دوره سیزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.42664.1625

اثرات تانن اسپرس عمل‌آوری شده با آب یا اوره بر جمعیت میکروبی شکمبه، فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر برون‌تنی

بهروز یاراحمدی[۱]، مرتضی چاجی[*۲]، محمد بوجارپور[۳]، خلیل میرزاده[۳] و مرتضی رضایی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۸

چکیده

این آزمایش با هدف بررسی اثر اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با آب یا اوره بر جمعیت میکروبی شکمبه، فراسنجه‌های تولید گاز و خصوصیات تخمیر برون‌تنی انجام شد. تیمارها شامل علوفه اسپرس عمل‌آوری شده (با آب یا اوره) و بدون عمل‌آوری بودند. داده‌های روش گاز در قالب طرح اندازه‌گیری‌های تکرار شونده و سایر داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی آنالیز شد. نتایج نشان داد عمل‌آوری با اوره و آب باعث کاهش درصد ماده‌ی خشک شد. بیش‌ترین میزان درصد پروتئین خام مربوط به عمل‌آوری با اوره (۱۴/۲۵ درصد) بود. اثر عمل‌آوری با آب و اوره بیش‌ترین درصد کاهش ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم را در اسپرس آبی داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج نشان داد اسپرس آبی عمل‌آوری شده با آب و اوره دارای پتانسیل تولید گاز و نرخ تولید گاز بالاتری بود. افزایش گاز تولیدی در تیمارهای عمل‌آوری اسپرس‌آبی با آب یا اوره نشان دهنده‌ی اثر تانن‌زدایی عمل‌آوری با آب یا اوره بر اسپرس بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ماده‌ی آلی هضم شده واقعی مربوط به تیمارهای اسپرس آبی عمل‌آوری با آب و اسپرس دیم بدون عمل‌آوری (به ترتیب با ۲۹۶ و ۱۰۵ میلی‌گرم) بود. در مورد فاکتور جداکننده‌ی تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با آب (۶/۰۱ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم) اختلاف معنی‌دار با دیگر تیمارها داشت ($P<۰/۰۵$). کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی به ترتیب مربوط به اسپرس دیم بدون عمل‌آوری و اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با اوره بود ($P<۰/۰۵$). اثر تیمارها بر جمعیت کل باکتری‌های شکمبه، باکتری‌های سلولولایتیک و پروتوزوآها معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). تانن اسپرس موجب کاهش تولید گاز در کل فرآیند تخمیر شکمبه در پایان انکوباسیون شد. در مجموع، عمل‌آوری اسپرس با آب و اوره موجب تغییر جمعیت باکتری‌های کل، سلولولیتیک، پروتوزوآها و در نهایت افزایش سنتز توده میکروبی شد. به طور کلی، عمل‌آوری اسپرس با آب روش موفق و ارزان‌تری نسبت به روش استفاده از اوره بوده و قابل توصیه می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسپرس، تولید گاز، جمعیت میکروبی، تانن، عمل‌آوری

مقدمه

شرایط متغیر محیطی و بروز تنش‌های متناوب نظیر خشکی در کشور، اهمیت مطالعه روی گیاهانی نظیر اسپرس که به دامنه‌ی وسیعی از شرایط نامساعد محیطی سازگار می‌باشد را نمایان ساخته است. ایران با وجود دارا بودن تنوع اقلیمی وسیع و وجود منابع محیطی و ذخایر گیاهی غنی در زمره‌ی کشورهای واردکننده‌ی علوفه‌ی دامی و نیز مواد پروتئینی قرار دارد و هر ساله نیز تقاضا برای مواد پروتئینی افزایش می‌یابد . اسپرس (*Onobrychis viciifolia*) از جمله گیاهان علوفه‌ای است کـه بـه لحاظ تولید علوفه با کیفیت و قابل رقابت با یونجه در میان علوفه‌های مرتعی و زراعی مورد توجه می‌باشد. این گیاه سازگاری وسیعی به ویژه در مناطق

[۱] دانش‌آموخته دکترای تغذیه‌ی دام، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
[*۲] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
E-mail: chaji@ramin.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۳] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
[۴] استادیار پژوهشی تغذیه‌ی دام، موسسه‌ی علوم دامی کشور، کرج

سردسیری دارد و در این مناطق برای تولید علوفه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضمن این که در مناطق گرم نیز به خوبی استقرار یافته و در برخی از مناطق عملکرد آن حتی از یونجه بیش‌تر می‌باشد (مجیدی و ارزانی ۱۳۸۳، یوسفی و جعفری ۱۳۹۳). به هرحال، اسپرس در مقایسه با یونجه عموماً بازده تولید کم‌تری دارد اما به عنوان جایگزین مناسب در مناطق خشک و کم آب رشد بهتری نسبت به یونجه دارد (Smoliak et al. 1993). این گیاه به دلیل داشتن ریشه‌های عمیق به خشکی مقاوم است و در مناطقی با بارندگی سالانه ۳۰۰ میلی‌متر می‌توان آن را به صورت دیم کشت کرد و در چنین شرایطی عملکرد علوفه‌ی خشک تا ۳۵۰۰ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (Koch et al. 1972).

محققین مختلفی وجود تانن متراکم را در اسپرس گزارش کرده‌اند. غلظت تانن‌های متراکم اسپرس در محدوده‌ی ۴ تا ۱۰ درصد ماده‌ی خشک گزارش شده است (Scharenberg et al. 2007, Tanner et al. 1994, Theodoridou et al. 2011). تانن‌ها باعث کاهش فعالیت و تکثیر باکتری‌های کل شکمبه و باکتری‌های تجزیه کننده‌ی سلولز (سلولولایتیک) می‌شوند (Min et al. 2003, Molan et al. 2000, Patra and Saxena 2009). تانن می‌تواند بر پروتوزوآهای شکمبه اثر منفی داشته باشد (Makkar et al. 1995). نتایج به دست آمده از آزمایش‌های *in vitro* با مایع شکمبه‌ی گاو توسط Makkar و همکاران در سال ۱۹۹۵ و تلیسه‌ها به وسیله‌ی Baah و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دهنده‌ی کاهش تعداد پروتوزوآها در اثر مصرف تانن می‌باشد. در بعضی مطالعات نیز اثر معنی‌دار تانن بر تعداد پروتوزوآها گزارش شده است (Benchaar et al. 2008).

در مطالعه‌ای گزارش شده استفاده از یک سطح متوسط (۲-۴ درصد) تانن موجب افزایش پروتئین میکروبی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (Beever Siddons et al. 1986). برخی مطالعات نشان دهنده‌ی افزایش کارایی سنتز پروتئین میکروبی در شرایط *in vitro* در حضور تانن‌ها می‌باشد. عادت‌پذیری جمعیت باکتریایی شکمبه به تانن‌ها، حداقل در مورد تانن‌های متراکم، به نظر نمی‌رسد مسئول کاهش نرخ تولید گاز باشد، زیرا توسط میکروب‌های شکمبه تجزیه نمی‌شود (Makkar et al. 1995). در مقابل گزارش شده تانن متراکم باعث کاهش گاز تولیدی در مرحله‌ی پایانی انکوباسیون می‌شود. علاوه بر این، تانن‌ها موجب بهبود بازدهی سنتز پروتئین میکروبی و کاهش اتلاف انرژی به صورت گاز می‌شود (Niderkorn et al. 2012). گزارش‌هایی مبنی بر کاهش غلظت آمونیاک شکمبه تحت تأثیر مصرف منابع تانن وجود دارد که این کاهش را به علت تشکیل کمپلکس تانن-پروتئین، مهار فعالیت آنزیمی باکتری‌های توسط تانن و در نتیجه کاهش تجزیه‌ی پروتئین در شکمبه و همچنین کاهش شدید باکتری‌های پروتئولیتیک می‌دانند (Min et al. 2002, Niderkorn et al. 2012, Theodoridou et al. 2011).

استفاده از برخی روش‌ها و ترکیبات شیمیایی برای کاهش میزان تانن و ترکیبات فنولی خوراک‌های غنی از تانن اثرات مفیدی بر عملکرد دام‌ها داشته است. از جمله روش‌های تانن‌زدایی، عمل‌آوری با آب و اوره می‌باشد (Makkar et al. 2003, Makkar and Singh 1993). عمل‌آوری با آب و اوره روی برگ‌های آکاسیا سبب کاهش معنی‌دار کل ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم شده است (Ben Salem et al. 2005, Khalilvandi-Behroozyar et al. 2009, Makkar and Singh 1993). مشابه چنین یافته‌هایی در دانه‌های سورگوم غنی از تانن به وسیله‌ی غوطه‌ور کردن دانه‌های سورگوم در آب گزارش شده است (El Fadil and El Tinay 1993). تفاوت کمی و کیفی علوفه‌ی اسپرس (یوسفی و جعفری ۱۳۹۳، Smoliak etal. 1993) و همچنین تفاوت ترکیبات فنولی، تانن‌کل و تانن متراکم اسپرس به وسیله‌ی برخی محققین گزارش شده است (Khalilvandi-Behroozyar et al. 2009, Scharenberg et al. 2007). از سوی دیگر، آزمون تولید گاز روش

مناسبی برای تعیین اثر مواد ضد تغذیه‌ای همچون تانن‌ها می‌باشد (Makkar et al. 1995). بنابراین، آزمایش حاضر برای بررسی تأثیر تانن موجود در علوفه اسپرس عمل-آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری بر جمعیت باکتری‌های کل شکمبه، باکتری‌های سلولولایتیک و پروتوزآها، فراسنجه‌های تولید گاز، گوارش‌پذیری و خصوصیات تخمیر برون‌تنی (*in vitro*) انجام شد.

