Archi

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد هفتم، شماره چهارم، ۱۳۹۸
http://ejrr.gau.ac.ir
۱۱۱-۱۲۹

بررسی تاثیر باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده اسید لاکتیک و *ساکارومایسیس سرویسیه* بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر شکمبه‌ای و قابلیت هضم موادمغذی در جیره با کنسانتره بالا به روش برون‌تنی در گوسفند عربی

احسان دیرکوندی[۱]، *طاهره محمدآبادی[۲]، عبدالفتاح زیدان محمد سالم[۳]

[۱]دانشجوی دکتری و [۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، [۳]استاد گروه تغذیه دام، دانشکده دامپزشکی و علوم دامی، دانشگاه ملی مکزیک

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱٤

چکیده

سابقه و هدف: اسیدوز یکی از اختلالات تغذیه‌ای در نشخوارکنندگان می‌باشد که به دلیل مصرف مقادیر زیاد کربوهیدرات‌های با قابلیت تخمیر بالا و ظرفیت بافری پایین شکمبه در نتیجه مصرف کم فیبر ایجاد می‌شود. از این رو راهکارهایی از جمله استفاده از افزودنی‌های میکروبی به منظور جلوگیری از بروز اسیدوز پیشنهاد شده است. این تحقیق به منظور بررسی تاثیر استفاده از سه افزودنی خوراکی میکروبی (باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده اسید لاکتیک و مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه*) در جیره با کنسانتره بالا بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی در گوسفند و با فرض تاثیر مثبت استفاده هم زمان افزودنی‌ها در مقایسه با کاربرد آن‌ها به تنهایی و تیمار کنترل انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی تاثیر افزودنی‌های میکروبی بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر شکمبه‌ای و قابلیت هضم مواد مغذی به روش برون‌تنی ۸ تیمار آزمایشی شامل ۱) کنترل (جیره پایه (نسبت کنسانتره به علوفه ۷۰ به ۳۰) بدون افزودنی میکروبی)؛ ۲) جیره پایه + *مگاسفرا السدنی* (Me)؛ ۳) جیره پایه + *ساکارومایسیس سرویسیه*(SC)؛ ٤) جیره پایه + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (FP)؛ ٥) جیره پایه + *مگاسفرا السدنی*+*ساکارومایسیس سرویسیه* (MSC)؛ ٦) جیره پایه + *مگاسفرا السدنی*+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (MFP)؛ ۷) جیره پایه + *ساکارومایسیس سرویسیه*+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (SCFP) و ۸) جیره پایه + *مگاسفرا السدنی*+*ساکارومایسیس سرویسیه*+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (MSCFP) در قالب آزمایش فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی اثر بخشی تیمارهای آزمایشی از تکنیک تولید گاز و هضم دو مرحله‌ای در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. مایع شکمبه مورد نیاز از ۳ راس گوسفند نر عربی تغذیه شده با جیره بر پایه علوفه گرفته شد.

یافته‌ها: تحت تاثیر استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی میزان گاز تولیدی در همه زمان‌ها به طور معنی‌داری برای تیمار MSCFP افزایش یافت (P<۰/۰۵). همچنین کم‌ترین میزان متان تولیدی در تیمار MSC مشاهده شد (P<۰/۰۵). استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی سبب بهبود فراسنجه‌های تولید گاز شد (قابلیت هضم ماده‌آلی و انرژی قابل متابولیسم)

*نویسنده مسئول: mohammadabadi@asnrukh.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

(P<۰/۰۵). همچنین بیش‌ترین میزان پروتئین میکروبی در تیمار MSC مشاهده شد. قابلیت هضم پروتئین خام و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی به طور معنی‌داری در تیمارهای FP و MSCFP افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی در تیمار SCFP مشاهده شد (P<۰/۰۵). غلظت کل اسیدهای چرب فرار به طور معنی‌داری برای تیمار MSCFP افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین درصد اسید چرب استات در تیمار کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۵) و در مقابل استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی سبب افزایش درصد پروپیونات و بوتیرات به ترتیب در تیمارهای MSC و FP شد (P<۰/۰۵). همچنین استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی سبب کاهش نسبت استات به پروپیونات و همچنین کاهش نسبت استات+بوتیرات به پروپیونات شد (P<۰/۰۵). بیش‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای MSCFP و SCFP مشاهده شد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مثبت تیمارهای آزمایشی بر تولید گاز، کاهش تولید متان و همچنین قابلیت هضم مواد مغذی، شاید بتوان استفاده از این افزودنی‌های میکروبی را در جیره با کنسانتره بالا در بره پرواری توصیه کرد. از این رو این تیمارها FP، SCFP و MSCFP کاندیدای خوبی برای استفاده هستند.

