Archive of SID

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Research

مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۱ شماره ۳/ سال ۱۴۰۰/ صفحات ۱ تا ۹

DOI: 10.22034/AS.2022.36369.1524

اثرات تغذیه سیلاژ تفاله و تفاله خشک دانه انار بر میکروفلور روده بره‌های نر نژاد مهربان

فاطمه برومند،[۱] سید مهدی قریشی[۲]*، سعید حسین‌زاده[۳] و شهریار کارگر[۴]

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۲۷

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۲]استادیار بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۳]استاد بخش بهداشت موادغذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

[۴]دانشیار بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

*مسول مکاتبه: E mail: smghoreishi@shirazu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: انار به‌دلیل ترکیبات فنولی (فلاونوییدها و تانن‌ها) که بیش‌تر در پوست و آب انار گردآمده‌اند دارای ویژگی‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی است که این ویژگی‌ها در گونه‌های مختلف انار از لحاظ قدرت و طیف یکسان نیستند. **هدف:** هدف از این آزمایش بررسی اثرات سیلاژ تفاله (به نسبت برابر از مخلوط دانه و پوسته) و تفاله خشک دانه انار بر دو باکتری مفید (لاکتوباسیلوس) و مضر (اشریشیا کلی) دستگاه گوارش بره‌های پرواری بود. **روش کار:** شمار ۹ رأس بره‌ی نر نژاد مهربان (با میانگین وزنی ۳/۵ ± ۲۷/۰۳ کیلوگرم، و میانگین سنی ۱/٤ ± ۸/ ۱۸۷ روز)، با سه جیره آزمایشی هم‌انرژی و هم‌پروتئین (جیره شاهد، جیره دارای ۲۷/۲۰ درصد سیلاژ تفاله انار و جیره دارای ۳۱/٤۰ درصد تفاله خشک دانه انار) به‌مدت ٦۰ روز در جایگاه انفرادی خوراک‌دهی شدند. برای شمارش فلورمیکروبی روده، پس از کشتار، یک گرم نمونه تازه گوارشی از ایلیوم و سکوم جمع‌آوری شد. نمونه‌ها روی سطح محیط کشت آگار گسترش یافت. کلنی‌ها به روش چشمی شمارش و تعداد باکتری‌ها به‌صورت واحد CFU (تعداد کلنی در هر گرم) محاسبه شد. برای کشت میکروب‌های لاکتوباسیلوس، محیط کشت MRS آگار و برای باکتری اشریشیاکلای (*Escherichia. coli*) محیط کشت MC (مکانکی) آگار استفاده شد. برای تایید نهایی باکتری‌های جدا شده روی آگار مکانکی از آزمون PCRاستفاده شد. **نتایج:** یافته‌های این پژوهش نشان داد که شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس در ایلیوم و سکوم تحت تأثیر خوراک‌دهی پسماند انار قرار نگرفت (P>۰/۰۵). میانگین شمار اشریشیاکلای در بره‌هایی که پسماند انار دریافت کرده بودند در ایلیوم و سکوم از گروه شاهد کم‌تر بود (P<۰/۰۵) ولی اختلاف معنی‌داری میان دو گروه تغذیه شده با پسماند انار دیده نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** به نظر می‌رسد به‌کارگیری تفاله انار می‌تواند موجب کاهش جمعیت باکتری‌های اشریشیا کلی در ایلیوم و سکوم بره‌های نژاد مهربان شود.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلای، ایلیوم، بره نژاد مهربان، تفاله انار، سکوم، لاکتوباسیلوس