مواد و روش کار

کلیه‌ی آزمایش‌ها در ایستگاه آموزشی- تحقیقاتی و آزمایشگاه تغذیه تحصیلات تکمیلی گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان در سال ۱۳۹۲ به مدت ۹ ماه انجام شد. چون اسپرس بیش‌تر در مناطقی که کشت یونجه به خوبی جواب نمی‌دهد، کشت می‌شود لذا جمع‌آوری نمونه‌های اسپرس آبی و دیم کشت شده از مناطق الیگودرز، ازنا، سمیرم و فریدن انجام شد. زمان نمونه‌گیری در موقع برداشت علوفه‌ی اسپرس در مرحله‌ی ۵۰ درصد گلدهی در اواسط فصل بهار انجام شد. برای این منظور، ۱۰ نمونه اسپرس دیم و ۱۵ نمونه اسپرس آبی از توده‌های علوفه‌ی اسپرس انبار شده به صورت مجزا و تصادفی از بالا، کناره‌ها و داخل توده‌های اسپرس جمع‌آوری شد. علوفه‌ی جمع‌آوری شده در سایه و درجه‌ی حرارت معمولی خشک شدند. مقدار هر نمونه یک کیلوگرم بود و خرد کردن علوفه در موقعی که رطوبت علوفه به کم‌تر از ۱۵ درصد رسید با دستگاه علوفه خردکن برقی انجام شد.

در مرحله‌ی بعد، عمل‌آوری با آب یا اوره هم روی نمونه‌های علوفه برداشت شده و هم روی غذای اصلی انجام شد. در روش عمل‌آوری با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری از حوضچه استفاده شد. برای ایجاد شرایط بی‌هوازی در هر دو حالت عمل‌آوری با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری از نایلون پلاستیکی برای پوشش علوفه‌های خرد شده استفاده شد تا شرایط بی‌هوازی ایجاد شود.

در ابتدای آزمایش، مطابق روش Makkar and Singh در سال ۱۹۹۳ در تیمارهای اسپرس بدون عمل‌آوری، علوفه‌ی خرد شده به مدت ۷ روز تحت شرایط هوازی روی زمین نگهداری و خشک شدند. سپس برای تیمار عمل‌آوری با آب مطابق روش Ben Salem و همکاران در سال ۲۰۰۵، میزان ۲۰۰ لیتر آب به ازای ۱۰۰ کیلوگرم علوفه‌های خرد شده اسپرس پاشیده شد و به مدت ۷ روز روی زمین با کشیدن پلاستیک روی آن‌ها تحت شرایط غیرهوازی نگهداری شدند. برای عمل‌آوری با اوره مطابق روش Makkar and Singh در سال ۱۹۹۳ و Ben Salem و همکاران در سال ۲۰۰۵، از محلول ۲ کیلوگرم اوره در ۱۰۰ لیتر آب به ازای ۱۰۰ کیلوگرم علوفه‌های خرد شده اسپرس استفاده شد و به مدت ۷ روز تحت شرایط غیرهوازی نگهداری شدند. نمونه‌های علوفه‌ی اسپرس دیم و آبی عمل‌آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل-آوری با آسیاب چکشی حاوی غربال یک میلی‌متری آسیاب شدند.

جیره بر اساس جداول احتیاجات غذایی گوسفند انجمن ملی تحقیقات تنظیم شد (NRC 2007). برای هر نمونه ماده‌ی خوراکی ۴ تکرار در نظر گرفته شد. حدود یک ساعت قبل از تغذیه‌ی صبح از سه رأس گوسفند نژاد عربی (که به مدت ۸ ساعت گرسنگی داده شده بود) با میانگین وزن ۱/۴۷± ۳۵ کیلوگرم که بـه مدت شش هفته بـا جیره‌ایی شامل یونجه خشک (۳۰/۳۵ درصد)، علوفه‌ی خشک اسپرس (۲۲/۹ درصد)، کاه گندم (۶/۷۵ درصد)، کاه جو (۶/۷۵ درصد)، کنجاله‌ی کلزا (۲/۹ درصد)، دانه‌ی جو (۳۱/۵۵ درصد)، تفاله‌ی خشک چغندر (۴/۱۵ درصد)، آهک (۰/۶ درصد)، نمک (۰/۲ درصد) و مکمل معدنی ویتامینی (۰/۶ درصد) تغذیه شده بودند، مایع شکمبه جمع‌آوری شد. جیره بر اساس انرژی و پروتئین در حد نگهداری تهیه شد. میزان انرژی قابل متابولیسم جیره ۲/۲۸ مگاکالری/ کیلوگرم و پروتئین ۱۲/۱۸ درصد بود. جیره‌ی غذایی بر اساس نسبت علوفه به کنسانتره ۶۰ به ۴۰ درصد بود. منظور از تهیه‌ی مایع شکمبه از

گوسفندان ایجاد محیط کشت شبیه‌سازی شده از شکمبه گوسفندان در شرایط آزمایشگاه برای تولید محیط تخمیر و گاز بود. مایع شکمبه از طریق فیستولای شکمبه‌ای جمع‌آوری و با پارچه‌ی چهار لایه مخصوص پنیرسازی صاف گردیده و در فلاسک محتوی گاز کربنیک به آزمایشگاه منتقل شد. آزمایش ترکیب شیمیایی شامل ماده‌ی خشک، ماده‌ی آلی، پروتئین خام، عصاره‌ی اتری، فیبر نامحلول در شوینده‌ی خنثی و فیبر نامحلول در شوینده‌ی اسیدی روی نمونه‌های علوفه عمل‌آوری با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری و هم روی غذای اصلی در قبل از آزمایش انجام شد. غلظت ماده‌ی خشک، ماده‌ی آلی، پروتئین خام، عصاره‌ی اتری نمونه‌های خوراک با استفاده از روش استاندارد (AOAC) در سال ۲۰۰۷ و مقدار فیبر نامحلول در شوینده‌ی خنثی و فیبر نامحلول در شوینده‌ی اسیدی به روش Van Soest و همکاران در سال ۱۹۹۱ اندازه‌گیری شد.

علوفه‌های اسپرس عمل‌آوری شده و بدون عمل‌آوری پس از آسیاب شدن با الک با قطر ۰/۵ میلی‌متر در شرایط بدون نور و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا از غیر فعال شدن ترکیبات فنولی جلوگیری شود. و هر بار برای اندازه‌گیری هر کدام از بخش‌های ترکیبات فنولی، از عصاره‌ی تازه استخراج شده استفاده شد. جهت استخراج مواد فنولی از محلول استون ۷۰ درصد استفاده شد. روش اندازه‌گیری کل ترکیبات فنولی و کل تانن جیره‌های آزمایشی به روش رنگ سنجی انجام شد (معرف فولین شیکالتو). برای تعیین میزان تانن موجود در عصاره‌ی روش طیف‌سنجی (FT-IR) استفاده شد. مشخصات دستگاه اسپکتوفتومتر مدل FT-IR (Spectrometer Spectrum RXI - PerkinElmer FT-IR) با دتکتورتری گلیسرین سولفات که طول موجی بین ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ نانومتر را قرائت می‌کند، بود. میزان جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد و کل تانن به روش تفاوت محاسبه شد (Makkar et al. 1995). برای اندازه‌گیری تانن‌های متراکم از محلول ان- بوتانل– اسید کلریدریک استفاده شد. میزان جذب نوری کمپلکس رنگی تشکیل شده در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد (Makkar 2003).

برای تعیین تعداد کل باکتری‌های شکمبه و باکتری‌های تجزیه کننده‌ی سلولز (سلولولایتیک) در هر میلی‌لیتر از مایعات شکمبه از روش Dehority و همکاران در سال ۱۹۸۹ استفاده شد. بر اساس این روش از یک محیط کشت مشترک برای برآورد همزمان جمعیت کل باکتری-های شکمبه و باکتری‌های سلولولایتیک استفاده می‌شود.

تخمین تراکم باکتری‌های شکمبه

تهیه‌ی محیط کشت: محیط کشت مورد استفاده جهت شمارش به روش حداکثر تعداد احتمالی باکتری‌ها (MPN[1]) بر اساس روش Obispo و Dehority در سال ۱۹۹۲ و Dehority و همکاران درسال ۱۹۸۹ تهیه شد. اجزای محیط کشت بی هوازی در شرایط اشباع از گاز دی اکسیدکربن و با pH معادل ۶ تهیه گردید. تهیه‌ی رقت‌های مختلف از مایع شکمبه تازه: از هر دام در زمان‌های صفر قبل از وعده‌ی خوراک صبح، دو، چهار و شش ساعت پس از مصرف وعده‌ی خوراک صبح، نمونه‌ی مایع شکمبه از طریق فیستوله جمع‌آوری و پس از صاف کردن آن توسط پارچه‌ی مخصوص، در بطری پلاستیکی حاوی گاز کربنیک ریخته شد و با قرار دادن در فلاسک محتوی آب ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد، برای کشت دادن بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد (Dehority et al. 1989).

تلقیح و نگهداری کشت‌های انجام شده: برای هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری، بلافاصله پس از تهیه‌ی رقت-های مختلف مایع شکمبه، رقت‌های 10^{-9} تا 10^{-12} انتخاب و برای هر رقت، در مجاورت شعله، در سه لوله (هر لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت)، یک میلی‌لیتر از رقت مورد نظر مایع شکمبه اضافه و به انکوباتور ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید. ده لوله حاوی محیط

1- Most Probability number

کشت (پنج لوله بدون باز کردن درب آن‌ها و پنج لوله پس از باز کردن درب و دمیدن مقداری گاز کربنیک در آن‌ها)، نیز به عنوان شاهد تهیه گردید. لوله‌های حاوی محیط کشت مدت ۱۴ روز در انکوباتور ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده و هر روز دو بار محتویات لوله‌ها به آرامی هم زده شد (Dehority et al. 1989).

تخمین تعداد باکتری‌ها: پس از طی مدت انکوباسیون، از دو معیار تغییر رنگ (کدر شدن) با مشاهده‌ی چشمی و کاهش تغییر رنگ (کدر شدن) با مشاهده‌ی چشمی و کاهش pH محیط کشت برای تعیین وضعیت رشد باکتری‌ها در هر لوله استفاده شد. سپس با استفاده از جدول MPN تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه برآورد گردید. در مورد جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده‌ی سلولز از معیار تغییر pH و مصرف شدن رسوب سلولز در ته لوله‌ها استفاده شد و لوله‌هایی که به طور مشترک هم کاهش pH و هم مصرف سلولز را نشان دادند به عنوان مثبت تلقی و از جداول استاندارد MPN برای برآورد تراکم باکتری‌های تجزیه کننده‌ی سلولز در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه استفاده شد (Obispo and Dehority 1992).