واژه‌های کلیدی: افزودنی میکروبی، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم.

مقدمه

امروزه در سیستم‌های تولیدی به منظور دستیابی به حداکثر تولید، نشخوارکنندگان با جیره‌های بر پایه کنسانتره تغذیه می‌شوند (٤٢). افزایش مصرف کربوهیدرات‌های با قابلیت تخمیر بالا منجر به افزایش تولید اسیدهای چرب فرار و در نتیجه کاهش pH شکمبه‌ای می‌شود (۲۵). بنابراین در دام‌هایی که به جیره با کنسانتره بالا عادت ندارند سطح اسید لاکتیک به میزان غیر قابل قبول افزایش می‌یابد. زیرا باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک (*مگاسفرا السدنی* و *سلنوموناس رومینانتیوم*) نمی‌توانند به سرعت جمعیت خود را با میزان اسید تولیدی افزایش دهند. از این رو جمعیت باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک (از قبیل *استرپتوکوکوس بوویس* و سویه‌های لاکتوباسیل) که به طور طبیعی در فلور میکروبی شکمبه وجود دارند در حین مصرف جیره‌های با کنسانتره بالا افزایش می‌یابد (۳۱). بنابراین *استرپتوکوکوس بوویس* و دیگر سویه‌های لاکتوباسیل به تولید اسید لاکتیک ادامه داده و سبب اختلال در محیط طبیعی شکمبه و سلامت دام می‌شوند. از این رو کالسامیگلیا و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که برای جلوگیری از سندرم جیره با کنسانتره بالا می‌توان از سه استراتژی استفاده کرد (۹): ۱) تعادل مناسب بین بخش‌های مختلف جیره (ایجاد تعادل در مقدار و نوع فیبر محلول و نامحلول و همچنین اندازه ذرات خوراک) و مدیریت تغذیه ، ۲) کنترل pH شکمبه (برای مثال استفاده از ترکیبات خنثی کننده pH از قبیل اکسید منیزیم و بی‌کربنات سدیم) و ۳) کنترل فرآیند تخمیر شکمبه‌ای (برای مثال کنترل جمعیت باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده اسید لاکتیک).

در مورد کنترل شرایط تخمیر شکمبه‌ای راهکارهای مختلفی از جمله استفاده از آنزیم‌های با منشا خارجی (۲۷)، روغن‌های ضروری (۲۲)، عصاره‌های گیاهی (۱۲) و افزودنی‌های خوراکی میکروبی (۱۳) مورد توجه قرار گرفته‌اند. افزودنی‌های خوراکی میکروبی (افزودنی‌های باکتریایی و قارچی) ارگانیسم‌های زنده و یا قابل زنده ماندن هستند که به طور معمول به عنوان مکمل تغذیه‌ای برای حفظ سلامت دستگاه گوارش حیوان میزبان از طریق بهبود

www.SID.ir

Archive of SID

فلور میکروبی دستگاه گوارش مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹). *مگاسفرا السدنی* و *سلنوموناس رومیناتیوم* باکتری‌های غالب مصرف کننده اسید لاکتیک در شکمبه هستند (۲۱). گزارش شده است که در شرایط طبیعی *مگاسفرا السدنی* ٦٥ تا ۹۵ درصد از اسید لاکتیک تولید شده در شکمبه را مصرف کرده و از کاهش شدید pH جلوگیری می‌کند (۲۹). لذا با استفاده از افزودنی‌های میکروبی خوراکی می‌توان با تحریک رشد باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک و افزایش مصرف اسید لاکتیک از کاهش شدید pH شکمبه و تجمع اسیدهای چرب فرار جلوگیری کرد. مهم‌ترین فرضیه در مورد باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک این است که با تولید اسید لاکتیک سبب سازگار شدن باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک به حضور اسید لاکتیک و در نتیجه تحریک رشد این باکتری‌ها می‌شوند (٤٧). همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که استفاده از افزودنی‌های قارچی از قبیل *ساکارومایسس سرویسیه* از طریق ایجاد تعادل در pH شکمبه منجر به افزایش غلظت باکتری‌های شکمبه‌ای بخصوص فیبرو باکترها می‌شود (۵). با توجه به این که تاکنون تحقیقات انجام شده در گوسفند عمدتا در زمینه استفاده از افزودنی‌های خوراکی قارچی و یا باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک بوده است، این تحقیق به منظور بررسی تاثیر استفاده از سه افزودنی خوراکی میکروبی (باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده اسید لاکتیک و مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*) در جیره با کنسانتره بالا بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی در گوسفند و با فرض تاثیر مثبت استفاده هم زمان افزودنی‌ها در مقایسه با استفاده آن‌ها به تنهایی و تیمار کنترل انجام گرفت.

