‌ها

### مراحل آزمایشگاهی

#### تولید آفلاتوکسین

در محیط سترون (استریل) قارچ آسپرژیلوس-پارازیتیکوس سویه NRRL 2999 روی پتری‌دیش حاوی محیط کشت مخمر آگار (YEA) کشت داده

در ۳۵ روزگی، یک قطعه پرنده از هر تکرار آزمایشی خون‌گیری و فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون شامل غلظت پروتئین تام (TP)، کلسترول (CHOL)، تری‌گلیسرید (TG)، لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا (HDL)، فعالیت آنزیم‌های آسپارات‌آمینوترانسفراز (AST)، آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT)، لاکتات-دهیدروژناز (LDH)، آلکالین فسفاتاز (ALP) توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون، بر پایه روش‌های استاندارد آزمایشگاهی و توسط دستگاه طیف‌سنجی و تجزیه‌گر خودکار (اوتوانالایزر) مدل جسان چم ۲۰۰ ایتالیا<sup>۱</sup> اندازه‌گیری شد. برای محاسبه لیپوپروتئین‌ها با چگالی پایین (LDL) از رابطه (۱) استفاده شد (Friedewald *et al.*, 1972).

$$LDL = TC - (HDL + TG/5) \quad (1)$$

تجزیه آماری داده‌های آزمایشی توسط نرم‌افزار SAS و مدل خطی عمومی (GLM) با رابطه (۲) تجزیه واریانس شد، مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با آزمون توکی در سطح احتمال ( $P < 0.05$ ) انجام گرفت.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (2)$$

که در آن  $Y_{ij}$ : متغیر وابسته،  $\mu$ : میانگین صفت،  $T_i$ : اثر تیمار،  $e_{ij}$ : اثر خطای آزمایشی می‌باشد.

## نتایج و بحث

### طیف‌سنجی XRF

نتایج طیف‌سنجی XRF نمونه بنتونیت سدیم و پیلارد در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد، میزان اکسید آهن در نمونه بنتونیت سدیم از ۱/۹۹ به ۸/۴۲ درصد در نمونه بنتونیت پیلارد افزایش یافت. میزان اکسید سدیم نیز در بنتونیت سدیم از ۲/۴۳ به ۰/۴۳ درصد در بنتونیت پیلارد کاهش یافت که نشان‌دهنده جایگزینی آهن در بین لایه‌های بنتونیت است. میزان اکسید آهن  $Fe_2O_3$  اضافه شده به بنتونیت برابر با ۶/۴۳ بود و با توجه به اینکه نسبت جرم مولکولی  $Fe_2/Fe_2O_3$  برابر ۰/۷ است از حاصل ضرب میزان اکسید آهن (۶/۴۳) و نسبت جرم مولکولی میزان یون

موجود را می‌توان اندازه‌گیری کرد (Asadifard *et al.*, 2013; Golestani Fard *et al.*, 2006). افزون بر این، به‌منظور بررسی ساختار بلوری و فاصله بین صفحات بنتونیت نمونه‌ها توسط آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) بررسی شدند. ناحیه پرتو X در طیف الکترومغناطیس در محدوده بین پرتوگاما و فرابنفش قرار دارد با تاباندن پرتو X به نمونه، اطلاعاتی در رابطه با ساختار، اندازه‌گیری میانگین فاصله بین لایه‌ها و تعیین موقعیت تک‌بلورها به دست آمد (Marashi *et al.*, 1995; Masumy, 2004).

### مراحل مزرعه‌ای آزمایش

در این پژوهش از ۱۲۸ قطعه جوجه خروس یک‌روزه راس ۳۰۸ در یک طرح کامل تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار و هشت پرنده در هر تکرار به مدت ۳۵ روز استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) شاهد منفی (C)، (۲) شاهد مثبت (جیره پایه + آفلاتوکسین  $AFB_1$ ، (۳) جیره پایه + آفلاتوکسین  $AFB_1$  + ۰/۲۵ درصد بنتونیت نانو ساختار پیلارد (PB) و (۴) جیره پایه + آفلاتوکسین  $AFB_1$  + ۰/۷۵ درصد بنتونیت نانو ساختار پیلارد (PB) که به جیره پایه آلوده به آفلاتوکسین  $AFB_1$  اضافه شد، میزان آفلاتوکسین افزوده شده به جیره‌های آلوده در دوره آغازین و رشد برابر ۵۰۰ ppb و در دوره پایانی ۱۰۰۰ ppb آفلاتوکسین بود. جیره‌های غذایی در قالب سه دوره آغازین (۱۰-۱ روزگی)، رشد (۲۴-۱۱ روزگی) و پایانی (۳۵-۲۵ روزگی) در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. ترکیب مواد خوراکی جیره‌های آزمایشی دوره‌های آغازین، رشد و پایانی و مواد مغذی محاسبه شده آن‌ها در جدول (۱) ارائه شده است. توزین پرنده‌ها و خوراک مصرفی هر تکرار در پایان سه دوره ۱۰-۰ روزگی، ۲۱-۱۱ روزگی و ۳۵-۲۲ روزگی انجام و ضریب تبدیل خوراک نیز برای دوره‌های یادشده محاسبه شد. در سن ۳۵ روزگی از هر تکرار دو قطعه پرنده به روش ذبح اسلامی کشتار و وزن نسبی اجزای لاشه شامل، سینه، ران، کبد، قلب، سنگدان، پیش‌معدة، طحال، چربی بطنی و بورس فابرسیوس در مقایسه با وزن زنده پرنده محاسبه شد.