شمارش پروتوزوآها: در هر یک از زمان‌های نمونه-برداری، پس از جمع‌آوری و انتقال مایع شکمبه تازه به آزمایشگاه، از هر نمونه در سه لوله‌ی آزمایش، سه نمونه‌ی کوچک‌تر به حجم ۵ میلی‌لیتر تهیه شد. برای ثابت کردن (کشتن) پروتوزوآها، از محلول ثابت کننده‌ی فرمالدئید ۱۰ درصد در محلول کلرور سدیم ۹ درصد استفاده گردید به ازای هر یک میلی‌لیتر مایع شکمبه یک قطره محلول ثابت کننده به آن اضافه شد و بعد از ثابت شدن پروتوزوآها، از هر لوله یک قطره مایع شکمبه روی لام مدرج مخصوص قرار داده و با گذاشتن لامل بر روی آن، در زیر میکروسکوپ نوری و با درشت نمایی ۱۰× تک‌یاخته‌ها در سلول‌های چهارگوشه و وسط لام شمارش شد (Dehority et al. 1989).

تکنیک تولید گاز

نمونه‌های علوفه اسپرس عمل‌آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری با آسیاب حاوی غربال یک میلی‌متری آسیاب شدند. تولید گاز در ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی-لیتری که حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم از علوفه‌ها به شکل آسیاب شده، ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بود، اندازه‌گیری شد. سپس ویال‌ها به دستگاه انکوباتور ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل‌شد. گاز تست‌ها در سه ران به صورت هم‌زمان مطابق روش تصحیح شده Menk and Stingass در سال ۱۹۸۸ انجام شد. گاز تولیدی در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت ثبت گردید. به منظور تعیین فراسنجه‌های گاز از معادله‌ی غیر خطی $A= b(1 - e^{-c(t-L)})$ استفاده شد (France et al. 2000). در این معادله فراسنجه‌ی b گاز تولید گاز مجانب از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده‌ی خشک)، c نرخ تولید گاز (درصد در ساعت)، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت، L زمان تأخیر تولید گاز (ساعت) و P گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان t می‌باشد. قابلیت هضم ماده‌ی آلی با استفاده از رابطه‌ی ۱ و با استفاده از معادله‌ی Menk و همکاران در سال ۱۹۷۹ محاسبه و با این مقدار، عامل جداکننده (PF)، توده‌ی میکروبی و راندمان توده‌ی میکروبی اندازه‌گیری شد (Blummel and Ørskov 1993). انرژی قابل متابولیسم با استفاده از رابطه‌ی ۱ محاسبه شد (Menk and Stingass 1988).

رابطه‌ی ۱: $ME_{(MJ/Kg\ DM)} = ۲/۲ + ۰/۱۳۶GP + ۰/۰۵۷CP + ۰/۰۰۰۲۹\ CP^{۲}$

CP: درصد پروتئین خام، GP: میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی از ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه‌ی ماده‌ی خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

فاکتور جداکننده‌ی (PF) بیان کننده‌ی نسبت تجزیه‌ی واقعی سوبسترا به حجم گاز تولید شده در دوره‌های زمانی انکوباسیون می‌باشد. فاکتور جداکننده، به صورت نسبت ماده‌ی هضم شده واقعی به حجم گاز (میلی‌لیتر) تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محاسبه شد (Blummel et al. 1997). در نهایت تولید پروتئین میکروبی (MP) با استفاده از رابطه‌ی ۲ محاسبه شد (Blummel et al. 1997).

رابطه‌ی ۲: $MP\ (_{mg/g\ DM}) = TDS_{(mg)} - (ml\ gas \times ۲/۲_{mg/ml})$

که ۲/۲ عامل استیوکیومتری بر حسب میلی‌گرم همراه با تولید یک میلی‌لیتر گاز و ماده‌ی آلی هضم شده واقعی بر حسب میلی‌گرم (TDS) بر اساس رابطه‌ی ۳ محاسبه شد (Blummel et al. 1997). راندمان تولید پروتئین میکروبی به صورت نسبت توده‌ی میکروبی تولید شده (MP) به میلی‌گرم ماده‌ی آلی هضم شده واقعی محاسبه شد. در نهایت برای محاسبه PF از رابطه‌ی ۴ استفاده شد.

رابطه‌ی ۳: خاکستر - باقی‌مانده - مقدار اولیه = (میلی‌گرم) ماده‌ی آلی هضم شده واقعی (TDS)

رابطه‌ی ۴: میلی‌لیتر گاز تولید شده / (میلی‌گرم) ماده‌ی آلی هضم شده‌ی واقعی = PF

به منظور بررسی روند تغییرات pH در یک دوره‌ی ۲۴ ساعته pH ثبت و اندازه‌گیری شد. بدین منظور در ساعات صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴ نمونه با استفاده از دستگاه pH متر (مدل WTM، آلمان) تعیین شد.

جهت اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی در پایان آزمایش گاز از محیط کشت نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از صاف کردن با پارچه متقال، ۱۰ میلی‌لیتر از آن با ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (۱۲/۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک مرک ۳۷ درصد در یک لیتر آب مقطر) مخلوط شده و بلافاصله به فریزر منتقل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. نیتروژن آمونیاکی از روش فنل- هیپوکلرایت با استفاده از اسپکتروفتومتر و منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد (Broderick and Kang 1980).

داده‌های حاصل از روش تولید گاز و جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه در قالب طرح اندازه‌گیری‌های تکرارشونده (Measurement Repeated) با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS 2003) با رویه‌ی مختلط (Mixed) با ۶ تیمار و ۴ تکرار با مدل آماری شماره‌ی ۱ آنالیز شد. مدل مورد استفاده در این رویه یک مدل مختلط شامل اثر ثابت تیمار (اسپرس دیم و آبی عمل‌آوری شده با آب یا اوره)، اثر زمان انکوباسیون و اثر متقابل بین تیمار و زمان به عنوان اثرات ثابت و اثر تکرار درون هر تیمار به عنوان اثر تصادفی بود. مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش میانگین حداقل مربعات انجام شد. مدل آماری مورد استفاده بدین صورت بود.

مدل آماری ۱: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{k(i)} + \varepsilon_{ijk}$

که: Y_{ijk} =متغیر وابسته، μ =میانگین کل (مقدار ثابت)، α_i= اثر ثابت تیمار i ام، β_j = اثر زمان j ام ، $\alpha\beta_{ij}$ = اثر متقابل تیمار i ام و زمان j ام، $\varepsilon_{k(i)}$ = خطای تصادفی حاصل از تکرار در داخل تیمار و ε_{ij} = خطای تصادفی حاصل از تیمار i ام در زمان j ام در واحد آزمایشی k می‌باشد. تجزیه‌آماری سایر داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) با افزار SAS در سال ۲۰۰۳ نسخه‌ی ۹/۱ با ۶ تیمار و ۴ تکرار با مدل آماری شماره‌ی ۲ تجزیه شد. مقایسه‌ی میانگین با آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد صورت گرفت. مدل آماری مورد استفاده به صورت ذیل بود.

مدل آماری شماره ۲: $Y_{ij} = \mu + T_j + \varepsilon_{ij}$

که: Y_{ij} = متغیر وابسته، μ = میانگین کل (مقدار ثابت)، T_j = اثر ثابت تیمار (۶ و ۵، ۴، ۳، ۲، ۱ = j) و ε_{ij} = اثر تصادفی خطا می‌باشد.

نتایج

ترکیب شیمیایی

جدول ۱ تأثیر عمل‌آوری‌ها بر ترکیب شیمیایی علوفه‌ی اسپرس آبی و دیم با آب یا اوره را نشان می‌دهد. بیش‌ترین درصد ماده‌ی خشک مربوط به اسپرس دیم بدون

عمل‌آوری بود (P<۰/۰۵). در بین تیمارهای مختلف بیش‌ترین غلظت درصد پروتئین خام مربوط به عمل‌آوری با اوره با ۱۴/۲۵ درصد بود. بیش‌ترین غلظت درصد فیبر نامحلول در شوینده‌ی خنثی (NDF) مربوط به اسپرس دیم قبل از عمل‌آوری و کم‌ترین غلظت NDF مربوط به اسپرس عمل‌آوری با اوره بود. همچنین بیش‌ترین غلظت فیبر نامحلول در شوینده‌ی اسیدی (ADF) مربوط به اسپرس قبل از عمل‌آوری و کم‌ترین مقدار ADF را اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره داشت. تیمار اسپرس عمل‌آوری با آب تفاوت معنی‌داری با تیمار عمل‌آوری با اوره نداشت (P>۰/۰۵). از نظر ماده‌ی آلی بین تیمارهای اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره، اسپرس آبی قبل از عمل-آوری و اسپرس آبی عمل‌آوری با آب اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵).