مواد روش‌ها

این تحقیق در آذر ماه سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه تغذیه تکمیلی دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد.

تیمار و جیره‌های آزمایشی: در این آزمایش، از باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک (مخلوط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (سویه تجاری) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (سویه GP10 جداسازی شده از شکمبه بز نجدی)) و مصرف کننده اسید لاکتیک (*مگاسفرا السدنی* (سویه GU1 جداسازی شده از شکمبه بز نجدی) و مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* (شرکت ایران ملاس-مشهد) به عنوان افزودنی خوراکی میکروبی استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) CON (کنترل): جیره پایه بدون افزودنی میکروبی؛ ۲) Me (جیره پایه+*مگاسفر السدنی*)؛ ۳) SC (جیره پایه+*ساکارومایسیس سرویسیه*)؛ ٤) FP (جیره پایه+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)؛ ۵) MSC (جیره پایه+*مگاسفرا السدنی*+*ساکارومایسیس سرویسیه*)؛ ٦) MFP (جیره پایه + *مگاسفرا السدنی*+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)؛ ۷) SCFP (جیره پایه + *ساکارومایسیس سرویسیه* + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) و ۸) MSCFP (جیره پایه+*مگاسفرا السدنی*+*ساکارومایسیس سرویسیه*+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) بودند. هر دو افزودنی باکتریایی در غلظت نیم مکفارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند. هر گرم از مخمر مورد استفاده در این تحقیق حاوی ۷×۱۰^{۹} واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم بود و در تیمارهای حاوی *ساکارومایسیس سرویسیه* ۰/۰۰۲ گرم ($۱/٤\times۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده کلنی) استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شد. در این آزمایش از جیره بر پایه ۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد علوفه استفاده شد که مطابق با احتیاجات غذایی نشخوارکنندگان کوچک تنظیم شده بود (٤١). اقلام و ترکیب شیمیایی جیره مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

آزمون تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی در شرایط برون‌تنی: شیرابه شکمبه از سه گوسفند نر بالغ عربی قبل از خوراکی‌دهی صبح با استفاده از لوله مری تهیه گردید که به مدت ۲ ماه با جیره بر پایه ٤٠ درصد کنسانتره و ٦٠ درصد علوفه (پروتئین خام ۱۰۵ گرم در کیلوگرم و انرژی قابل متابولیسم ۲/۳ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) تغذیه شده بودند. شیرابه شکمبه تهیه شده بلافاصله درون فلاسک آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از انتقال شیرابه شکمبه به آزمایشگاه با استفاده از ٤ لایه پارچه متقال صاف و pH آن توسط pHمتر (Metrohm model, Swiss) اندازه‌گیری شد. سپس مواد جامد باقی‌مانده بعد از فیلتر با استفاده از محلول بافری مک‌دوگال به منظور جداسازی باکتری‌های متصل به بخش جامد شست و شو شدند (٥١). در نهایت شیرابه شکمبه فیلتر شده به علاوه محلول حاوی بافر و شیرابه شکمبه در شرایط بی‌هوازی درون بطری‌های پلاستیکی و در حمام بن ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به منظور انجام ادامه مراحل آزمایش نگه‌داری شدند. به منظور بررسی تاثیر تیمارهای آزمایشی ۲۰۰ میلی‌گرم از سوبسترای آزمایشی (جدول ۱) توزین و به درون ویال‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد (٦ تکرار برای هر تیمار). سپس ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط شیرابه شکمبه به علاوه محلول بافری حاوی شیرابه شکمبه و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول بزاق مصنوعی (آب مقطر، محلول بافری، محلول ماکرومینرال، محلول رزازورین (٣٦)) به هر ویال اضافه شد. سپس به منظور اطمینان از بی‌هوازی بودن محیط پس از گاز دادن ویال‌ها با دی‌اکسید کربن درب ویال‌ها با استفاده از درب لاستیکی و پوشش آلومینیومی مهر و موم گردید. سپس در مرحله آخر مطابق با تیماربندی انجام شده، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی دوز مورد نظر از افزودنی‌های میکروبی به درون ویال‌های مربوطه تزریق شدند. میزان گاز تولیدی در ساعات ۲، ٤، ٦، ٨، ۱۲، ٢٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون از هر تیمار ۳ تکرار به منظور تعیین تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای خارج گردید. سپس محتوای هر ویال با استفاده از کیسه داکرونی فیلتر و پس از خشک کردن در آون در دمای ٥٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت به عنوان بقایای تخمیر نشده برای تعیین سوبسترا هضم شده در نظر گرفته شد. همچنین ماده آلی هضم شده[1] (گرم به کیلوگرم ماده خشک) نیز از اختلاف بین ماده آلی قبل و بعد از انکوباسیون تعیین گردید (٥٩). جهت تعیین تاثیر تیمارهای آزمایشی بر قابلیت هضم مواد مغذی مشابه با مرحله قبل شیرابه شکمبه تهیه گردید و پس از صاف کردن شیرابه شکمبه با ٤ لایه پارچه متقال با بزاق مصنوعی مک‌دوگال با نسبت ٤ به ۱ مخلوط شد (یک قسمت شیرابه شکمبه و چهار قسمت بزاق مصنوعی) (pH محلول بزاق مصنوعی بین ٦/٧ تا ٦/٩ بود). محلول بزاق مصنوعی حاوی (گرم در لیتر) بی‌کربنات سدیم ۹/۸، دی‌سدیم هیدروژن فسفات ۲/٤٤، کلرید پتاسیم ۰/٥٧، کلرید سدیم ۰/٤٧، سولفات منیزیم ۰/۱۲ و کلرید کلسیم ۰/۱٦ بود. سپس ٥٠ سی‌سی از این محلول درون هر لوله حاوی ٥٠٠ میلی‌گرم جیره آزمایشی (جدول ۱) ریخته شد (٤ تکرار برای هر تیمار). پس از تزریق افزودنی میکروبی مربوط به هر تیمار و ایجاد شرایط بی‌هوازی با گاز دادن درب هر لوله بسته و در حمام بن‌ماری در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. پس از