بنتونیت پیلارد نسبت به بنتونیت سدیم کاهش یافت که نشان‌دهنده پیلارد شدن بنتونیت است ( Zhirong *et al.*, 2011; Caglar *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015).

آهن خالص قرار گرفته در بین لایه‌های بنتونیت برابر با ۴/۵ درصد ( $Al_2O_3$ ) برآورد شد. مجموع  $Al_2O_3 + SiO_2$  در بنتونیت سدیم برابر ۷۷/۳۴ و در نمونه بنتونیت پیلارد برابر ۷۴/۷۸ بود. این نسبت در

جدول ۱. اجزاء تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه در دوره‌های آغازین، رشد و پایانی

Table 1. Ingredients and chemical composition of the basal diet used for starter, grower and finisher period

Ingredients (%)	Starter	Grower	Finisher
Corn	53.29	56.86	59.06
Soya bean meal	35.60	33.98	32.52
Fish meal	5.00	2.50	-
Soybean oil	2.68	3.14	4.70
Carbonate calcium	1.15	1.16	1.26
Dicalcium phosphate	1.07	1.22	1.51
Vitamin Premix*	0.25	0.25	0.25
Mineral Premix*	0.25	0.25	0.25
Salt	0.40	0.40	0.30
DL- Methionine	0.25	0.24	0.15
Lysine Hydrochloride	0.06	-	-
Chemical composition (%)			
Metabolizable energy (Kcal kg)	3000	3050	3150
Crud protein	22	21	19
Lysine	1.45	1.33	1.17
Methionine + cysteine	1.15	0.99	0.83
Calcium	0.97	0.90	0.90
Available phosphorus	0.48	0.450	0.450

\* هر کیلوگرم مکمل ویتامینی کانی تأمین‌کننده موارد زیر است: ۹۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۴۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳ گرم ویتامین K3، ۲ گرم ویتامین B1، ۷ گرم ویتامین B2، ۱۴ گرم ویتامین B3، ۵۵ گرم ویتامین B5، ۳ گرم ویتامین B6، ۱/۷۵ گرم ویتامین B9، ۰/۱۵ گرم ویتامین B12، ۶۲۵ گرم کولین، ۱۲۰ گرم منگنز، ۴۰ گرم آهن، ۱۰۰ گرم روی، ۱۶ گرم مس، ۱/۲۵ گرم ید، ۰/۳ گرم سلنیوم.

جدول ۲. تعیین درصد وزنی اکسید عنصرها در ترکیب بنتونیت توسط دستگاه XRF

Table 2. Determining the composition weight percentage of the elements oxide in bentonite samples by XRF

Element oxide	Percentage weight sodium bentonite	Percentage weight pillared bentonite
SO <sub>3</sub>	0.592	1.252
MgO	2.092	2.083
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0.004
MnO	0.030	0.010
CoO	-	0.012
ZnO	0.011	0.013
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0.016
SrO	0.019	0.019
ZrO <sub>2</sub>	0.028	0.022
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	0.044
BaO	-	0.050
TiO <sub>2</sub>	0.263	0.269
K <sub>2</sub> O	0.300	0.269
Cl	0.797	0.351
Na <sub>2</sub> O	2.432	0.433
CaO	2.706	1.696
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.994	8.424
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	11.612	10.413
SiO <sub>2</sub>	65.728	64.347
L.O.I (1025 <sup>c</sup> , 1 hrs)	11.397	10.273

افزایش یافت. بر پایه این نتایج، نسبت مجموع سدیم و پتاسیم به کلسیم (Na + K/Ca) در بنتونیت پیلارد در مقایسه با بنتونیت سدیم به دلیل خروج سدیم از بین لایه‌ها و قرار گرفتن آهن به جای آن از ۱ به ۰/۴ درصد کاهش یافته است که با نتایج Zhirong *et al.* (2011).