جدول ۱: تأثیر اسپرس عمل‌آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری بر ترکیب شیمیایی برحسب درصد

	ماده خشک	پروتئین خام	عصاره اتری	فیبر نامحلول در شوینده خنثی	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	ماده آلی	خاکستر
اسپرس آبی قبل از عمل‌آوری	۹۳/۸۴ ab	۱۲/۴۰ c	۲/۳۹ b	۴۳/۹۹ c	۳۸/۱۹ bc	۹۱/۷۴ abc	۶/۷۷ b
اسپرس دیم قبل از عمل‌آوری	۹۴/۷۳ a	۱۱/۷۷ e	۲/۳۱ b	۴۸/۰۱ a	۴۲/۳۵ a	۸۶/۲۷ d	۵/۷۳ c
اسپرس آبی عمل‌آوری با آب	۹۱/۳۸ d	۱۳/۵۶ b	۲/۶۰ a	۴۳/۱۱ c	۳۶/۷۳ dc	۹۳/۳۶ a	۷/۵۷ a
اسپرس دیم عمل‌آوری با آب	۹۳/۱۷ bc	۱۱/۹۱ c	۲/۴۴ b	۴۵/۸۹ b	۴۰/۷۹ a	۹۰/۲۹ c	۵/۹۱ c
اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره	۸۹/۸۵ e	۱۴/۲۵ a	۲/۴۳ b	۴۱/۰۸ d	۳۶/۰۴ d	۹۲/۰۹ ab	۷/۶۲ a
اسپرس دیم عمل‌آوری بااوره	۹۲/۰۲ dc	۱۳/۰۷ b	۲/۳۸ b	۴۴/۰۳ c	۳۸/۶۰ b	۹۱/۱۶ bc	۶/۶۳ b
SEM	۰/۳۸	۰/۳۲	۰/۰۷	۰/۶۹	۰/۸۲	۰/۵۱	۰/۱۷
سطح معنی‌داری	۰/۰۲۱	۰/۰۱۱	۰/۰۳۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱۳	۰/۰۲۹	۰/۰۲۴

SEM: خطای استاندارد میانگین، [a-d] در هر ستون اعداد دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

غلظت کل ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم

بر اساس جدول ۲ بین تیمارهای مختلف اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با آب یا اوره و قبل از عمل‌آوری از نظر کل ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین غلظت کل ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم مربوط به اسپرس دیم قبل از عمل‌آوری بود. بیش‌ترین درصد کاهشی ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم را اسپرس آبی عمل‌آوری شده با آب یا اوره داشته اما در اسپرس اسپرس دیم درصد کاهشی این ترکیبات به مراتب کم‌تر بود (P<۰/۰۵).

جدول ۲: تأثیر اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری بر کل ترکیبات فنولی، تانن کل و تانن متراکم

تیمار	کل ترکیبات فنولی (درصد)	تانن کل (درصد)	تانن متراکم (درصد)	درصد کاهش ترکیبات فنولی	درصد کاهش تانن کل	درصد کاهش تانن متراکم
اسپرس آبی قبل از عمل‌آوری	۴/۰۵ ^{c}	۳/۸۹ ^{c}	۲/۴۳ ^{c}	–	–	–
اسپرس دیم قبل از عمل‌آوری	۵/۵۸ ^{d}	۵/۳۶ ^{d}	۳/۳۵ ^{d}	–	–	–
اسپرس آبی عمل‌آوری با آب	۲/۲۸ ^{a}	۲/۱۸ ^{a}	۱/۵۱ ^{a}	۴۳/۶۴^{a}	۴۳/۶۷^{a}	۳۷/۸۱^{ab}
اسپرس دیم عمل‌آوری با آب	۳/۶۸ ^{b}	۳/۵۱ ^{b}	۲/۲۵ ^{b}	۳۳/۹۶^{c}	۳۴/۳۳^{c}	۳۲/۶۳^{c}
اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره	۲/۲۴ ^{a}	۲/۱۵ ^{a}	۱/۴۸ ^{a}	۴۴/۶۵^{a}	۴۴/۶۹^{a}	۳۸/۸۵^{a}
اسپرس دیم عمل‌آوری بااوره	۳/۴۱ ^{b}	۳/۲۵ ^{b}	۲/۱۵ ^{b}	۳۸/۸۲^{b}	۳۹/۲۲^{b}	۳۵/۶۰^{b}
SEM	۰/۰۸	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۸۸	۰/۹۴	۰/۵۲
سطح معنی‌داری	۰/۰۱۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۵	۰/۰۲۶	۰/۰۳۸	۰/۰۲۸

SEM: خطای استاندارد میانگین، $^{a-d}$ در هر ستون اعداد دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

تولید گاز

جدول ۳ فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های مختلف انکوباسیون را نشان می‌دهد. اسپرس آبی عمل‌آوری شده با آب یا اوره پتانسیل تولید گاز (b) بیش‌تری در مقایسه با سایر تیمارها داشتند (P<۰/۰۵) در زمینه نرخ تولید گاز اختلاف معنی-داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شد (P<۰/۰۵). در این میان، بیش‌ترین نرخ تولید گاز (c) مربوط به تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری شده با اوره با ۰/۰۷۸ در ساعت بود. فاز تأخیری مشاهده شده برای تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری شده با اوره با ۰/۲۳ در ساعت اگر چه بالاترین مقدار بود اما با میزان به دست آمده برای اسپرس آبی عمل‌آوری شده با آب ۰/۳۳ ساعت اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). بر اساس جدول ۴ حجم گاز تولیدی در ۲۴ ساعت اولیه‌ی انکوباسیون در تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره (۵۱/۷۸ میلی‌لیتر) بیش‌ترین (P<۰/۰۵) و اسپرس آبی عمل‌آوری با آب و اسپرس دیم عمل‌آوری با اوره (به ترتیب ۴۹/۲۱ و ۴۹/۷۳ میلی‌لیتر) با همدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵). حجم گاز نهایی تولیدی در ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون برای تیمارهای اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره و آب (۵۸/۲۴ و ۵۷/۶۶ میلی‌لیتر) بیش‌ترین میزان را نسبت به سایر تیمارها داشتند. تیمار اسپرس دیم بدون عمل‌آوری با ۴۳/۲۳ میلی‌لیتر کم‌ترین گاز تولیدی را داشت.

جدول ۳: تأثیر عمل‌آوری اسپرس آبی و دیم با آب یا اوره بر فراسنجه‌های تخمیر و گاز تولیدی

تیمار	فراسنجه‌های تخمیر			حجم گاز در زمان‌های مختلف(ساعت)				
	b	c	Lag phase	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
اسپرس آبی قبل از عمل‌آوری	۴۶/۲۶ c	۰/۰۴۵ d	۰/۶۵ c	۳۵/۷۷ d	۴۲/۳۸ c	۴۴/۷۳ c	۴۶/۵۳ d	۴۴/۶۷ c
اسپرس دیم قبل از عمل‌آوری	۴۴/۴۸ d	۰/۰۴۸ d	۰/۷۳ d	۳۳/۸۳ d	۴۰/۵۸ d	۴۲/۹۲ d	۴۳/۹۲ e	۴۳/۲۳ d
اسپرس آبی عمل‌آوری با آب	۵۹/۵۳ a	۰/۰۷۳ b	۰/۳۳ ab	۴۹/۲۱ b	۵۷/۳۵ a	۶۰/۰۶ a	۶۲/۲۲ a	۵۷/۶۶ a
اسپرس دیم عمل‌آوری با آب	۵۷/۷۳ b	۰/۰۷۱ b	۰/۴۲ b	۴۵/۷۶ c	۵۶/۰۱ b	۵۸/۹۵ ab	۵۹/۴۳ bc	۵۶/۱۰ b
اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره	۵۹/۴۴ a	۰/۰۷۸ a	۰/۲۳ a	۵۱/۷۸ a	۵۸/۲۷ a	۶۰/۰۳a	۶۰/۲۳ b	۵۸/۲۴ a
اسپرس دیم عمل‌آوری بااوره	۵۷/۸۹ b	۰/۰۷۵b	۰/۳۸b	۴۹/۷۳ b	۵۶/۰۹ b	۵۸/۴۰ b	۵۸/۳۹ c	۵۶/۶۰ b
SEM	۱/۱۶	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۴۶	۰/۳۸	۰/۴۸	۰/۴۹	۰/۳۵
سطح معنی‌داری	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲۵	۰/۰۰۱	۰/۰۱۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۵	۰/۰۰۲

SEM: خطای استاندارد میانگین، [a-d] در هر ستون اعداد دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

پارامترهای گاز تولیدی

نتایج جدول ۴ نشان داد بیش‌ترین غلظت ماده‌ی آلی هضم شده واقعی مربوط به تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با آب به میزان ۲۹۶ میلی‌گرم بود و بین تیمارهای اسپرس آبی و اسپرس دیم عمل‌آوری شده و بدون عمل‌آوری تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در مورد فاکتور جداکننده‌ی (PF) تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با آب با میزان ۶/۰۱ اختلاف معنی‌دار با تیمارهای‌دیگر داشت (P<۰/۰۵). میزان توده‌ی میکروبی تولید شده بین تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). به طوری که تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره با میزان ۱۴۹/۸۹ میلی‌گرم توده میکروبی بیش‌تری تولید کرد. اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره با ۵۱/۷۸ درصد بیش‌ترین و اسپرس دیم بدون عمل‌آوری با ۳۳/۸۳ درصد کم‌ترین بازدهی میکروبی را داشتند. میزان انرژی قابل متابولیسم در تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره بیش‌ترین مقدار را داشته و تیمار اسپرس دیم کم‌ترین انرژی قابل متابولیسم را داشت و بین تیمارها اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). جدول ۴ همچنین نتایج مربوط به میانگین pH و نیتروژن آمونیاکی در شیرابه‌ی انکوباسیون حاصل از تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. بر اساس جدول فوق عمل‌آوری با اوره موجب افزایش pH برای اسپرس آبی و دیم (به ترتیب ۶/۹۵ و ۶/۹۳) شد و با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵). همچنین pH تیمارهای اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری نسبت به سایر تیمارها کم‌تر بود (به

ترتیب ۶/۲۸ و ۶/۲۱). عمل‌آوری اسپرس با آب یا اوره موجب افزایش اندکی در pH شده است. بیش‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی برای اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با اوره (به ترتیب ۲۱/۷۳ و ۲۲/۰۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه) بود (P<۰/۰۵) . بین تیمارهای اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری با آب و اسپرس دیم و آبی بدون عمل‌آوری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵).