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* از خانواده‌ی پونیکاسه، یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی شناخته

www.SID.ir

Archive of SID

شده است (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۳). انار دارای ترکیبات فنولی شامل فلاونوییدها (آنتوسیانیدین، کاتچین) و تانن قابل‌آبکافت (پونیکالین[1] پونیکالاجین[2] اسیدگالیک[3] و اسید الاژیک[4]) است. این ترکیبات در پوست و آب انار تجمع یافته‌اند و ۹۲ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی انار را تشکیل می‌دهند (آدامز و همکاران ۲۰۱۰ و عبید و همکاران ۲۰۱۷). مهم‌ترین ترکیب فنولی برای مهار باکتری‌ها، اسیدگالیک است (احمت و همکاران ۲۰۰۹). کل تانن برای پوست و تفاله دانه انار به‌ترتیب ۹/۷۳ و ۰/٦٦ درصد گزارش شده است (دلاور و همکاران ۲۰۱٤). میوه انار دارای ویژگی‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی است که می‌تواند علیه طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها اثر قابل توجهی داشته باشد. میزان اثر ضدمیکروبی انار در گونه‌های مختلف از لحاظ قدرت و طیف اثر متفاوت است (کارلتون و همکاران ۲۰۰۰). ترکیبات فنلی گیاهان و غذاها با تغییر جمعیت میکروبی روده موجب افزایش باکتری‌های مفید و کاهش باکتری‌های مضر می‌شوند (کاتیار ۲۰۰۲). باکتری‌های روده پیامدهای مهمی بر عملکرد سد مخاطی و بلوغ روده داشته و برای تکامل بافت لنفی ضروری هستند؛ هم‌چنین کمبود یا نبود این باکتری‌ها موجب نقص در عملکرد سد روده‌ای می‌شوند (کلاور و ون‌درمیر ۱۹۹۳). مشخص شده است میکروفلور روده نقش بسیار مهمی در سلامت دستگاه گوارش بازی می‌کند و این جمعیت میکروبی به جیره غذایی به‌عنوان منبع نهایی برای متابولیسم ترکیبات آلی وابسته است (چوکت و همکاران ۱۹۹٦)؛ بنابراین اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی اغلب به‌دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضدباکتری و محرک سیستم ایمنی در رژیم غذایی حیوانات کاربرد پیدا کرده‌اند (لی و همکاران ۲۰۱۸). اثر فرآورده‌های فرعی انار بر عملکرد دام و شکمبه در مقالات فراوانی بررسی شده است اما تاکنون به تاثیر این فرآورده‌ها بر میکروفلور روده در نشخوارکنندگان پرداخته نشده است؛ از این رو با توجه به غلظت بالای تانن و ترکیبات فنولی در فرآورده‌های فرعی انار و تاثیری که این ترکیبات می‌توانند بر میکروفلور روده داشته باشند، هدف از این پژوهش، بررسی اثر سیلاژ تفاله انار و تفاله خشک دانه انار بر میکروفلور روده، در بره‌های پرواری نژاد مهربان بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با ۹ راس بره‌ی نر نژاد مهربان با میانگین سنی ۱/٤ ± ۱۸۷/۸ روز و میانگین وزن زنده ۳/٥ ± ۲۷ کیلوگرم به مدت ٦۰ روز (به‌همراه ۲۰ روز دوره سازگاری به جیره و جایگاه) در ایستگاه تحقیقاتی و آموزشی دانشکده کشاورزی شیراز انجام شد. جیره‌ها بر پایه نیازهای بیان شده در جدول احتیاجات مواد غذایی گوسفند (ان آر سی ۲۰۰۷)، با انرژی و پروتئین یکسان، تنظیم شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: جیره شاهد، جیره دارای ۲۷ درصد سیلاژ تفاله انار و جیره دارای ۳۱ درصد تفاله خشک دانه‌ی انار (مخلوط پوست و دانه از رقم یوسف‌خانی) بود (جدول ۱). جیره‌ها به‌صورت کاملا مخلوط در دو نوبت (۹ صبح و ٥ بعدازظهر)، و آب به صورت آزاد به بره‌ها داده شد. در پایان بره‌ها در کشتارگاه ایستگاه کشتار شدند. برای محاسبه جمعیت میکروبی، بعد از کشتار، یک گرم از محتویات گوارشی از ایلیوم و سکوم در ظروف استریل جمع‌آوری و برای شمارش میکروبی به آزمایشگاه منتقل شد. در این پژوهش برای کشت میکروب‌های لاکتوباسیلوس که گرم مثبت و بی‌هوازی می‌باشند از محیط کشت MRS آگار (تولیدی شرکت Merck آلمان) و برای باکتری اشریشیاکلای از محیط کشت MC آگار (تولیدی شرکت Merckآلمان) استفاده شد. سپس روی محیط ائوزین متیلن بلو[5] کشت داده شدند و از آزمایش‌های بیوشیمیایی مربوطه شامل Motility, Citrate, TSI استفاده شد.