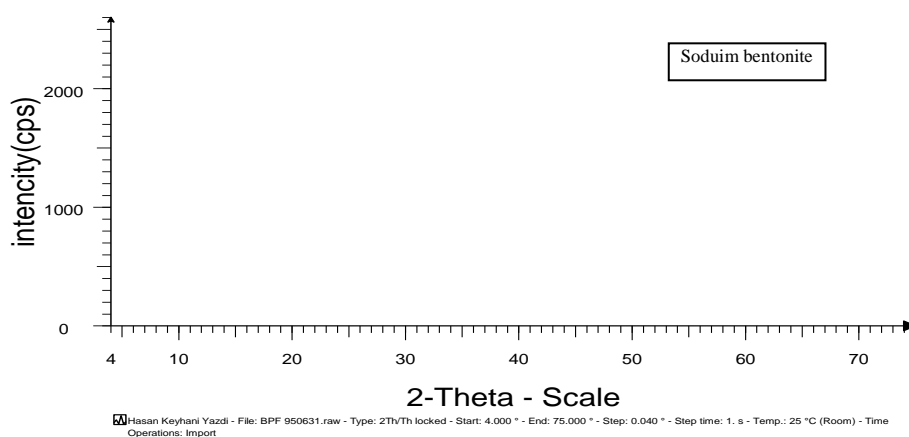
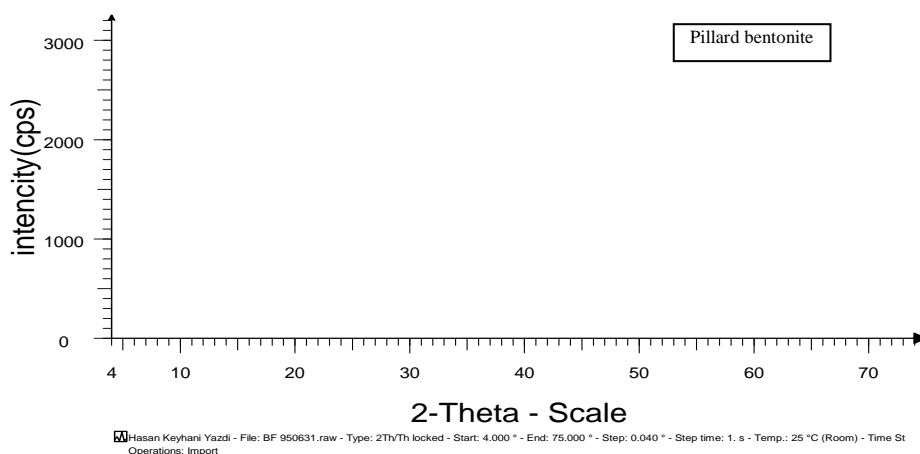
نتایج نشان داد، نسبت  $SiO_2$  به  $Al_2O_3$  ( $SiO_2/Al_2O_3$ ) در بنتونیت پیلارد برابر با ۶/۱۸ و در بنتونیت سدیم برابر ۵/۶۶ بود و بر پایه گزارش‌های Zhirong *et al.* (2011) و Caglar *et al.* (2015) و Chen *et al.* (2015) نسبت  $SiO_2$  به  $Al_2O_3$  در فرآیند ستون حایل بودن

به دلیل وارد شدن یون‌های آهن در بین لایه‌های بنتونیت که به صورت هیدروکسید آهن هستند. فاصله بین لایه‌های افزایش می‌یابد، اما پس از کلسینه کردن که به منظور مستحکم ساختن ساختار پیلارد استفاده می‌شود گروه‌های هیدروکسیل در نتیجه دما از بین لایه‌ها خارج شده و باعث کاهش فاصله بین لایه‌های می‌شود کلسینه کردن در دمای بالاتر از  $200^{\circ}\text{C}$  باعث تثبیت کاتیون‌ها در بین لایه‌های بنتونیت شده و از فروپاشی لایه‌ها جلوگیری کرده و ساختار متخلخلی ایجاد می‌کند (Gil *et al.*, 2010). بنابر این نتایج، کلسینه کردن باعث تخلخل یافت بنتونیت پیلارد و افزایش سطح بنتونیت می‌شود (Tomul, 2011; 2012). انتظار می‌رود با افزایش سطح و تخلخل یافت بنتونیت پیلارد، قابلیت جذب آفاتوکسین افزایش می‌یابد.

Chen *et al.* (2015) و Caglar *et al.* (2015) همخوانی دارد. از سویی کاهش میزان CaO در بنتونیت پیلارد در مقایسه با بنتونیت سدیم نشان‌دهنده این است که احتمال دارد افزون بر جایگزینی آهن با سدیم بین لایه‌های، آهن با میزانی از کلسیم موجود در بین لایه‌های بنتونیت سدیم نیز جایگزین شده باشد.

### طیف‌سنجی XRD

داده‌های به دست آمده از طیف‌سنجی XRD نشان داد، در قسمت مونتموریلونیت (بافت اصلی بنتونیت) فاصله لایه‌ها برابر با  $1/54$  نانومتر (آنگستروم  $15/4 = d_{001}$ ) است ( $2\theta = 7/1$ ) و در نمونه بنتونیت پیلارد کلسینه برابر با  $0/551$  نانومتر ( $5/51$  آنگستروم  $d_{001}=5/51$ ) است. در فرایند ستون حایل بودن



شکل ۱. طیف‌سنجی XRD بنتونیت سدیم و بنتونیت نانوساختار پیلارد  
Figure 1. XRD spectroscopy of Soduim bentonite and pillard nanostructure bentonite