جدول ۴: تأثیر اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری بر پارامترهای گاز تولیدی و غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH در تخمیر برون‌تنی

تیمار	ماده آلی هضم شده واقعی (میلی گرم در ۱۰۰ گرم ماده آلی)	عامل جدا کننده (PF)	توده میکروبی تولیدشده (میلی‌گرم)	راندمان توده میکروبی (درصد)	انرژی‌قابل متابولیسم (مگاژول‌بر کیلوگرم ماده خشک)	نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)	pH
اسپرس آبی قبل از عمل‌آوری	۱۴۴^{e}	۴/۰۱ ^{e}	۵۰/۵۶ ^{e}	۳۵/۷۷ ^{d}	۶/۷۹ ^{d}	۱۸/۵۸ ^{b}	۶/۲۸^{d}
اسپرس دیم قبل از عمل‌آوری	۱۰۵ ^{f}	۳/۱۲ ^{f}	۳۴/۹۲^{f}	۳۳/۸۳ ^{e}	۶/۴۷ ^{e}	۱۸/۱۶ ^{b}	۶/۲۱^{d}
اسپرس آبی عمل‌آوری با آب	۲۹۶ ^{a}	۶/۰۱ ^{a}	۱۴۴/۵۳^{b}	۴۹/۲۱ ^{b}	۸/۸۸ ^{b}	۱۹/۳۱ ^{ab}	۶/۶۳^{b}
اسپرس دیم عمل‌آوری با آب	۲۳۷ ^{d}	۵/۱۹ ^{d}	۱۰۷/۵۹^{d}	۴۵/۷۶ ^{c}	۸/۳۵ ^{c}	۲۰/۴۶ ^{ab}	۶/۵۳^{c}
اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره	۲۹۲ ^{b}	۵/۶۴ ^{b}	۱۴۹/۸۵^{a}	۵۱/۷۸ ^{a}	۹/۳۰ ^{a}	۲۱/۷۳ ^{a}	۶/۹۵ ^{a}
اسپرس دیم عمل‌آوری بااوره	۲۷۱ ^{c}	۵/۴۴ ^{c}	۱۳۳/۵۲^{c}	۴۹/۷۳ ^{b}	۸/۹۶ ^{b}	۲۲/۰۲ ^{a}	۶/۹۳^{a}
SEM	۰/۸۳	۰/۰۲	۰/۸۹	۰/۱۹	۰/۰۳	۰/۲۷	۰/۰۳
سطح معنی‌داری	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲۷

SEM: خطای استاندارد میانگین، $^{a-d}$ در هر ستون اعداد دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

جمعیت میکروبی شکمبه

بر اساس جدول ۵ اثر علوفه اسپرس بدون عمل‌آوری و عمل‌آوری شده با آب یا اوره بر جمعیت کل باکتری‌های شکمبه معنی‌دار شد(P<۰/۰۵). تعداد باکتری‌های کل مایع شکمبه در اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری۶/۷۶ و ۱۰/۶۲ درصد نسبت به تیمارهای اسپرس آبی عمل‌آوری شده با آب یا اوره کمتر بود. بین تیمارهای اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با اوره و اسپرس آبی عمل‌آوری شده با آب از نظر جمعیت کل باکترهای شکمبه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵). نتایج نشان داد در ساعت های مختلف بعد از خوراک دهی کاهش جمعیت کل باکتریایی شکمبه در تیمارهای اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری روند شدیدتری نسبت به تیمارهای عمل‌آوری شده با آب یا اوره داشت. بر اساس جدول ۵ جمعیت باکتریهای تجزیه کننده سلولز (سلولولایتیک) نیز تحت تأثیر علوفه

اسپرس قرار گرفت و بین تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار اسپرس دیم بدون عمل‌آوری، جمعیت باکتریهای سلولولایتیک ۷/۸۷ درصد نسبت به تیمارهای عمل‌آوری شده با آب یا اوره کمتر بود. روند کاهش جمعیت باکتری‌های سلولولایتیک نیز در ساعت‌های مختلف خوراک‌دهی روند نزولی داشته اما در ۲، ۴ و ۶ ساعت بعد از خوراکی بین تیمارهای اسپرس عمل‌آوری شده با آب یا اوره تفاوت معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). جمعیت پروتوزوآها در تیمارهای اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری نسبت به تیمارهای عمل‌آوری شده با آب یا اوره به ترتیب با ۱۲/۳۱ و۱۵/۲۹ درصد کمتر بود (P<۰/۰۵). همچنین بین تیمارهای اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری با آب یا اوره تفاوت معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵). بر اساس جدول ۵ روند جمعیت پروتوزوآها در ساعت-های مختلف نمونه برداری روند کاهشی داشته اما این تغییرات در تیمارهای اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری روند نزولی شدیدتری داشت(P<۰/۰۵).

جدول ۵: تأثیر اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده با آب یا اوره و بدون عمل‌آوری بر جمعیت کل باکتری‌ها، باکتری‌های سلولولایتیک و پروتوزوآهای شکمبه

	تیمار						SEM	سطح معنی‌داری		
	اسپرس آبی	اسپرس دیم	اسپرس آبی عمل‌آوری با آب	اسپرس دیم عمل‌آوری با آب	اسپرس آبی عمل‌آوری با اوره	اسپرس دیم عمل‌آوری با اوره		تیمار	زمان	تیمار × زمان
کل باکتری شکمبه[1]	۲/۰۳^{c}	۲/۰۱^{c}	۲/۱۷ ^{ab}	۲/۱۴ ^{b}	۲/۲۶ ^{a}	۲/۲۲ ^{ab}	۰/۰۴	۰/۰۲۴	۰/۰۳۸	۰/۰۴۲
ساعت صفر	۲/۲۹	۲/۳۱	۲/۲۸	۲/۲۷	۲/۳۲	۲/۳۱	۰/۰۵	–	–	–
۲	۲/۰۹^{c}	۲/۰۶ ^{c}	۲/۲۱ ^{ab}	۲/۱۶ ^{b}	۲/۲۷ ^{a}	۲/۲۵ ^{a}	۰/۰۳	–	–	–
۴	۱/۹۱ ^{c}	۱/۸۷^{c}	۲/۱۴ ^{ab}	۲/۰۹ ^{b}	۲/۲۴ ^{a}	۲/۱۷ ^{ab}	۰/۰۴	–	–	–
۶	۱/۸۲ ^{c}	۱/۷۸^{c}	۲/۰۸ ^{b}	۲/۰۴ ^{b}	۲/۲۰ ^{a}	۲/۱۳ ^{ab}	۰/۰۳	–	–	–
باکتری‌های سلولولایتیک[2]	۲/۰۸ ^{b}	۱/۹۹^{c}	۲/۱۶ ^{a}	۲/۱۴^{a}	۲/۱۸ ^{a}	۲/۱۵ ^{a}	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۲۴	۰/۰۳۵
ساعت صفر	۲/۲۸	۲/۲۷	۲/۲۵	۲/۲۸	۲/۳۰	۲/۲۹	۰/۰۳	–	–	–
۲	۲/۱۳ ^{ab}	۲/۰۷ ^{b}	۲/۱۹ ^{a}	۲/۱۵ ^{ab}	۲/۲۱ ^{a}	۲/۱۸ ^{a}	۰/۰۲	–	–	–
۴	۲/۰۴ ^{b}	۱/۹۱ ^{c}	۲/۱۵^{a}	۲/۱۰ ^{a}	۲/۱۳ ^{a}	۲/۰۹ ^{ab}	۰/۰۲	–	–	–
۶	۱/۸۷ ^{b}	۱/۷۲ ^{c}	۲/۰۷ ^{a}	۲/۰۴ ^{a}	۲/۰۹ ^{a}	۲/۰۵ ^{a}	۰/۰۴	–	–	–
پروتوزوآها[3]	۴/۰۷ ^{b}	۳/۹۲ ^{b}	۴/۶۰ ^{a}	۴/۵۱ ^{a}	۴/۷۹ ^{a}	۴/۶۴ ^{a}	۰/۰۶	۰/۰۱۱	۰/۰۲۴	۰/۰۱۵
ساعت صفر	۵/۵۸	۵/۵۹	۵/۵۲	۵/۵۷	۵/۶۰	۵/۵۹	۰/۰۴	–	–	–
۲	۴/۲۴ ^{b}	۴/۱۲ ^{b}	۵/۰۷^{a}	۹۲۴ ^{a}	۵/۱۸ ^{a}	۵/۰۲ ^{a}	۰/۰۶	–	–	–
۴	۳/۶۲^{b}	۳/۴۵^{b}	۱۱۴ ^{a}	۳/۸۹^{a}	۴/۳۲^{a}	۴/۱۵ ^{a}	۰/۰۷	–	–	–
۶	۷۹۲^{b}	۶۴۲^{b}	۳/۷۲ ^{b}	۳/۶۵ ^{b}	۴/۰۷ ^{a}	۳/۸۲ ^{b}	۰/۰۷	–	–	–

۱- (۹ ۱۰×تعداد در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه)، ۲- (۸ ۱۰×تعداد در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه)، ۳- (۵ ۱۰×تعداد در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه)، SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، $^{a-c}$ در هر ستون اعداد دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

بحث

به طور کلی عمل‌آوری با اوره و آب باعث کاهش درصد ماده‌ی خشک شده که با نتایج به دست آمده توسط Makkar در سال ۱۹۹۵ و Ben Salem و همکاران در سال ۲۰۰۵ که روند کاهشی درصد ماده‌ی خشک توسط آب و ترکیبات قلیایی در علوفه‌های تانن‌دار را گزارش کرده‌اند مطابقت می‌کند. در این بین، مقدار کاهش ماده‌ی خشک برای اسپرس عمل‌آوری با اوره بیش‌ترین مقدار را داشته که با نتایج به دست آمده توسط Khalilvandi-Behroozyar و همکاران در سال ۲۰۰۹ متناقض است. در بین تیمارهای مختلف بیش‌ترین غلظت درصد پروتئین خام مربوط به عمل‌آوری با اوره بود. این امر احتمالاً به علت آزادسازی نیتروژن غیرپروتئینی در زمان عمل‌آوری و تغلیظ پروتئین خام در اسپرس می‌باشد. Khalilvandi-Behroozyar و همکاران در سال ۲۰۰۹ غلظت پروتئین خام اسپرس را ۱۲/۰۲ گزارش نمودند که در مقایسه با مقادیر به دست آمده برای اسپرس بدون عمل‌آوری در این گزارش (۱۲/۴۰ درصد) بود غلظت بیش‌تری برای اسپرس نشان می‌دهد. Turgut and Yanar سال ۲۰۰۴ گزارش نمودند مقدار پروتئین خام اسپرس ۱۱/۲ درصد که از غلظت پروتئین خام اسپرس دیم پژوهش حاضر کم‌تر است. اختلافات مشاهده شده می‌تواند مربوط به شرایط محیطی متفاوت کاشت، تفاوت در مدیریت زراعی، کودهی و زمان برداشت علوفه اسپرس باشد. به نظر می‌رسد اثر عمل‌آوری با اوره در مقایسه با آب تأثیر بیش‌تری در کاهش غلظت فیبر نامحلول در NDF اسپرس داشته است. نتایج Khalilvandi-Behroozyar و همکاران در سال ۲۰۰۹ مقادیر NDF بالاتری را نسبت به مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد. نتایج نشان دهنده‌ی تأثیر یکسان عمل‌آوری با اوره و آب روی کاهش ADF می‌باشد. از نظر ماده‌ی آلی، نتایج پژوهش حاضر با نتایج Khalilvandi-Behroozyar و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابقت داشته اما با نتایج Ben Salem و همکاران در سال ۲۰۰۵ که کاهش ماده‌ی آلی اسپرس را در اثر عمل‌آوری گزارش نموده‌اند، متناقض است. به طور کلی ماده‌ی آلی اسپرس آبی به میزان کم‌تری تحت تأثیر عمل‌آوری با آب و اوره بوده در حالی که این تأثیر بر ماده‌ی آلی اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری بیش‌تر بود.