[1] Punicalin
[2] Punicalagin
[3] Gallic acid
[4] Ellagic acid
[5] Eosin methylen blue

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها پس از همگن شدن، در آب سترون پی در پی رقیق شد. رقیق‌سازی با ضریب رقت ۱۰، با رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} برای نمونه‌های ایلیوم و سکوم ادامه یافت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه از هر رقت روی سطح محیط کشت آگار گسترش یافت. دمای انکوباسیون برای همه نمونه‌ها ۳۷ درجه و مدت زمان ۲٤ ساعت بود. کلنی‌ها به روش چشمی شمارش شده و تعداد باکتری‌ها محاسبه شدند. تعداد نهایی باکتری پس از تهیه رقت‌های ده‌دهی و شمارش بر روی پلیت به‌صورت تعداد کلنی در واحد گرم گزارش شد. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS و با سطح معنی‌داری پنج درصد آنالیز شدند. برای تایید نهایی باکتری‌های جدا شده روی آگار مکانکی، از آزمون PCR استفاده شد.

چگونگی تهیه سیلاژ تفاله انار

پیش از تهیه سیلاژ از تفاله تر انار (مخلوط پوست و تفاله‌دانه) ماده خشک نمونه‌ها به وسیله آون الکتریکی در آزمایشگاه تغذیه دام بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی شیراز تعیین شد. تفاله انار رقم یوسف‌خانی (مخلوط پوست و دانه)، به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط شدند و سپس ۳ درصد کاه گندم و ۲ درصد اوره به آن‌ها افزوده شد و پس از همگن شدن اجزای سیلاژ، در بشکه‌های ۲۲۰ لیتری درب‌دار به‌خوبی فشرده شدند تا هوای میان آن‌ها خارج شود. برای ایجاد شرایط بی‌هوازی بهتر، نخست نایلون‌های پلاستیکی با اندازه بزرگ در داخل بشکه‌ها قرار داده شد، و پس از ریختن اجزای سیلاژ داخل بشکه‌ها و فشرده‌شدن، درب نایلون‌های پلاستیکی گره زده شد و درب بشکه‌ها بسته شدند. سیلوها پس از ٥ ماه باز شدند. ترکیب شیمیایی تفاله دانه انار و سیلاژ مخلوط تفاله پوسته و دانه در جدول ۲ آمده است. دیگر اجزای جیره شامل ذرت ایرانی، یونجه و سبوس‌گندم، از تعاونی بهشیر شهرستان بیضاء تهیه شدند. برای تهیه جیره، پس از آماده شدن خوراک‌ها پیش از شروع آزمایش، ترکیب‌های شیمیایی آن‌ها برای تنظیم جیره اندازه‌گیری شدند

Table 1- Percentage of feedstuffs used in experimental rations and chemical composition of rations (%DM)