## عملکرد

همخوانی دارد (Kermanshahi *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2005; Miazzo *et al.*, 2005). بر پایه گزارش‌های پیشین، با افزایش سطح آفلاتوکسین جیره (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ppb)، وزن بدن جوجه‌های گوشتی در مقایسه با شاهد کاهش یافت (Fani Makki *et al.*, 2013). در بررسی دیگر، کاهش وزن ۱۰ و ۱۵ درصدی به ترتیب در سن ۲۱ و ۴۲ روزگی جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره آلوده با ۱ mg/kg آفلاتوکسین گزارش شد (Denli *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2009). این کاهش وزن می‌تواند به دلایلی همچون کاهش و اختلال در هضم و جذب پروتئین، ساخت پروتئین، اختلال در جذب مواد مغذی و اختلال در تولید و ترشح آنزیم‌های گوارشی در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین B<sub>1</sub> باشد (Devegowda *et al.*, 1998). افزودن دو سطح ۰/۲۵ و ۰/۷۵ درصد بنتونیت پیلارد نانو ساختار به جیره آلوده به آفلاتوکسین باعث بهبود رشد و افزایش وزن جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار شاهد آلوده شد این افزایش وزن در دوره آغازین در سطح ۰/۷۵ درصد و در دوره رشد در سطح ۰/۲۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار مشاهده شد. دلیل این بهبود وزن جوجه‌ها می‌تواند به دلیل ساختار آن باشد. رس‌های پیلارد، تخلخل و سطح جذب بالاتری برای آفلاتوکسین دارند (Tomul, 2011; 2012). سطح ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلارد در مقایسه با سطح ۰/۷۵ عملکرد بهتری را در افزایش وزن نشان داد، احتمال دارد به این دلیل فضای کمتری در جیره به خود اختصاص دهد و از رقیق شدن جیره جلوگیری می‌کند. با توجه به بالا بودن یون آهن در بنتونیت پیلارد، به احتمال یون آهن بنتونیت پیلارد می‌تواند باعث افزایش غلظت یون آهن در خون و کمک به ساخت گلبول قرمز و در نتیجه بهبود وزن شود (Tomul, 2011; 2012).

تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره حاوی آفلاتوکسین باعث افزایش ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با شاهد در دوره رشد و کل دوره آزمایشی شد (۰/۰۵ < P؛ جدول ۳). از آنجایی‌که تأثیر منفی بر مصرف خوراک و وزن بدن جوجه‌های آلوده به آفلاتوکسین دارد، انتظار می‌رود به‌طور منفی باعث افزایش ضریب تبدیل خوراک شود. در بررسی‌های

داده‌های مرتبط با صفات عملکردی پرندگان آزمایشی در جدول ۳ ارائه شده است. تحلیل داده‌ها نشان داد، افزودن ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلارد نانوساختار به جیره پایه آلوده به آفلاتوکسین باعث افزایش مصرف خوراک در دوره‌های مختلف پرورش نسبت به تیمار آلوده و شاهد شد که این افزایش مصرف خوراک در کل دوره پرورش و دوره‌های رشد و پایانی به لحاظ آماری معنی‌دار بود. بر پایه گزارش Rosa *et al.* (2001) استفاده از ۰/۳ درصد بنتونیت در جیره جوجه‌های گوشتی تأثیر منفی بر مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی نداشت و استفاده از ۰/۳ بنتونیت در جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین باعث بهبود مصرف خوراک جوجه‌ها در مقایسه با تیمار آلوده شد. در این بررسی، افزودن ۰/۷۵ درصد بنتونیت پیلارد به جیره پایه آلوده به آفلاتوکسین باعث بهبود مصرف خوراک در دوره‌های پرورش و کل دوره آزمایش در مقایسه با شاهد منفی و شاهد مثبت شد (P < ۰/۰۵). در نتیجه استفاده از سطوح بنتونیت پیلارد در جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین افزون بر افزایش مصرف خوراک جوجه‌ها در مقایسه با شاهد مثبت باعث بهبود و افزایش مصرف خوراک جوجه‌ها فراتر از تیمار شاهد منفی نیز شد. افزایش مصرف خوراک جوجه‌ها در جیره‌های حاوی بنتونیت پیلارد افزون بر دلایل بالا، می‌تواند به دلیل pH پایین بنتونیت پیلارد (pH=۴/۵۳) باشد که همسان فرضیه استفاده از اسیدهای آلی در جیره و تأثیر آن‌ها بر کاهش باکتری‌های زینباز دستگاه گوارش مانند سالمونلاها و بهبود شرایط دستگاه گوارش برای افزایش باکتری‌های سودمند مانند لاکتوباسیلها و همچنین تحریک ترشح آنزیم‌های هضمی پانکراس باشد (Shalaei *et al.*, 2013; Jafari Sayadi *et al.*, 2016) که در نتیجه باعث هضم و جذب بهتر خوراک در دستگاه گوارش می‌شود.