بیش‌ترین تأثیر عمل‌آوری با آب یا اوره بر کاهش تانن کل و کم‌ترین تأثیر بر غلظت تانن متراکم بود. در این بین استفاده از آب یا اوره اثر مشابهی در کاهش ترکیبات فنولی و تانن‌ها در اسپرس آبی داشته است. این موضوع نشان داد اثر عمل‌آوری بر غلظت ترکیبات فنولی و تانن-های اسپرس در شرایط کشت آبی و دیم متفاوت بوده و اسپرس تحت شرایط کشت آبی به دلیل غلظت کم‌تر ترکیبات فنولی و تانن‌ها، شرایط مناسب‌تری برای تانن-زدایی و کاهش ترکیات فنولی تحت اثر عمل‌آوری با آب یا اوره داشته است. این موضوع در اثر عمل‌آوری بر هدر رفت کم‌تر ترکیبات شیمیایی همچون ماده‌ی آلی و پروتئین خام اسپرس آبی نسبت به اسپرس دیم نیز قابل اشاره می‌باشد. یکی از مشکلات مربوط به نوسانات غلظت تانن در گزارش‌های مختلف توانایی حلال‌های آلی مرسوم برای استخراج تانن‌ها همانند استون و متانول در استخراج تانن و شرایط خشک کردن اسپرس و ریزش برگ‌ها در حین خشک کردن در مزرعه بیان شده است (Makkar et al. 1995). ساز و کار تانن‌زدایی توسط عمل‌آوری با آب بدین صورت بوده که آب‌پاشی همراه با شرایط غیرهوازی نگهداری گیاه و خرد کردن علوفه موجب می‌شود با تحریک آنزیم‌های اکسیدکننده‌ی فنولی (آنزیم فنل اکسیداز) موجب اکسید شدن تانن شود و در نتیجه موجبات غیرفعال شدن ترکیبات فنولی گیاه را فراهم می‌کند. بر اساس برخی مطالعات منبع آنزیم فنل اکسیداز گیاه اسپرس بوده و خشک کردن علوفه اسپرس تا حدودی موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌شود اما موجب غیرفعال شدن آنزیم نمی‌شود (Makkar and Singh 1993,

Ben Salem et al. 2005). همچنین در گزارشی، عمل‌آوری دانه‌ی سورگوم با اوره موجب کاهش ۶۶ تا ۷۰ درصدی ترکیبات تانینی در مقایسه با تیمار بدون عمل‌آوری شده است (El Fadil and El Tinay 1993). مشابه یافته‌های فوق کاهش ترکیبات فنولی و تانن در برگ‌های یک نوع بلوط (*Q.incana*) عمل‌آوری شده با اوره گزارش شده است (Makkar and Singh 1993). ساز و کار کاهش تانن و ترکیبات فنولی در عمل‌آوری با اوره، می‌تواند باعث افزایش پلیمریزاسیون یا اکسیداسیون تانن به وسیله‌ی آنزیم فنل اکسیداز گیاه اسپرس باشد. ساز وکار کاهش تانن و ترکیبات فنولی در اکسیداسیون تانن به وسیله‌ی آنزیم‌های فنل‌اکسیداز موجب تبدیل ترکیب اورتو- دی- هیدروکسی فنل به اورتوکینون شده که این ترکیب تأثیر مثبتی بر عملکرد دام دارد (Makkar and Singh 1993, Ben Salem et al. 2005). غلظت تانن متراکم در این آزمایش نسبت به آزمایش انجام شده توسط Scharenberg و همکاران در سال ۲۰۰۷ کم‌تر، اما در مقایسه با غلظت‌های گزارش شده توسط Khalilvandi-Behroozyar و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیش‌تر بود. میزان غیرفعال شدن تانن کل در اثر عمل‌آوری با اوره در این آزمایش با مقادیر بعضی گزارش‌ها مطابقت داشت (Ben Salem et al. 2005, Khalilvandi-Behroozyar et al. 2009). بر اساس نتایج به دست آمده عمل‌آوری با آب می‌تواند برای غیرفعال کردن تانن‌ها نسبت به اوره کافی بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد.

پتانسیل تولید گاز بیش‌تر در اسپرس عمل‌آوری شده ممکن است مربوط به تانن باشد که در عمل‌آوری با آب یا اوره تانن‌زدایی شده و در نتیجه تولید گاز در اثر رفع ممانعت برای دسترسی میکروارگانیسم‌ها به ماده‌ی خوراکی و مزاحمت تانن برای آنزیم‌های میکروبی یا باند کردن خود میکروارگانیسم‌ها برداشته شده‌است (Ben Salem et al. 2005, Makkar and Singh 1993). یک رابطه‌ی معکوس بین سطح تانن و تولیدگاز وجود داشت. یکی از عوامل نرخ تولید گاز کم‌تر در تیمار اسپرس دیم بدون عمل‌آوری احتمالاً به بالاتر بودن میزان دیواره‌ی سلولی آن برمی‌گردد. بالاتر بودن میزان گاز تولیدی در عمل‌آوری اسپرس آبی با آب یا اوره در تمام زمان‌های انکوباسیون ناشی از کم‌تر بودن غلظت ADF و NDF آن بوده که این مطابق با گزارش Mahala و همکاران در سال ۲۰۰۷ بود. آن‌ها در مقایسه‌ی گاز تولیدی برگ و دانه تعدادی از خوراک‌ها بیان کردند که مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر بیش‌تر بودن میزان گاز تولیدی، کم‌تر بودن غلظت ADF و NDF آن‌ها می‌باشد. یکی دیگر از دلایل احتمالی افزایش گاز تولیدی در عمل‌آوری اسپرس آبی با آب یا اوره می‌تواند تأثیر کم‌تر تانن‌ها باشد (Makkar 2010, Makkar et al. 1995). بر این اساس تولید گاز بیش‌تر در اثر عمل‌آوری اسپرس می‌تواند به دلیل افزایش قابلیت دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه به مواد مغذی به خصوص نیتروژن باشد (Theodoridou et al. 2011). عمل‌آوری با آب و اوره سبب افزایش نرخ تولید گاز در هر ساعت و کاهش فاز تأخیری برای آغاز تولید گاز شده است. احتمالاً فاز تأخیری بیش‌تر اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری به دلیل بالاتر بودن غلظت دیواره‌ی سلولی باشد که زمان زیادی طول می‌کشد تا میکروارگانیسم‌ها شروع به چسبیدن و تجزیه‌ی آن نمایند. در عمل‌آوری با آب خرد کردن برگ‌ها و افزودن آب به همراه مدت زمان نگهداری مناسب در شرایط بی‌هوازی با تحریک آنزیم‌های اکسیدکننده‌ی فنولی (آنزیم فنل اکسیداز) سبب اکسید شدن تانن شده و در نتیجه موجبات غیرفعال شدن ترکیبات فنولی در اسپرس آبی (جدول ۲) و افزایش گاز تولیدی به عنوان پیامد تخمیر بیش‌تر شده است (Ben Salem et al. 2005, Makkar and Singh 1993). همچنین در تیمار عمل‌آوری با اوره پیوند تانن در کمپلکس تانن و پروتئین به وسیله‌ی خاصیت قلیایی اوره سست شده و اکسیداسیون تانن به وسیله‌ی آنزیم‌های فنل اکسیداز موجب کاهش سطح تانن در اسپرس و افزایش گاز تولیدی بیش‌تر شده است (Ben Salem et al. 2005, Makkar and Singh 1993). بهبود ماده‌ی آلی

هضم شده در تیمار اسپرس آبی عمل‌آوری با آب می‌تواند ناشی از افزایش سطح دسترسی میکروارگانیسم‌ها به مواد مغذی باشد (Ben Salem et al. 2005, Singh and Makkar 1993). به دلیل رابطه‌ی مستقیم بین ورود مواد تجزیه شده به توده‌ی میکروبی و میزان PF جیره، روند تغییرات توده‌ی میکروبی تولید شده تقریباً همسو با مقادیر PF بوده است. مقادیر PF در محدوده‌ای از ۲/۷ تا ۴/۴ برای خوراک‌های بدون تانن دامنه‌ی مناسبی ذکر شده است. مقادیر PF بالا نشان می‌دهد بخش بیش‌تری از ماده‌ی آلی حقیقی هضم شده برای توده میکروبی سنتز شده است (Blummel et al. 1997). اما در خوراک‌های حاوی تانن بالا PF عموماً بالای ۴/۴۱ می‌باشد. مقادیر بالای PF خوراک‌های حاوی تانن بالا می‌تواند به دلیل حل شدن تانن خوراک در طول تخمیر و در نتیجه کاهش ماده‌ی خشک (جدول ۱) بدون شرکت در تولیدگاز باشد.