Feedstuffs	Diets		
	Control	Pomegranate pulp silage	Pomegranate seed pulp
Alfalfa	32.1	12	21
Corn grain	59.9	54.3	40.9
Wheat bran	7	5.4	5.8
Pomegranate seed pulp	-	-	31.4
Pomegranate pulp silage	-	27.2	-
Vitamin/mineral premix*	1.0	1.1	0.9
Total	100	100	100
Chemical composition			
Dry matter	89	64	93
Crude protein	12	12	12
Crude Ash	2.50	3.70	5.30
Crude fat	6.50	4.40	5.10
Metabolizable Energy (Mcal/kg)	2.67	2.60	2.68

www.SID.ir

Archive of SID

Mineral/vitamin Premix contained (per kg): Ca, 120 g; P, 30 g; Na, 55 g; Mg, 20 g; Zn, 3 g; Fe, 3 g; Mn, 2 g; Cu, 280 mg; Co, 100 mg; Se, 1 mg; K, 215 mg; I, 100 mg; vitamin E, 100 mg; vitamin A, 500,000 IU; vitamin D3, 100,000 IU; antioxidant, 400 mg.

Table 2- Chemical composition of pomegranate by-products (DM%)

	Dry matter	Crude protein	Ash	Crude fat	pH	Metabolizable Energy (Mcal/kg)
Pomegranate dried seed pulp	95.00	12.00	2.30	11.50	-	2.30
Pomegranate Pulp Silage	35.00	17.00	4.10	6.70	4.30	2.10

Table 3 - Specifications of primers used in the PCR process

Primer name	Sequences	Temperature and humidity	Finished product size	Reference
Eco 223 (F)	ATC AAC CGA GAT TCC CCC AGT	64 ºC	232	Riffon *et al*. 2001
Eco 455 (R)	TCA CTA TCG GTC AGT CAG GAG			

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای تایید تشخیص *Escherichia. coli* جدا سازی شده روی محیط مکانکی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد که خود شامل استخراج DNAباکتری با روش کیت استخراج DNA (Bioneer ساخت کره جنوبی)، مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز فراورده‌های PCR بود. در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن 23S rRNA و تکثیرآن با واکنش PCR اقدام به شناسایی مولکولی باکتری شد. پرایمرهای اختصاصی به‌کار رفته برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۳ آمده است، هم‌چنین شرایط PCR شامل مراحل زیر بود: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و مجموع ۳۵ سیکل، مراحل دناتوراسیون ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ٤٥ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه.

شناسایی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

شناسائی و ارزیابی محصولات PCRبا استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۷ و زیر اشعه ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن[1]انجام شد. در نهایت، با مشاهده اندازه باندهای نمونه و مقایسه آن‌ها با باند مارکر نتایج تفسیر شد. باندهای معادل ۲۳۲ جفت بازی به‌عنوان باکتری *Escherichia coli* در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

یافته‌های مربوط به مقایسه‌ی دو محیط کشت MRS و MC در بره‌های خوراک‌دهی شده با جیره‌ی سیلاژ انار و تفاله خشک دانه انار در جدول ٤ آمده است. در محیط MRS، هم در ایلیوم و هم در سکوم، شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس در گروه‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. در محیط کشت MC میانگین تعداد باکتری ای‌کلای تحت تاثیر تیمار قرار گرفت ($P<۰/۰۵$)، به‌گونه‌ای که میانگین تعداد اشریشیاکلای در ایلیوم و سکوم درگروه شاهد بیش‌تر از دو گروه دیگر بود که تفاله انار دریافت کرده بودند؛ درحالی‌که میان دو گروهی که سیلاژ تفاله و تفاله خشک دانه انار دریافت کرده بودند تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P>۰/۰۵$).