تأثیر آفلاتوکسین و بنتونیت سدیم پیلارد بر افزایش وزن جوجه‌های گوشتی نشان داد، تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره آلوده به آفلاتوکسین باعث کاهش وزن نسبت به تیمار شاهد در دوره‌های پرورش و کل دوره شد (۰/۰۵ < P؛ جدول ۳) که با نتایج بسیاری از محققان

در نتیجه این عامل‌ها باعث افزایش ضریب تبدیل غذایی جوجه‌ها می‌شوند. افزودن سطوح بنتونیت پیلارد تأثیر معنی‌داری بر ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های آلوده نداشتند بر پایه گزارش‌های پیشین تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره آلوده به ۲/۵ mg/kg آفاتوکسین و حاوی ۰/۳ درصد بنتونیت (Miazza *et al.*, 2005) و افزودن ۱ درصد بنتونیت سدیم به جیره‌های آلوده به ۵۰۰ ppb و ۱۰۰۰ آفاتوکسین تأثیری بر ضریب تبدیل غذایی جوجه‌ها در مقایسه با تیمار آلوده نداشتند (Kermanshahi *et al.*, 2009).

پیشین، تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره‌های آلوده به سطوح ۵۰۰ ppb، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ باعث افزایش ضریب تبدیل غذایی جوجه‌ها شد (Dos Anjos *et al.*, 2015; Yalagod, 2014). آفاتوکسین باعث آسیب به بافت کبد و کلیه از طریق فعال‌سازی مسیرهای اکسایشی (اکسیداتیو) و افزایش این مواد در یاخته‌های کبدی و کلیوی می‌شود (He *et al.*, 2004). آسیب کبدی باعث اختلال در سوخت‌وساز (متابولیسم) پروتئین‌ها و دیگر متابولیت‌های خونی شده و فعالیت آنزیم‌های پانکراس از جمله آمیلاز و تریپسین در نتیجه آلودگی جیره به آفاتوکسین کاهش می‌یابد (Richard *et al.*, 1983).

جدول ۳. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های عملکردی جوجه‌های گوشتی چالش یافته با آفاتوکسین B1

	Experimental treatment				SEM	P- value
	T1	T2	T3	T4		
	Feed intake (g/bird)					
1-10 d	182.16	177.26	181.56	184.53	1.751	0.3292
11-21 d	757.09 <sup>ab</sup>	703.42 <sup>b</sup>	786.10 <sup>a</sup>	785.93 <sup>a</sup>	14.251	0.0149
22-35 d	1916.47 <sup>b</sup>	1866.64 <sup>b</sup>	2132.98 <sup>a</sup>	2010.49 <sup>ab</sup>	51.512	0.0159
1-35 d	2803.05 <sup>b</sup>	2801.00 <sup>b</sup>	3111.63 <sup>a</sup>	2995.96 <sup>ab</sup>	67.485	0.0168
	Body weight gain (g/bird)					
1-10 d	172.56 <sup>a</sup>	152.48 <sup>b</sup>	161.59 <sup>ab</sup>	167.56 <sup>a</sup>	2.508	0.0156
11-21 d	501.22 <sup>b</sup>	502.25 <sup>b</sup>	543.92 <sup>a</sup>	500.91 <sup>b</sup>	8.169	0.0345
22-35 d	1021.79	993.57	999.38	1006.17	27.231	0.1617
1-35 d	1687.57	1550.29	1696.88	1666.64	40.076	0.0807
	Feed conversion ratio					
1-10 d	1.06 <sup>b</sup>	1.16 <sup>a</sup>	1.12 <sup>ab</sup>	1.10 <sup>ab</sup>	0.0325	0.0221
11-21 d	1.43 <sup>b</sup>	1.53 <sup>a</sup>	1.47 <sup>b</sup>	1.59 <sup>a</sup>	0.0102	0.0362
22-35 d	1.87 <sup>b</sup>	1.99 <sup>ab</sup>	2.13 <sup>a</sup>	2.00 <sup>ab</sup>	0.040	0.0069
1-35 d	1.66 <sup>b</sup>	1.80 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	0.025	0.0021

میانگین‌های با حرف‌های غیر همسان در هر ردیف اختلاف معنی‌دار دارند ( $P < 0.05$ ).

T1: شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، T2: جیره پایه + آفاتوکسین B1 (AFB1)، T3: جیره پایه + آفاتوکسین B1 + ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلاردشده نانو ساختار، T4: جیره پایه + آفاتوکسین B1 + ۰/۷۵ درصد بنتونیت پیلاردشده نانو ساختار

Mean with different alphabets are statistically different ( $P < 0.05$ ).

T1: control (C), T2: control + aflatoxin B1 (AF), T3: control diet + aflatoxin B1 and 0/25%PB, T4: control diet + aflatoxin B1 and 0.75% PB.

جدول ۴. تأثیر تیمارهای آزمایشی مختلف بر وزن نسبی اجزای لاشه (درصد) و اندام‌های داخلی جوجه‌های گوشتی در سن ۳۵ روزگی چالش یافته با آفاتوکسین B1

Table 4. Effects of experimental treatments on carcass components and internal organs broiler chickens challenged with aflatoxin B1 at 35 days old

	Experimental treatment				SEM	P- value
	T1	T2	T3	T4		
Carcass	63.94	62.09	62.29	60.20	1.131	0.5577
Back & neck	20.95	21.28	19.89	20.48	0.6628	0.5023
Breast	22.79	22.90	23.69	21.21	0.2102	0.7844
Thigh	18.18	17.91	18.70	18.50	0.398	0.5310
Abdominal fat	1.22	1.50	1.24	1.41	0.104	0.2311
Gizzard	1.42	1.53	1.44	1.68	0.106	0.3380
Proventriculus	0.44	0.44	0.42	0.48	0.018	0.1933
Pancreas	0.24	0.23	0.25	0.26	0.012	0.4310
Heart	0.64	0.65	0.60	0.56	0.036	0.3496
Liver	2.52	2.54	2.46	2.07	0.128	0.0754
Bursa	0.19	0.18	0.22	0.23	0.022	0.4182
Spleen	0.11	0.12	0.11	0.10	0.008	0.6248

میانگین‌های با حرف‌های غیر همسان در هر ردیف اختلاف معنی‌دار دارند ( $P < 0.05$ ).