اسپرس بدون عمل‌آوری به علت میزان تانن بالا در مقایسه با اسپرس عمل‌آوری شده با آب یا اوره جمعیت کل باکتریایی، پروتوزوآ و باکتری‌های سلولولایتیک کم‌تری نسبت به تیمارهای عمل‌آوری با آب یا اوره داشت. در مطابقت با نتایج McAllister و همکاران در سال ۱۹۹۴ در استفاده‌ی تانن متراکم *Brisfood trefoil* در گوسفند و Al-Dobaib در سال ۲۰۰۹ در استفاده از تانن کوبراچو در مایع شکمبه‌ی گوسفند، کاهش جمعیت کل باکتری‌های شکمبه و باکتری‌های سلولولایتیک گزارش شده است. یافته‌های Patra and Saxena در سال ۲۰۰۹ در آزمایش *in vitro* با استفاده از عصاره‌ی تانن نشان دادند که جمعیت کل باکتری‌ها کاهش یافت. در مطالعه‌ای توسط Jones و همکاران در سال ۱۹۹۴ استفاده از تانن متراکم اسپرس در آزمایش *in vitro* نشان از ممانعت رشد و فعالیت باکتری‌های پروتئولتیکی و کاهش فعالیت باکتری‌های سلولولایتیک شامل *بوتیروفیبر سولونس* و *استرپتوکوکوس بویس* شد. برخی گزارش‌ها میزان ۲ تا ۳ درصد تانن در جیره را عامل کاهش جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده‌ی الیاف بیان کرده‌اند اما این میزان تانن را روی متابولیسم باکتری‌های شکمبه و در نهایت بازدهی سنتز میکروبی بی‌تأثیر می‌دانند (Min et al. 2002). Molan و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش نمودند علت کاهش فعالیت باکتری‌های پروتئولتیک شکمبه در اثر غلظت تانن متراکم به میزان ۴۰۰ میکروگرم در هر لیتر مایع شکمبه و بیش از آن بود. در مطالعه‌ی McSweeney و همکاران در سال ۲۰۰۱ استفاده از عصاره‌ی تانن متراکم و قابل هیدرولیز در مایع شکمبه گوسفند موجب کاهش جمعیت باکتریایی شد. در مقابل Vasta و همکاران در سال ۲۰۱۰ در استفاده از تانن کوبراچو به میزان ۹/۵۷ درصد ماده‌ی خشک تغذیه بره‌ها گزارش کردند تعداد باکتری‌ها کاهش یافته اما تعداد پروتوزوآها افزایش یافت.

پروتوزوآ به علت هضم سریع و ذخیره‌ی نشاسته باعث پایداری شکمبه و ثبات pH می‌شوند. تانن‌ها می‌توانند با کاهش اتصال میکروارگانیسم‌ها به ذرات غذایی، مهار رشد میکروارگانیسم‌ها و مهار فعالیت آنزیم‌های میکروبی باعث کاهش تخمیر، کاهش هضم مواد مغذی و کاهش تولید متان شوند (McSweeney et al. 2001). در مورد میزان پروتوزوآها و اثر تانن بر آن‌ها نتایج تا حدودی متناقض است به طوری که Makkar و همکاران در سال ۱۹۹۵ و Baah و همکاران در سال ۲۰۰۷ کاهش تعداد پروتوزوآها را در اثر مصرف تانن را گزارش کرده‌اند. در حالی که Benchaar و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر تانن را بر تعداد پروتوزوآها معنی‌دار گزارش نکرده و Vasta و همکاران در سال ۲۰۱۰ استفاده از تانن را موجب افزایش تعداد پروتوزوآ گزارش کرده‌اند. در واقع ترکیب شیمیایی، ترکیبات فنولی و تانن موجود در اسپرس آبی و دیم عمل‌آوری شده موجب ایجاد اختلال در روند طبیعی تخمیر و کاهش هضم نشده است و فعالیت میکروارگانیسم‌ها خیلی تحت تأثیر قرار نگرفته است. عمل‌آوری اسپرس با آب و اوره موجب شده بخش عمده‌ای از خوراک به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها صرف تولید پروتئین میکروبی شده و با عدم عمل‌آوری اسپرس دیم و آبی، پروتئین میکروبی تولید شده کاهش می‌یابد که

تاییدکننده‌ی یافته‌های بخش تولید گاز نیز می‌باشد (Niderkorn et al. 2012).

به طور کلی تانن اسپرس موجب کاهش تولید گاز در کل فرآیند تخمیر و کاهش قابلیت هضم ماده‌ی آلی در پایان انکوباسیون شده است. اما با این که مقدار گاز تولیدی در اثر عمل‌آوری با آب یا اوره افزایش یافته اما همزمان راندمان تولید توده میکروبی نیز افزایش یافته است. این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که ماده‌ی آلی تجزیه شده به جای این که به سمت تولید اسید چرب و گاز بیش‌تر برود، موجب تولید توده میکروبی بیش‌تر شده است. بر این اساس اگر تبدیل ماده‌ی آلی هضم شده به توده‌ی میکروبی در مقایسه با تولید گاز (اسیدهای چرب) بیش‌تر باشد، بازدهی استفاده‌ی همزمان از کربن و نیتروژن افزایش می‌یابد (Makkar 2010).

مطالعات نشان می‌دهد همبستگی بالایی بین میزان انرژی قابل متابولیسم، گاز تولید شده در ۲۴ ساعت انکوباسیون و ترکیب شیمیایی مواد خوراکی وجود دارد (Menk and Stingass 1988). مقادیر محاسبه شده انرژی قابل متابولیسم در این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط Khalilvandi-Behroozyar و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Scharenberg و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد. به نظر می‌رسد وجود تانن اسپرس در این آزمایش روی میزان انرژی قابل متابولیسم تأثیرگذار بوده و سبب کاهش آن شده است. این موضوع نشان می‌دهد اثر عمل‌آوری موجب افزایش ماده‌ی آلی قابل هضم و به دنبال آن افزایش انرژی قابل متابولیسم در تیمارهای عمل‌آوری شده با آب یا اوره شده است.

عمل‌آوری اسپرس با آب یا اوره موجب افزایش اندکی در pH شده است ($P<0/05$). pH شکمبه عاملی مهم در میزان قابلیت هضم خوراک در نشخوارکنندگان بوده که سقوط آن به کم‌تر از ۵/۸ فعالیت باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های سلولولیتیک در شکمبه را محدود کرده و قابلیت هضم فیبر، بازده‌ی خوراک و در نهایت انرژی قابل متابولیسم را کاهش می‌دهد (Khafipour et al. 2009). در آزمایش حاضر، دامنه‌ی pH تیمارها به مقدار ایده‌آل برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها (۶/۱-۶/۴) نزدیک بوده است. نیتروژن آمونیاکی به عنوان مهم‌ترین محصول حاصل از تخمیر ترکیبات نیتروژن‌دار در شکمبه به شمار می‌رود و منبع اصلی آن تجزیه‌ی پروتئین می‌باشد (Makkar 2003). برخی مطالعات کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در اثر استفاده از علوفه‌ی اسپرس به علت تانن متراکم را گزارش کرده‌اند (Theodoridou et al. 2011, Niderkorn et al. 2012) . این محققین کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش میزان تانن را به دلیل آزاد شدن آهسته‌تر آمونیاک از جیره و مصرف سریع‌تر آمونیاک توسط میکروارگانیسم‌ها نسبت داده‌اند. ساز و کار مذکور در توافق با نتایج آزمایش حاضر است. تانن‌ها به وسیله‌ی تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها، موجب کاهش تجزیه‌ی آن‌ها در شکمبه شده که در نهایت موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه می‌شود. علاوه بر این، تانن‌ها از طریق مهار فعالیت آنزیم دآمیناز میکروبی و مهار فعالیت آنزیم اوره‌آز نیز می‌توانند موجب کاهش میزان آمونیاک در شکمبه شوند (Makkar 2003, Min et al. 2002).

با توجه به این که بین تیمارهای عمل‌آوری با آب و بدون عمل‌آوری تفاوت معنی‌دار نشد، اثر تانن روی متابولیسم پروتئین شکمبه‌ای می‌تواند مربوط به قابلیت تانن‌ها برای اتصال به پروتئین به منظور کاهش فعالیت آنزیم‌های میکروبی و کاهش نرخ رشد باکتری‌های پروتئولیتیک و در نهایت کاهش آمونیاک شکمبه‌ای باشد (McSweeney et al. 2001). با توجه به این موضوع که تانن در اسپرس آبی و دیم بدون عمل‌آوری از طریق کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه موجب کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی در شکمبه می‌شود (Theodoridou et al. 2011, Niderkorn et al. 2012). پس می‌توان نتیجه گرفت عمل‌آوری اسپرس با آب نیز احتمالاً ساز و کاری مشابه داشته باشد. این موضوع نشان داد اثر تانن-

زدایی با آب همچون اسپرس بدون عمل‌آوری موجب کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه شود.

به طور کلی نتایج نشان داد استفاده از عمل‌آوری آب یا اوره برای تانن‌زدایی روش مناسبی برای کاهش یا حذف اثرات تانن می‌باشد. از سوی دیگر، بخشی از تفاوت‌ها در میزان فراسنجه‌های تخمیر به دست آمده برای مواد خوراکی مورد آزمایش ناشی از تفاوت در ترکیب شیمیایی آن‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد عمل‌آوری اسپرس با آب روی کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه نقش مثبتی داشته و بر روند طبیعی تخمیر، هضم و فعالیت میکروارگانیسم‌ها شکمبه اثر منفی نداشت. از طرفی عمل‌آوری اسپرس با آب روش موفق و ارزان‌تری نسبت به روش استفاده از اوره بود. لذا توصیه می‌شود از روش عمل‌آوری اسپرس با آب استفاده شود.

منابع

مجیدی، محمدمهدی و ارزانی، احمد (۱۳۸۳). مطالعه روابط بین صفات مورفولوژیک، زراعی و کیفی در توده‌های اسپرس (*Onobrychis viciifolia*)، مجله پژوهش‌های تولیدات گیاهی، جلد ۱۶، شماره ۲، صفحات ۱۵۹-۱۷۲.