[1] Gel documentation

www.SID.ir

Archive of SID

نقش شایان توجه میکروفلور روده در سلامت دستگاه گوارش به‌خوبی شناخته شده است. از سویی این جمعیت میکروبی وابسته به جیره غذایی است (چوکت و همکاران ۱۹۹٦). لاکتوباسیلوس‌ها در بهبود اکوسیستم میکروبی روده نقش دارند (لایلی و ستیل‌ول ۱۹۹۵). آن‌ها توانایی زنده ماندن و اتصال به بافت اپیتلیوم روده را دارند و با اثر مثبتی که روی غشای مخاطی مجرای گوارشی می‌گذارند، سبب افزایش عملکرد حیوان نیز می‌شوند (نایب‌پور و همکاران ۲۰۰۷). برعکس، اشریشیاکلای به روده‌ی حیوانات آسیب رسانده و تولید لیپوپلی‌ساکارید می‌کند (مونیاکا و همکاران ۲۰۱۲). تانن‌ها به‌عنوان سم برای میکرواورگانیسم‌ها در نظر گرفته می‌شوند، این ترکیبات در محیط محلول سبب ایجاد کمپلکس‌های پایدار، به‌طور عمده با پروتئین و به میزان کم‌تر با کربوهیدرات‌ها و یا یون‌های فلزی فیزیولوژیک مانند آهن و مس، می‌شوند (چانگ و چو ۱۹۹۸). نشان داده شده است که عصاره پوست انار در سطوح مختلف دارای اثر ضدمیکروبی در برابر میکرواورگانیسم‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *پروتئازوالگاریسوس کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا البیکانس* است (احمد و همکاران ۲۰۱۳). پژوهش سیرام و همکاران (۲۰۰٦) نشان داد که میوه انار منبع سرشاری از ترکیب‌های فنولی است. آن‌ها این مواد را مسئول ویژگی ضدمیکروبی انار دانستند. در پژوهش کنونی کاهش جمعیت میکروبی اشریشیاکلی با مصرف تفاله دانه و سیلاژ تفاله پوسته را می‌توان به اثر مواد فنولی موجود در دانه و پوست نسبت داد. ترکیبات فنولی در پوست انار از طریق چندین مکانیسم، ویژگی ضدمیکروبی ایجاد می‌کنند. مواد فنولی به‌همراه پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد، کمپلکس‌های پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند و بدین ترتیب پس از جذب می‌توانند با آنزیم‌های سلولی (اکسیدوردوکتاز) موجود در سیتوپلاسم و دیواره سلولی واکنش دهند (سیرام و همکاران ۲۰۰٦). از سوی دیگر این مواد می‌توانند از دسترسی پذیرنده‌های سطح سلولی در برابر میکرواورگانیسم‌های مضر جلوگیری کنند (کوان ۱۹۹۹). ترکیبات فنولی می‌توانند با پروتئین‌های سلولی میکروارگانیسم‌ها واکنش داده، در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد کنند (هاگو و بلوم‌فیلد ۱۹۷۱) و موجب کاهش نفوذپذیری دیواره سلولی و کاهش انتقال سوبسترا به سلول شوند (گوئل و همکاران ۲۰۰۵). افزون بر این، این ترکیبات می‌توانند باعث تغییر و یا دناتوراسیون برخی آنزیم‌های میکروبی شوند (استبرقی و همکاران ۱۳۹۷)، هم‌چنین ترکیبات فنولی با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و یون‌های فلزی تشکیل کمپلکس داده و آن‌ها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کنند (هاگو و بلوم‌فیلد ۱۹۷۱). کاهش یون‌های فلزی اثر منفی بر فعالیت آنزیم در سلول‌های میکروبی دارد (گوئل و همکاران ۲۰۰۵). ویژگی ضدباکتریایی اسانس گیاهان را به ویژگی چربی دوستی و ساختمان شیمیایی این ترکیبات نیز نسبت داده‌اند (کاترینا و همکاران ۱۹۹۷)؛ که با وارد کردن آسیب به دیواره لیپوپروتئینی سلول باکتری، منجر به نشت و تغییر تبادل یون‌ها از غشا می‌شود (سیمیت‌زیس ۲۰۱۷). هم‌چنین می‌توان ویژگی ضدباکتریایی قوی ترکیبات فنولی را به گروه هیدروکسیل فعال موجود در ساختار شیمیایی آن‌ها نیز نسبت داد (تونگنونچان و بنجاکول ۲۰۱٤). افزون بر این، یکی دیگر از دلایل کاهش باکتری‌های اشریشیاکلای را می‌توان به افزایش تعداد لاکتوباسیلوس‌ها نسبت داد چرا که با افزایش لاکتوباسیلوس‌ها و پیامد آن افزایش تولید اسیدلاکتیک و ایجاد محیط اسیدی، جمعیت باکتری اشریشیاکلای که به محیط اسیدی حساس است کاهش می‌یابد (هامر و همکاران ۱۹۹۹). در این پژوهش شمار لاکتوباسیلوس‌ها با مصرف تفاله انار افزایش نیافت، بنابراین به نظر می‌رسد کاهش جمعیت اشریشیاکلای، بیشتر در اثر تانن‌ها و ترکیبات فنولی موجود در انار باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Table 4- Effect of Pomegranate Pomace Silage and Pomegranate Dry Pulp on Intestinal Microflora (Log CFU/g)