1. Organic Matter Disappearance (OMD)

www.SID.ir

Archive of SID

گذشت ٤٨ ساعت از شروع آزمایش، درپوش‌ها از لوله‌ها برداشته شد و به هر کدام از لوله‌ها ٦ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ٢٠ درصد افزوده شد. این کار علاوه بر از بین بردن میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای، pH آن را نیز کاهش می‌دهد تا محیط برای فعالیت آنزیم پپسین آماده شود. پس از آن ٠/٥ گرم آنزیم پپسین را در ١٠٠ سی‌سی اسید کلریدریک ٠/١ نرمال حل نموده و به هر لوله ٥ سی‌سی از این محلول آنزیمی اضافه شد. در این مرحله لوله‌ها به مدت ٤٨ ساعت دیگر در حمام آب گرم ٣٩ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی براساس میزان آن‌ها قبل و بعد از انکوباسیون محاسبه گردید (٥٠).

جدول ١: اقلام، ترکیب شیمیایی و انرژی قابل متابولیسم جیره مورد استفاده در آزمایش برون‌تنی

Table 1. Ingredients, chemical composition and metabolizable energy of diet used in *in vitro* experiment

Ingredients (g/kg DM) اقلام (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	
201	Alfalfa یونجه
99	Wheat straw کاه گندم
300	Barley grain دانه جو
210	Corn grain دانه ذرت
123.5	Soybeans meal کنجاله سویا
55	Wheat bran سبوس گندم
2.5	NaCl نمک
4	Calcium carbonate سنگ آهک
5	Vitamin and mineral supplements[1] مکمل ویتامینی و معدنی
Chemical composition (g/kg DM) ترکیب شیمیایی (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	
903	Dry Matter ماده خشک
948	Organic Matter ماده آلی
51.7	Ash خاکستر
161	Crude Protein پروتئین خام
27	Ether Extract عصاره اتری
290	Neutral Detergent Fiber الیاف نامحلول در شوینده خنثی
165	Acid Detergent Fiber الیاف نامحلول در شوینده اسیدی
2.65	Metabolizable Energy (Mcal/kg DM) انرژی قابل متابولیسم[2] (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک)
472	Non–Fiber Carbohydrates[3] کربوهیدرات‌های غیر فیبری

[1] مکمل ویتامین و مواد معدنی حاوی (در هرکیلوگرم): ٥٠٠٠٠٠ واحد بین المللی در میلی‌گرم ویتامین A، ١٠٠٠٠٠ واحد بین المللی در میلی‌گرم ویتامین D3، ١٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E، ١٨٠ گرم در کیلوگرم کلسیم، ٦٠٠٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر، ٦٠٠٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم سدیم، ١٩٠٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم منیزیم، ٣٠٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم روی، ٣٠٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن، ١٩٠٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم منگنز، ٣٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ١٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم کبالت، ١ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم، ١٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم ید و ٤٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌اکسیدان.

[2] انرژی قابل متابولیسم محاسبه شده برای هر یک از اجزای جیره.

[3] کربوهیدرات‌های غیر فیبری = ١٠٠٠- (الیاف نامحلول در شوینده خنثی (گرم در کیلوگرم) + پروتئین خام (گرم در کیلوگرم) + عصاره اتری (گرم در کیلوگرم) + خاکستر (گرم در کیلوگرم)).

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه شیمیایی

قبل از انجام تجزیه شیمیایی، نمونه جیره و همچنین بقایای باقیمانده پس از ۹٦ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. سپس با روش انجمن رسمی شیمی‌دانان کشاورزی (۲۰۰۵)، محتوای پروتئین خام (شماره ۹۷۸/۰٤)، عصاره اتری (شماره ۹۳۰/۰۹)، خاکستر (شماره ۹۳۳/۰۵) و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (شماره ۹۷۳/۱۸) اندازه‌گیری گردید (۲). همچنین میزان الیاف نامحلول در شوینده خنثی مطابق با روش ون‌سوست و همکاران (۱۹۹۱) محاسبه گردید (۵۲). غلظت نیتروژن آمونیاکی مطابق با روش برودریک و کانگ (۱۹۸۱) تعیین گردید (۷). غلظت اسیدهای چرب فرار با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Chrompack, Model CP-9002, Chrompack, EA Middelburg, Netherlands) با نوع ستون سیلیکای موئینه (length 50 meters, inside diameter 0.32 mm, CP- Wax Chrompack Capillary Column, Varian, Palo Alto, CA, USA) تعیین شد. دمای تزریق کننده و تشخیص دهنده دستگاه ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. گاز ناقل در این دستگاه هلیوم و تشخیص دهنده آن از نوع Flame Ionized Detector بود. دمای ستون دستگاه در آغاز ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود که به مدت دو دقیقه در این دما نگه داشته شد و سپس در طول پنج دقیقه به ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و برای یک دقیقه در این دما باقی ماند. در این آزمایش ۲-اتیل بوتیریک اسید به عنوان استاندارد درونی استفاده شد. غلظت هر یک از اسیدهای چرب فرار از تقسیم سطح زیر نقطه اوج (پیک) آن اسید چرب بر سطح زیر نقطه اوج مجموع اسیدهای چرب محاسبه و به شکل درصدی از مجموع اسیدهای چرب فرار بیان شد.

محاسبات: به‌منظور تخمین فراسنجه‌های کینتیک تولید گاز، داده‌های تولید گاز[3] با استفاده (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) از رویه NLIN نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ (۲۰۰۸) و مطابق با مدل فرانس و همکاران (۲۰۰۰) (رابطه ۱) برازش شدند (۱۸، ٤۹).

$$A = b \times (1 - e^{-c\,(t-L)}) \quad (1)$$

در معادله مذکور A حجم گاز تولیدی در زمان t (میلی‌لیتر)، b گاز تولید شده از بخش ماده آلی به آرامی قابل تخمیر (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، c ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t مدت زمان انکوباسیون (ساعت) و L فاز تاخیر (ساعت) بود. انرژی قابل متابولیسم[4] (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (۳۵).

$$ME = ۲/۲ + ۰/۱۳۵۷\ GP_{24} + ۰/۰۰۵۷\ CP + ۰/۰۰۰۰۲۸۵۹\ CP^2 \quad (2)$$

که در رابطه مذکور GP_{24} حجم گاز تولیدی تصحیح شده در مدت ۲٤ ساعت (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) و پروتئین خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک) می‌باشد. سنتز پروتئین میکروبی[5] (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) مطابق با روش بلومل و همکاران (۱۹۹۷) محاسبه شد (٦) (رابطه ۳).

$$MCP = TDS - (GP_{24} \times 2.2) \quad (3)$$

که در این رابطه TDS سوبسترای حقیقی هضم شده[6] (میلی‌گرم به گرم ماده خشک) (اختلاف وزن سوبسترای انکوبه شده قبل و بعد از انکوباسیون)، GP_{24} حجم گاز تولیدی تصحیح شده در مدت ۲٤ ساعت (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) و ۲/۲ فاکتور استوکیومتریک (میلی‌گرم به میلی‌لیتر) می‌باشد.