T1: شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، T2: جیره پایه + آفاتوکسین B1 (AFB1)، T3: جیره پایه + آفاتوکسین B1 + ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلاردشده نانو ساختار، T4: جیره پایه + آفاتوکسین B1 + ۰/۷۵ درصد بنتونیت پیلاردشده نانو ساختار

Mean with different alphabets are statistically different ( $P < 0.05$ ).

T1: control (C), T2: control diet + aflatoxin B1 (AF), T3: control diet + aflatoxin B1 and 0/25%PB, T4: control diet + aflatoxin B1 and 0.75% PB



۰/۷۵ درصد بنتونیت پیلارد به جیره‌های آلوده باعث کاهش آنزیم لاکتات دهیدروژناز شد بر پایه گزارش Eraslan *et al.* (2005) افزودن ۰/۲۵ درصد بنتونیت سدیم به جیره آلوده به ۱ ppm آفلاتوکسین باعث کاهش LDH و ALP و کاهش معنی‌دار ALT در مقایسه با تیمار آلوده شد. این یافته‌ها گویای آن است افزودن بنتونیت پیلارد شده به جیره آلوده باعث جلوگیری جذب آفلاتوکسین در دستگاه گوارش و کاهش تأثیر منفی آن بر کبد گشته است.

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره آلوده به آفلاتوکسین باعث افزایش ضریب تبدیل غذایی، افزایش غلظت تری‌گلیسرید، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با تیمار شاهد شد. افزودن ۰/۲۵ درصد جاذب بنتونیت نانو ساختار پیلارد به جیره آلوده باعث افزایش مصرف خوراک، افزایش وزن بدن و کاهش غلظت آلانین آمینوترانسفراز شد. همچنین افزودن سطح ۰/۷۵ باعث کاهش آنزیم‌های فعالیت آلکالین فسفاتاز و آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با تیمار آلوده شد. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی، آفلاتوکسین در سطح ۵۰۰ نانوگرم در دوره رشد و ۱۰۰۰ نانوگرم در کیلوگرم در دوره پایانی تأثیری بر افزایش وزن بدن و مصرف خوراک نداشت و سطح ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلارد مناسب‌ترین پاسخ عملکردی را در جوجه‌های تغذیه‌شده با آفلاتوکسین داشت.

داده‌های مرتبط با تأثیر آفلاتوکسین و بنتونیت پیلارد بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون در ۳۵ روزگی جوجه‌های گوشتی چالش یافته با آفلاتوکسین B1 در جدول ۵ ارائه شده است. تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره آلوده به آفلاتوکسین باعث افزایش غلظت تری‌گلیسرید (TG) خون و فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز (ALT) در مقایسه با تیمار شاهد شد ( $P < 0.05$ ) که با نتایج پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد، بر پایه این گزارش‌ها تغذیه جوجه‌ها با جیره آلوده به سطوح ۴۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ آفلاتوکسین B1 سبب افزایش غلظت سرمی آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز و آسپاراتات ترنس آمیناز شد (Kermanshahi *et al.*, 2009; Amiri dumari *et al.* 2013). همچنین Eraslan *et al.* (2005) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره آلوده به ۱ ppm آفلاتوکسین باعث افزایش معنی‌دار ALT، AST و LDH و افزایش عددی ALP در مقایسه با تیمار شاهد شد.

افزودن بنتونیت پیلارد به جیره آلوده باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های ALT، ALP، LDH، AST در مقایسه با تیمار شاهد مثبت شد که با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد. Shi *et al.* (2005) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، افزودن ۰/۳ درصد بنتونیت فرآوری‌شده نانو ساختار به جیره آلوده جوجه‌های گوشتی باعث کاهش ALT و AST در مقایسه با تیمار آلوده شد. Dos Anjos *et al.* (2015) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کرد، افزودن ۰/۷۵ درصد بنتونیت باعث کاهش عددی آنزیم AST در مقایسه با تیمار آلوده شد. افزودن سطوح ۰/۲۵ و

جدول ۵. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی چالش یافته با آفلاتوکسین B1  
Table 5. Effects of experimental treatments on blood parameters of broilers challenged with aflatoxin B1