Parameter	Control	Pomegranate dried pulp	Pomegranate Pulp Silage	P-value	SEM
Lactobacillus in ileum	8.89	8.58	9.09	0.31	0.23
Lactobacillus in cecum	8.77	8.70	8.97	0.13	0.21
E. coli in the ileum	9.16[a]	8.69 [b]	8.60 [b]	0.03	0.16
E. coli in the cecum	8.69 [a]	8.52 [b]	8.50 [b]	0.04	0.17

Means within same row with different letters differ significantly (P<0.05).

منابع موردد استفاده

Abid M, Yaich H, Cheikhrouhou S, Khemakhem I, Bouaziz M, Attia H and Ayadi MA, 2017. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. Journal of Food Science and Technology 54:2890-2901.

Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D and Chen S, 2010. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells *in vitro*. Cancer Prevention Research 3:108-113.

Ahmed SA, Abood NH and Al-Janabi AA, 2013. Antimicrobial effect of pomegranate peel extract on some pathogenic microorganisms. Engineering and Technology Journal 31:316-324.

Ahmet D, Duman A, Ozgen M, Dayisoylu K, Erbil N and Durgac C, 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules 14:1808-1817.

Carlton PS, Kresty LA and Stoner GD, 2000. Failure of dietary lyophilized strawberries to inhibit 4-(methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone-and benzo [a] pyrene-induced lung tumorigenesis in strain A/J mice. Cancer Letters 159:113-7.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D, 1997. The capsaicin receptor: A heat activated ion channel in the pain pathway. Nature 389:816-824.

Choct M, Hughes RJ, Wang J, Bedford MR, Morgan AJ and Annison G, 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. British Poultry Science 37:609-621.

Chung KT, Lu Z and Chou MW, 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food Chemical Toxicology 36:1053-1060.

Cowan MM, 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12:564-572.

Delavar MH, Tahmasbi MA, Danesh-Mesgaran M and Valizadeh R, 2014. *In vitro* rumen fermentation and gas production: Influence of different byproduct feedstuffs. Annual Research and Review in Biology 4:1121-1128.

Ebrahimi B, Taghizadeh A and Mehmannavaz Y, 2013. Ruminal degradation of pomegranate pomace using nylon bags technique. European Journal of Experimental Biology 3:260-262.

Estabraghi E, Sadeghpour M and Mehrabani A, 1397. Study of Pomegranate Hydromethanol Extract on Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli by Microplate in Laboratory Conditions. Tehran Paramedical Journal 12: 183-192.

Goel G, Puniya AK, Aguilar CN and Singh K, 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften 92:497-503.

Hammer KA, Carson CF and Riley TV, 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86:985-990.

Hugo WB and Bloomfield SF, 1971. Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. 3. The effect of fentichlor on the metabolic activities of Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. Journal of Applied Bacteriology 34:579-591.

Katiyar SK, 2002. Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. International Journal of Oncology 21:1213-1222.

www.SID.ir

Archive of SID

Klaver FAM and Van der Meer R, 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugating activity. Applied Environmental Microbiology 59:1120-1124.