1. Gas Production (GP)
1. Metabolizable Energy (ME)
2. Microbial Crude Protein (MCP)
3. Truly degraded substrate (TDS)

www.SID.ir

Archive of SID

برآورد بازده گاز[۷] با استفاده از روش منک و همکاران (۱۹۷۹) محاسبه شد (رابطه ٤).

$$GY_{24} = mL\ GP\ /g\ TDS \quad (٤)$$

که در این رابطه GP میلی‌لیتر میزان گاز تولیدی به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک و TDS گرم سوبسترای حقیقی هضم شده می‌باشد. میزان متان تولید شده نیز مطابق با روش موس و همکاران (۲۰۰۰) و از رابطه ٦ برآورد گردید (۳۷).

متان = ۰/٤٥ (استات) – ۰/۲۷۵ (پروپیونات) + ۰/٤ (بوتیرات) (٦)

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده در قالب آزمایش فاکتوریل ۲[۳] بر پایه طرح کامل تصادفی با ٤ تکرار انجام پذیرفت. تجزیه اطلاعات به‌دست آمده مطابق روش تجزیه واریانس (ANOVA) و با استفاده از رویه GLM برنامه آماری SAS (نسخه ۹/۲) انجام شد (٤۹). مدل آماری این طرح به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ijkl}=\mu+\alpha_i+\beta_j+\gamma_k+\alpha\beta_{ij}+\alpha\gamma_{ik}+\beta\gamma_{jk}+\alpha\beta\gamma_{ijk}+e_{ijkl}$$

که در معادله مذکور Y_{ijkl} مقدار صفت مشاهده شده، μ میانگین کل، α_i اثر فاکتور اول (اثر *مگاسفرا السدنی* در دو سطح)، β_j اثر فاکتور دوم (اثر *ساکارومایسیس سرویسیه* در دو سطح)، γ_k اثر فاکتور سوم (اثر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دو سطح)، $\alpha\beta_{ij}$ اثر متقابل *مگاسفرا السدنی* با *ساکارومایسیس سرویسیه*، $\alpha\gamma_{ik}$ اثر متقابل *مگاسفرا السدنی* با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، $\beta\gamma_{jk}$ اثر متقابل *ساکارومایسیس سرویسیه* با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، $\alpha\beta\gamma_{ijk}$ اثر متقابل *مگاسفرا السدنی*، *ساکارومایسیس سرویسیه* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و e_{ijkl} اثر خطای آزمایش بود. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تولید گاز و فراسنجه‌های تولید گاز در جدول ۲ و شکل ۱ ارائه شده است. میزان گاز تولیدی در همه زمان‌ها به طور معنی‌داری برای تیمار MSCFP افزایش یافت ($P<۰/۰۵$) (شکل ۱). پتانسیل تولید گاز به طور معنی‌داری در تیمارهای MSCFP و FP نسبت به کنترل افزایش پیدا کرد ($P<۰/۰۵$). با این حال بین کنترل و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). همچنین نرخ تولید گاز نیز به طور معنی‌داری در تیمارهای MSCFP، SCFP و FP افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). فاز تاخیر تنها بین تیمار SCFP و MFP اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین کم‌ترین میزان متان تولیدی در تیمار MSC مشاهده شد (۲۲/۳ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر) ($P<۰/۰۵$). اطلاعات در مورد تاثیر *مگاسفرا السدنی* بر کنتیک تولید گاز محدود است. با این حال همان‌طور که در جدول ۲ ارائه شده است *مگاسفرا السدنی* تاثیری بر کنتیک تولید گاز در تیمارهای Me، MSC و MFP به جز MSCFP نداشت. بنابراین به نظر می‌رسد که به دلیل عدم تاثیر *مگاسفرا السدنی* بر کنتیک تولید گاز در این تیمارها در مقایسه با کنترل، تحت تاثیر قرار گرفتن کنتیک تولید گاز در تیمار MSCFP به دلیل حضور باکتری‌های لاکتوباسیل و *ساکارومایسیس سرویسیه* باشد. در تیمارهای حاوی باکتری‌های لاکتوباسیل به جز MFP پتانسیل تولید گاز، نرخ تولید گاز و میزان گاز تولیدی افزایش یافت. به طور مشابه گزارش شده است که استفاده از *لاکتوباسیلوس موکوسا* سبب افزایش پتانسیل تولید گاز شد (٤۸). همچنین مطالعه‌ای برون‌تنی استفاده از