یوسفی، بایزید و جعفری، علی‌اشرف (۱۳۹۳). ارزیابی خصوصیات کمی و کیفی علوفه اکوتیپ‌های بومی اسپرس زراعی (*Onobrychis viciifolia*) در شرایط آبی ودیم کردستان. فصلنامه تحقیقات مرتع و بیابان ایران، جلد ۲۱، شماره ۳، صفحات ۵۴۹-۵۶۱.

Al-Dobaib, S.N. (2009). Effect of different levels of quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. Animal Science, 80:532-541.

AOAC. (2007). Official Methods of Analysis.16thed. Association of Official Analytical Chemisis.Arlington,VA.

Baah, J., Ivan, M., Hristov, A.N., Koenig, K.M., Rode, L.M., and McAllister, T.A. (2007). Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. Animal Feed Science and Technology, 137: 126-137.

Beever, D.E. and Siddons, R.C. (1986). Digestion and metabolism in the grazing ruminant. In: Milligan, L.P., Grovum, W.L. and Dobson, A. Control of digestion and metabolism in ruminants. Prentice-Hall. Englewood.

Ben Salem, H.; Saghrouni, L. and Nefzaoui, A. (2005). Attempts to deactivate tannins in fodder shrubs with physical and chemical treatments. Animal Feed Science and Technology, 122: 109-121.

Benchaar, C.; McAllister, T.A. and Chouinard, P.Y. (2008). Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or Yucca schidigera saponin extracts. Journal Dairy Science, 91, 4765-4777.

Blummel, M. and Ørskov, E.R. (1993). Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Animal Feed Science and Technology, 40: 109-119.

Blümmel, M.; Makkar, H.P.S. and Becker, K. (1997). *In vitro* gas production: a technique revisited. Animal Physiology and Animial Nutrition, 77: 24-34.

Broderick, G.A. and Kang, J.H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal Dairy Science, 63: 64-75.

Dehority, B.A.; Tirabasso, P.A. and Grifo, A.P. (1989). Most probable number procedure for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. Applied and Environmental Microbiology ,55: 2789.

El Fadil, E.B. and El Tinay, A.H. (1993). Effect of soaking in water or in sodium carbonate on tannin content and *in vitro* protein digestibility of sorghum cultivars. International Journal of Food Science and Technology, 28: 389-395.

France, J.; Dijkstra, J.; Dhanoa, M.S.; Lopez, S. and Bannink, M. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profile observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. British Journal of Nutrition, 83: 143-150.

Jones, G.A.; McAilister, T.A.; Muir, A.D. and Cheng, J. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. Applied Environment Microbiology, 60: 1374-1378.

Khafipour, E.; Krause, D.O. and Plaizier, J.C. (2009). Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. Journal Dairy Science, 92:1712–1724.

Khalilvandi-Behroozyar, H.; Dehghan-Banadaki, M. and RezaYazdi, K. (2009). Removal of tannins can cause improvements in ruminal cell wall degradation and total tract apparent NDF digestibility of Sainfoin (*Onobrychis vicifolia*). EAAP Annual Meeting, Barcelona, Spain, P: 589.

Koch, D.W.A.; Detzenko, D. and Hinze, G.D. (1972). Influence of three cutting systems on the yield, water use efficiency and forage quality of sainfoin. Agronomy, 64: 463-467.

Mahala, A.G. and Fadel Elseed, A.N.M.A. (2007). Chemical composition and in vitro gas production characteristics of six fodder trees leaves and seeds. Resarch Journal of Agriculture and BioScience, 3(6): 983-986.

Makkar, H.P.S.; Blümmel, M. and Becker, K. (1995). *In vitro* effects and interactions of tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. Journal of the Science of Food and Agriculture. 69: 481-493.

Makkar, H.P.S. (2003). Quantification of tannins in tree and shrub foliage. In: Makkar,H.P.S. (Ed.), *A* Laboratory Manual. Kluwer Academic Publishers, P: 102.

Makkar, H.P.S. (2010). *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: Vercoe, P.E., Makkar,H.P.S. and Schlink, A.C. (eds.) *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Pp: 107-144. Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands.

Makkar, H.P.S. and Singh, B. (1993). Effect of storage and urea addition on detannification and *in sacco* dry matter digestibility of mature oak (*Quercus incana*) leaves. Animal Feed Science and Technology, 41: 247-259.

McAllister, T.A.; Bae, H.D.; Yanke, L.J.; Cheng, K.J. and Muir, A. (1994). Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. Canadian Journal Microbiology, 40: 298-305.

McSweeney, C.S.; Palmer, B.; McNeill, D.M. and Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technoogy, 91: 83-93.

Menk, K.H. and Stingass, 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.

Min, B.R.; Attwood, G.T.; Reilly, K.; Sun, W.; Peters, J.S.; Barry, T.N. and McNabb, W.C. (2002). Lotus corniculatus condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. Canadian Journal Microbiology, 48: 911-921.

Min, B.R.; Barry, T.N.; Attwood, G.T. and McNabb, W.C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal Feed Science and Technology, 106: 3-19.

Molan, A.L.; Hoskin, S.O.; Barry, T.N. and McNabb, W.C. (2000). Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. The Veterinary Record, l47: 44-48.

Niderkorn, V.; Mueller-Harvey, I.; Le Morvan, A. and Aufrère, J. (2012). Synergistic effects of mixing cocksfoot and sainfoin on in vitro rumen fermentation. Role of condensed tannins. Animal Feed Science and Technology, 178: 48-55.

NRC. (2007). Nutrient Requirements of Sheep.7threv. Ed. Natl. Acad. Sci. National Research Council. Washington.

Obispo, N.E. and Dehority, B.A. (1992). A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factor affecting their concentration in the rumen. Journal of Microbiology Methods, 16: 259-270.

Patra, A.K. and Saxena, J. (2009). Dietary Phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. Nutrition Research Reviews, 22 (2): 204-219.

SAS. (2003). SAS User's Guide.Version 9.1. Statistical Analysis Systems Institute. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Scharenberg, A.; Arrigo, Y.; Gutzwiller, A.; Wyss, U.; Hess, H.; Kreuzer, M. and Dohme, F. (2007). Effect of feeding dehydrated and ensiled tanniniferous sainfoin(*Onobrychis viciifolia*) on nitrogen and mineral digestion and metabolism of lambs. Archives of Animal Nutrition, 61: 390-405.

Smoliak, S.; Ditterline, R.L.; Majerus, M.E.; Scheetz, J.C.; Holzworth, L.K.; Sims, J.R. et al. (1993). Plant species: 8–169. In: Baldridge, D.E. and Lohmiller, R.G. (Eds.). Montana Interagency Plant Materials, Handbook for Forage Production, Conservation, Reclamation, and Wildlife. Montana State University.

Tanner, G.J.; Moore, A.B. and Larkin, P.J. (1994). Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*. British Journal of Nutrition, 71: 947-958.

Theodoridou, K.; Aufrère, J.; Niderkorn, V.; Andueza, D.; Le Morvan, A.; Picard, F. and Baumont, R. (2011). *In vitro* study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles. Animal Feed Science and Technology, 170: 147-159.

Turgut, L. and Yanar, M. (2004). *In situ* dry matter and crude protein degradation kinetics of some forages in Eastern Turkey. Small Ruminant Research, 52: 217-222.

Van Soest, P.J.; Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal Dairy Science, 74: 3583-3597.

Vasta, V.; Yanez-Ruiz, D.R.; Mele, M.; Serra, A.; Luciano, G.; Lanza, M. et al. (2010). Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of sheep fed a diet containing added tannins. Applied and Environmental Microbiology, 76(8): 2549-2555.

Effects of sainfoin tannin treated by water or urea on microbial population, gas production parameters, digestibility and in vitro fermentation

Yarahmadi, B.[1]; Chaji, M.[2]; Boujarpour, M.[3]; Mirzadeh, Kh.[3] and Rezaei, M.[4]

Received: 02.03.2016 Accepted: 08.08.2015

Abstract

This experiment with aim to determine the effect of the tannins in dry land and irrigated sainfoin forage treated by water or urea on gas production (GP) parameters, *in vitro* fermentation characteristics and microbial population was carried out. Treatments were consist of untreated irrigated sainfoin (UNIS), untreated dry land sainfoin (UNDS), irrigated sainfoin by water (ISTW), dryland sainfoin treated by water (DSTW), irrigated sainfoin treated by urea (ISTU) and dry land sainfoin treated by urea (DSTU). Data of GP method were analyzed by repeated measurement and data other analyzed with CRD design. The results showed that treated by water or urea was due to reduce dry matter (DM). The most crude protein (CP) was relation to treated by urea (14.25%). The effect of treated by water or urea had the most decreasing of total phenolic compounds, total and condensed tannin in irrigated sainfoin ($P<0.05$).The results showed ISTW and ISTU treatments were highly on potential of GP and gas production rate (GPR).Increasing of GP in ISTW and ISTU treatments indicated detanning effect of treated by water or urea. The most truly degraded substrate (TDS) was related to ISTW treatment and the least UNDS (296 and 105mg, respectively). Partitioning factor in ISTW treatment (6.01) was significantly difference other treatments ($P<0.05$). Sainfoin tannin was due to decrease GP in total process of ruminal fermentation.The least N-NH3 concentrations was related to UNDS and the most were ISTU and DSTU treatments ($P<0.05$). The effect of treatments on the total number of rumen bacteria, cellulolytic bacteria and protozoa were significant ($P<0.05$). Overall, treated sainfoin by urea or water was due to no change of total number of rumen bacteria, cellulolytic bacteria and protozoa and increasing of the microbial biomass efficiency and synthesis. Generally, treated by water was more successful and cheaper method than the use of urea.

Key words: Gas production parameters, Microbial population,Tannin, Sainfoin, Treated

1- PhD Graduated of Animal Nutrition, Faculty of Animal and Food Science, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Animal Nutrition, Research Institute of Animal Sciences, Karaj, Iran
Corresponding Author: Chaji, M., E-mail: chaji@ramin.ac.ir