Lei XJ, Yun HM and Kim IH, 2018. Effects of dietary supplementation of natural and fermented herbs on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters, meat quality and fatty acid composition in growing-finishing pigs. Italian Journal of Animal Science 17:984-993.

Lilly DM and Stillwell RH, 1965. Probiotic: growth promoting factors produced by microorganism. Science 12:747-478

Munyaka PM, Tactacan G, Jing MKO, House JD and Rodriguez-Lecompte JC, 2012. Immunomodulation in young laying hens by dietary folic acid and acute immune responses after challenge with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Journal of Poultry Science 91:2454–2463.

National Research Council. NRC, 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academy of Science, Washington DC. PP. 10036-10070.

Nayebpor M, Farhomand P and Hashemi A, 2007. Effect of different levels of direct fed microbial (Primalac) on the growth performance and humoral immune response in broiler chickens. Journal of Animal Advances 6:1308-1313.

Riffon R, Sayasith K, Khalil H and Dubreuil P, 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology 39:2584-2589.

Seeram NP, Schulman RN and Heber D, 2006. Pomegranates: Ancient roots to modern medicine. Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles. Chemical Rubber Company Press Taylor and Francis Group.

Simitzis PE, 2017. Enrichment of animal diets with essential oils—A great perspective on improving animal performance and quality characteristics of the derived products. Medicines 35:1-21.

Tongnuanchan P and Benjakul S, 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. Journal of Food Science 7:1231-1249.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of pomegranate pomace feed supplement (silage and dehydrated) on the intestinal microflora of Mehraban male lambs

F Broomand,[1] SM Ghoreishi*[2], S Hosseinzadeh[3] and Sh Kargar[4]

Received: October 24, 2019 Accepted: October 18, 2020

[1]MSc Graduated Student, Department of Animal Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
[3]Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, School of veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[4]Associate Professor, Department of Animal Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
*Corresponding Author: E mail: smghoreishi@shirazu.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.31 No.3/ 2021/pp 1-9
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/AS.2022.36369.1524

Introduction: The antibacterial and antifungal effects of pomegranates peel and seeds are associated with the presence of phenolic compounds (flavonoids and tannin). These compounds accumulate in the skin and pomegranate juice and account for 92% of the antioxidant activity of pomegranates (Abid et al. 2017). Total tannins for pomegranate peel and pulp were reported to be 9.73 and 0.66%, respectively (Delavare et al. 2014). The different species of pomegranate have antibacterial and antifungal properties that can influence on a wide range of microorganisms (Carlton et al. 2000). Phenolic compounds in plants and foods by changing the gut microbial population can increase the amount of useful bacteria and reduce harmful bacteria (Katiyar 2002). It has been found that intestinal microflora plays a critical role in the health of the digestive tract and is dependent on the ration as the final source for metabolism of organic compounds. (Choct et al. 1996). To our knowledge, the effects of pomegranate by-products have been investigated on livestock and rumen function, however their effects on the intestinal microflora in ruminants have not been addressed. Therefore, due to the high concentration of tannins and phenolic compounds in the pomegranate by-products and their effect on intestinal microflora, the aim of this study was to investigate the effects of pomegranate pomace silage and pomegranate air-dried pomace on intestinal microflora in Mehraban fattening lambs.