4. Gas Yield (GY)

www.SID.ir

Archive of SID

١٤ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* منجر به افزایش گاز تولیدی در مقایسه با کنترل شد (٤). با این حال الیس و همکاران (٢٠١٦) گزارش کردند که میزان گاز تولیدی تحت تاثیر سویه‌های مختلف باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک متفاوت می‌باشد (١٥). در ارتباط با تاثیر افزودنی‌های خوراکی میکروبی بر تولید متان گزارش شده است که استفاده از ترکیب پروپینوباکتریوم و سویه‌های لاکتوباسیل در گاو شیری سبب کاهش تولید متان می‌شود (٣٠). همچنین در آزمایشی برون‌تنی گزارش شده است که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سبب کاهش ١٨ درصدی (٤٠) و در آزمایشی دیگر سبب کاهش حدود ٩٠ درصدی (٣) متانوژنز شد. تاثیر افزودنی‌های حاوی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک بر کاهش تولید متان ممکن است به‌دلیل تاثیر مثبت آن‌ها بر باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک باشد. زیرا باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک سبب افزایش غلظت پروپیونات و بوتیرات نسبت به استات می‌شوند. از این رو با افزایش غلظت پروپیونات در تیمارهای MSC و MSCFP میزان متان تولیدی در این تیمارها کاهش یافت. الگاندور و همکاران (٢٠١٤) گزارش کردند استفاده مستقیم *ساکارومایسیس سرویسیه* به صورت مستقیم در جیره سبب بهبود تولید گاز و فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط برون‌تنی شد (١٤). همچنین *ساکارومایسیس سرویسیه* سبب کاهش دسترسی هیدروژن برای متانوژن‌ها و تغییر الگو تخمیر شکمبه‌ای به سمت تولید بوتیرات و پروپیونات می‌شود (١٧). به طور مشابه با نتایج ما هریستو و همکاران (٢٠١٣) گزارش کردند که مکمل کردن با مخمر سبب کاهش تولید متان از طریق تحریک رشد باکتری‌های استوژن و رقابت با متانوژن‌ها شد (٢٤). به همین دلیل میزان تولید گاز در تیمارهای حاوی *ساکارومایسیس سرویسیه* افزایش یافت، چرا که در مسیر تولید پروپیونات دی‌اکسید کربن تولید می‌شود (٥٨). از دلیل افزایش نرخ تولید گاز برای تیمارهای حاوی مخمر می‌توان به افزایش نرخ اولیه هضم سلولز توسط *ساکارومایسیس سرویسیه* اشاره کرد (٥٤). با این حال گزارش شده است که تاثیر مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* بر کاهش و یا افزایش میزان تولید متان به سویه و ماهیت جیره بستگی دارد.

بیش‌ترین میزان ماده آلی هضم شده در تیمار SCFP مشاهده شد (٧٣٨ گرم در کیلوگرم ماده خشک). میزان انرژی قابل متابولیسم (١٨/٦٦ مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) به طور معنی‌داری در تیمار MSCFP افزایش یافت (P<٠/٠٥). از طرفی با استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی در تیمارهای FP، SCFP و MSCFP کم‌ترین میزان MCP سنتز شده مشاهده شد (P<٠/٠٥). متناسب با کاهش سنتز MCP در این تیمارها بیش‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی نیز در این تیمارها مشاهده شد که نشان دهنده کاهش استفاده از نیتروژن موجود برای سنتز MCP می‌باشد.

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر قابلیت هضم مواد مغذی در جدول ٣ ارائه شده است. قابلیت هضم ماده خشک تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>٠/٠٥). بیش‌ترین میزان قابلیت هضم پروتئین خام در تیمار FP مشاهده شد (٧١٩ گرم در کیلوگرم ماده خشک) (P<٠/٠٥). ولی اختلاف معنی‌داری بین FP، MFP و SCFP مشاهده نشد (P>٠/٠٥). بیش‌ترین میزان قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی در تیمار SCFP مشاهده شد (٤٩٨ گرم در کیلوگرم ماده خشک) که تنها با تیمار MSC اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<٠/٠٥). همچنین تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی میزان قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده اسیدی به طور معنی‌داری در تیمارهای MSCFP، SCFP، Me و SC افزایش یافت