	Experimental treatment				SEM	P-value
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>		
CHOL (mg/dl)	127.25	149.07	141.00	138.95	6.045	0.1351
HDL (mg/dl)	46.62	55.07	49.50	53.20	2.578	0.1478
LDL (mg/dl)	67.68	76.34	66.615	70.35	5.198	0.5688
TG (mg/dl)	64.10 <sup>c</sup>	88.30 <sup>b</sup>	124.42 <sup>a</sup>	76.86 <sup>bc</sup>	5.535	0.0001
TP (mg/dl)	4.10	3.91	4.04	3.44	0.249	0.2870
LDH (U/l)	2024.8	2492.0	2051.5	1836.3	416.431	0.7256
ALP (U/l)	2880.3 <sup>ab</sup>	4247.8 <sup>a</sup>	3085.0 <sup>ab</sup>	1907.0 <sup>b</sup>	389.941	0.0093
ALT (U/l)	2.50 <sup>b</sup>	5.00 <sup>a</sup>	3.250 <sup>b</sup>	2.250 <sup>b</sup>	0.4082	0.0019
AST (U/l)	254.27	299.73	296.58	227.87	31.737	0.3531

میانگین‌های با حرف‌های غیر همسان در هر ردیف اختلاف معنی‌دار دارند ( $P < 0.05$ ).

T<sub>1</sub>: شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، T<sub>2</sub>: جیره پایه + آفلاتوکسین B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)، T<sub>3</sub>: جیره پایه + آفلاتوکسین B<sub>1</sub> + ۰/۲۵ درصد بنتونیت پیلارد شده نانو ساختار، T<sub>4</sub>: جیره پایه + آفلاتوکسین B<sub>1</sub> + ۰/۷۵ درصد بنتونیت پیلارد شده نانو ساختار

Mean with different alphabets are statistically different ( $P < 0.05$ ).

T<sub>1</sub>: control ©, T<sub>2</sub>: control diet + aflatoxin B<sub>1</sub> (AF), T<sub>3</sub>: control diet + aflatoxin B<sub>1</sub> and 0/25%PB, T<sub>4</sub>: control diet + aflatoxin B<sub>1</sub> and 0.75% PB

## REFERENCES

1. Amiri dumari, M., Sarir, H., Fani makki, O. & Afzali, N. (2013). Effects of milk thistle seed against aflatoxin B1. *Journal of Research in Medical Sciences*, 18(9), 786-790.
2. Asadifard, G., Tilaki, G., Ranjbar, M., Dini, M., Arab, A., Ghajavand, M., Kargari, A. & Moradi, O. (2006). *Introduction to Nanotechnology Laboratory*. Published by Nanotechnology Initiative Council Secretariat. (in Farsi)
3. Bergaya, F., Aouad, A. & Mandalia, J. (2006). *Pillared clays and clay minerals*, chapter 7.5, in: F. Bergaya, B.K.G. Theng and G. Lagacy, eds. *Handbook of Clay Science*.
4. Bergaya, F., Theng, B.K.G. & Lagaly, G. (2006). *Hand book of Clay Science*, 1st edition. Elsevier Publication, Amsterdam. Book of ASTM (American Society for Testing and Materials) Standards, West Conshohocken.
5. Caglar, B., Cubuk, O., Demir, E., Coldur, F., Mustafa Catir, M., Topcu, C. & Tabak, A. (2015). Characterization of AlFe-Pillared Unye bentonite: A Study of the surface acidity and catalytic property, *Journal of Molecular Structure*, 59-65.
6. Chen, K., Wang, G., Li, W., Wan, D., Hu, Q., Lu, L., Wei, X., & Cheng, Z. (2015). Synthesis of Magnetically Modified Fe-Al Pillared Bentonite and Heterogeneous Fenton-like Degradation of Orange II. Wuhan University of Technology and Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
7. Dos Anjos, F. R., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E. & Chimonyo, M. (2015). Efficacy of adsorbents (bentonite and diatomaceous earth) and turmeric (*Curcuma longa*) in alleviating the toxic effects of aflatoxin in chicks. *British Poultry Science*, 56(4), 459-69
8. Eraslan, G., Essiz, D., Mehmet akdogan, M., Sahindokuyucu, F., Altintas, L & Hismiogullari, S. E. 2005. Effects of dietary aflatoxin and sodium bentonite on some hormones in broiler chickens. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy*, 49, 93-96.
9. Fani Makki, O., Afzali, N & Omidi, A. (2013). Effect of Different Levels of Silymarin (*Silybum marianum*) on Growth Rate, Carcass Variables and Liver Morphology of Broiler Chickens Contaminated with Aflatoxin B1. *Poultry Science Journal*, 1(2), 105-116
10. Friedewald, W.T., Levy, R.I. & Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, 499-502.
11. Gil, A., Korili, A.K., Trujillano, R. & Vicente .M.A. (2010). *Book of Pillared Clays and Related Catalysts*. Springer-Verlag New York.
12. Golestani Fard, F., Bahrevar, M. A. & Salahi, E. (2013). *The methods of identification and analysis of material*. Published by Elmo-Sanaat Iran University. (in Farsi)
13. He, Q. R., Kim, J. & Sharma, R. P. (2004). Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to ftimonisin B-1 despite increasing accumulation of free sphenoid bases. *Toxicology Science*, 80(2), 335-342.
14. Hussein, H. S. & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
15. Huwing, A., Fremund, S., Kapper, O. & Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters Journal*, 122, 179-188.
16. Jafari Sayadi, A., Mohit, A., Miralami, N. & Hadipour, A. (2013). Effect of dietary supplementation of benzoic acid on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Animal Production Research*, 1(4), 45-51. (in Farsi)
17. Jindal, N., Mahipal, S.K. & Mahajan, N.K. (1994). Toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicken and its reduction by activated charcoal. *Research in Veterinary Science*, 56, 37-40.
18. Kermanshahi, H., Hazegh, A.R. & Afzali, N. (2009). Effect of sodium bentonite in broiler chickens fed diets contaminated with Aflatoxin B1. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(8), 1631-1636.
19. Lemke, S.L., Ottinger, S.E., Mayura, K., Ake, C.L., Pimpukdee, K., Wang, N. & Phillips, T.D. (2001). Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbent. *Animal Feed Science and Technologies*, 93, 17-29.
20. Marashi, P., Kaviani, S., Sarpoolaky, H. & Zolfaghari, A.R. (2004). *Electron Microscopes and new analysis methods as nano world investigation tools*. Published by Elmo-Sanaat Iran University. (in Farsi)
21. Masumy, A. (1995). *Instrumental Chemistry*. Islamic Azad University, North Tehran. (In Farsi)
22. McLean, M. & Dutton, M.F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & Therapeutics*, 65, 163-192.
23. Miazzo, R., Peralta, M. F., Rosa, C. A. R. & Dalcero, A. (2005). Efficiency of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poultry Science*, 84, 1-8.
24. Michell, I.V. (1990). *Pillared Layer Structure*. Elsevier, Applied Science, London. pp 252.
25. Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R. and Heidelbaugh, ND. (1988). Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science*, 67, 243-247.