Materials and methods: Nine male lamb of Mehraban breed (mean weight of 27.03±3.5 kg and mean age of 187.8±1.4 d), were fed on three iso-nitrogenous and iso-caloric diets. Diets were balanced according to NRC (2007) recommendation including control diet, diet contain 27% pomegranate pulp silage (mixture of seed and pulp at equal ratio) and diet contain 31% air-dried pomegranate seed pulp. All three diets were fed for 60 d after 3 weeks for adaptation in individual pens with free access to salts lick and water. At the end of experiment all lambs were slaughtered and after than for enumeration of intestinal fluoromicrobes, one gram freshly digested specimens of ileum and cecum were collected. Samples were spread on the surface of agar medium. Colonies were counted by ophthalmic count and bacterial count was calculated as CFU/g (number of colonies per gram). The MRS agar and MacConkey (MC) medium were used for identification and enumeration of *Lactobacillus* spp and *Escherichia coli* respectively. All samples were incubated at 37ºC for 24 hours. All colonies were enumerated and recorded as CFU/g of culture suspension. For confirmation of *Escherichia coli* detection on MacConkey agar medium, polymerase change reaction (PCR) was conducted as DNA extraction using commercial kit (Bioneer, Sout Korea), polymerase change reactions, and electrophoresis of PCR products. Detection of molecular bacteria was done using the primers of 23S rRNA gene PCR. The PCR

www.SID.ir

Archive of SID

process was initial denaturation at 94 ºC for 2 minutes and totally 35 cycles, denaturation at 94 ºC for 45 seconds, and extension at 72 ºC for 2 minutes. All data was analyzed as a complete randomized design using SPSS software. Significant difference for means was considered at 0.05 level of differences.

Results and discussion: The results of this study showed that in MRS medium either in ilium or cecum, the number of lactobacillus bacteria in all groups were not statistically significant. The mean number of *Escherichia coli* decreased due to feeding of pomegranate by-products ($P<0.05$), while the type of pomegranate by-product has not significant effect on number of *Escherichia* coli. The importance role of gut microflora is well recognized in GIT health, although population of gut microbes has been influenced by diet (Choct et al 1996). In contrast of useful effects of lactobacillus on GIT, *Escherichia coli* damages the intestine of animals and produces lipopolysaccharide (Munyaka et al. 2012). Tannins are considered as a toxin to microorganisms; these compounds in the soluble environment produce some stable complexes, mainly with protein and to a lesser extent with carbohydrates or some physiological ions elements such as iron and copper (Chung and Chou 1998). The pomegranate peel extract at different levels has antimicrobial effect against microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* (Ahmed et al. 2013). The phenolic materials in pomegranate fruit, are responsible for the antimicrobial properties of pomegranates (Seeram et al. 2006). In the present study, reduction of *Escherichia coli* population in lambs fed pomegranate by-products can be attributed to the adverse effect of phenolic substances in the pomegranate by-products on *Escherichia coli* population. Several mechanisms have been introduced for antimicrobial properties of phenolic compounds in the pomegranate. Phenolic substances, with high molecular weight proteins, form complexes and by these complexes can react to the some cytoplasmic and membrane enzymes after absorption (Seeram et al. 2006). These complexes can also prevent cell surface receptors from attachment of harmful microorganisms (Cowan 1999). Phenolic compounds can react with the cellular proteins of microorganisms, alter cell wall structure and function (Hugo and Bloomfield 1971), reducing cell wall permeability and reducing substrate transport to cells (Goel et al. 2005). In addition, phenolic compounds can alter or denature some microbial enzymes, and also form complexes with certain nutrients and remove them from microorganisms (Hugo and Bloomfield 1971). The decline of *Escherichia coli* can also be attributed to the increase in the number of Lactobacillus; because by increasing the Lactobacillus and consequently increasing the production of lactic acid and creating an acidic environment, the population of *Escherichia coli* is reduced due to sensitivity of *Escherichia coli* to acidic environment (Hammer et al. 1999).

Conclusion: Feeding of the pomegranate pomace silage and air-dried pomegranate pomace in fattening lambs, decreased the population of *Escherichia coli* in ileum and cecum, although lactobacillus bacteria was not affected by pomegranate by-products. It seems that the tannins and phenolic compounds present in the pomegranate can effect on *Escherichia coli* population in ileum and cecum.

Keywords: Cecum, *Escherichia coli*, Ileum, *Lactobacillus* spp, Mehraban lamb, Pomegranate pulp

www.SID.ir