26. Razm Ara, G. & Ghafory, M. (2006). *Fundamentals of mineralogy of clays*. Ferdowsi Univesity of Mashhas Publisher, Iran.
27. Reddy, S.V. & Wailer, F. (2000). *Aflatoxin, properties of aflatoxin and it producing fungi*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics publisher.
28. Richard, J.L., Pier, A.C., Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L., Lyon, R.L. & Cutlip, R.C. (1983). Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes and on tissue residues in steers. *American Journal of Veterinary Research*, 44(7), 1294-1299.
29. Ritter, A. C., Hoeltz, M. & Noll, I. B. (2011). Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. *Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas*, 31(3), 623-628.
30. Rosa, C. A. R., Miazzo, R., Magnoli, C., Salvano, M., Chiacchiera, S. M., Ferrero, S., Saenz, M., Carvallho, E.C.Q. & Dalcerro, A. (2001). Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poultry Science*, 80, 139-144.
31. Savari, M., Dehghan Banadaki, M., Rezayazdi, K. & Javan-Nikkhah, M. 2013. A comparison of mineral adsorbents zeolite and bentonite vs. organic adsorbent (Mycosorb) and mineral-organic adsorbent (biotox) as their regardstheir potential of adsorbing Aflatoxin B1. *Iranian Journal of Animal Science*, 44(1), 105-112. (in Farsi)
32. Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Stubblefield, R.D. & Sorenson, W.G. (1966). Production of aflatoxin on rice. *Applied Microbiology, American Society of Microbiology*, 14(3), 425-8.
33. Shalaei, M., Hosseini S. M and Afzali, N. (2016). Evaluation of production performance and gut morphology of broiler chickens fed with antibiotic, organic acid, probiotic and prebiotic in tropical conditions. *Research on Animal Production*, 7(14), 67-75. (in Farsi)
34. Tomul, F. (2011). Synthesis, characterization, and adsorption properties of Fe/Cr-pillared bentonites. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 7228-7240.
35. Tomul, F. (2012). Adsorption and catalytic properties of Fe/Cr-pillared bentonites. *Chemical Engineering Journal*, 185, 380-390.
36. Whiakar, I. Horwits, W., Albert, R. & Nesheim, S. (1996). Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. *Journal of AOAC International*, 79(2), 476-485.
37. Yalagod, S. G. (2014). *Studies on low levels of aflatoxin induced immunotoxicity in broiler chicken and its amelioration*. Ph.D. thesis, Karanataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar Derpartment of Veterinary Pathology, Veterinary College. Bangalor.
38. Yurdakoc, M., Akcay, M., Tonbul, Y., Ok, T. & Yurdakoc, K. (2008). Preparation and characterization of Cr- and Fe-pillared bentonites by using CrCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Cr (acac)<sub>3</sub> and Fe(acac)<sub>3</sub> as precursors. *Microporous and Mesoporous Materials*, 111, 211-218.
39. Zeng, L, Wang, S., Peng, X., Geng, J., Chen, C., Li, M. (2014). Al-Fe PILC preparation, characterization and its potential adsorption capacity for aflatoxin B1. *Clay Science*, 83-84, 231-237.
40. Zhirong, L., Uddin, A. Md. & Zhanxue, S. (2011). FT-IR and XRD analysis of natural Na-bentonite and Cu (II)-loaded Na-bentonite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(5), 1013-1016