www.SID.ir

Archive of SID

(P<۰/۰۵). قابلیت هضم مواد مغذی در یک سیستم تخمیری نشان دهنده تخمیر سوبسترای انکوبه شده توسط باکتری‌های شکمبه‌ای می‌باشد و بین گاز تولیدی از این سوبسترا و قابلیت هضم آن رابطه مستقیمی وجود دارد (٦). گزارش شده است باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک فاقد فعالیت آنزیمی برای تخریب دیواره سلولی گیاهی می‌باشند (٤٥). فرض بر این است که افزودنی‌های میکروبی حاوی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک با سایر باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک شکمبه‌ای از قبیل *رومینوباکتر آمیلوفیلوس* و *استرپتوکوکوس بوویس* بر سر مواد مغذی موجود از قبیل مونو و دی‌ساکاریدهای حاصل از هضم نشاسته، نیتروژن آمونیاکی و ویتامین‌ها رقابت می‌کنند (٥٦). این رقابت منجر به کاهش تولید لاکتات و کاهش pH شکمبه و در نتیجه افزایش رشد و فعالیت باکتری‌های سلولولیتیک در شکمبه می‌شود. با این حال قابلیت هضم ماده خشک تنها به لحاظ عددی از کنترل بیش‌تر بود (به جز MSC). همچنین به طور مشابه در آزمایشی برون‌تنی چن و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که افزایش دوز *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تاثیری بر قابلیت هضم ماده خشک نداشت (۱۰). ریچ و کونگ (۲۰۱۰) بیان کردند سیلاژ مکمل شده که ترکیب *لاکتوباسیلوس بوخنری* با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و یا پدیوکوکوس اسید لاکتیکی بود در مقایسه با تیمار کنترل قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی ی را نشان داد (٤٣). در تحقیق ما قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی تحت تاثیر FP به تنهایی قرار نگرفت ولی ترکیب آن با SC و Me در تیمارهای SCFP و MSCFP منجر به افزایش عددی قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی شد. همچنین گزارش شده است که مخمرها سبب بهبود قابلیت هضم سلولز می‌شوند که همبسته با کاهش فاز تاخیر بوده که سبب افزایش نرخ اولیه هضم می‌شود (٥٧). همچنین در آزمایشی برون‌تنی گزارش شده است که کاهش فاز تاخیر توسط *ساکارومایسیس سرویسیه* سبب افزایش نرخ رشد *فیبروباکتر سوکسینوژنز*، *رومینوکوکوس آلبوس*، *رومینوکوکوس فلاوفسینس* و *بوتیریویبریو فیبروسولونس* می‌شود (۲۰). همچنین مخمرها سبب کاهش پتانسیل رودکس می‌شوند که در نتیجه سبب افزایش نرخ رشد و اتصال باکتری‌های بی‌هوازی به قطعات علوفه و در نتیجه افزایش نرخ اولیه هضم سلولز می‌شوند (٤٤). در مطالعه ما نیز قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی در تیمارهای حاوی *ساکارومایسیس سرویسیه* (به جز MSC) افزایش یافت.

بیش‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای MSCFP و SCFP مشاهده شد (P<۰/۰۵) (جدول ٤). بخش عمده نیتروژن آمونیاکی در شکمبه از تجزیه میکروبی پروتئین و نیتروژن غیرپروتئینی در شکمبه تولید می‌شود و باکتری‌های شکمبه‌ای از نیتروژن آمونیاکی به عنوان منبع اصلی نیتروژن برای سنتز پروتئین میکروبی استفاده می‌کنند. در آزمایشی برون‌تنی مولادزی (۲۰۱۸) گزارش کرد استفاده از *ساکارومایسیس سرویسیه* و *مگاسفرا السدنی* به صورت تنهایی و ترکیب با هم تاثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقایسه با کنترل نداشت (۳۸). با این حال مخالف با نتایج ما گزارش شده است که استفاده از مخمر سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد (۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: تاثیر تیمارهای آزمایشی (افزودنی‌های خوراکی میکروبی) بر فرآسنجه‌های تولید گاز.

Table 2. Effect of different source of microbial feed additives on *in vitro* gas production parameters.

سطح احتمال P-value						SEM	Treatments [۲] تیمارهای آزمایشی					پارامترها [۱]
M×SC×FP	SC×FP	M×FP	M×SC	FP	SC	Me	MSCFP	SCFP	MFP	MSC	FP	SC	Me	CON	Parameter
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	142[a]	115[bc]	95.4[c]	103[c]	128[ab]	105[c]	99.5[c]	95.2[c]	b
0.41	0.08	0.01	0.08	0.01	0.75	0.01	0.075[a]	0.072[a]	0.063[b]	0.046[c]	0.071[ab]	0.048[c]	0.053[c]	0.060[bc]	c
0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	1.89[ab]	1.37[b]	2.38[a]	2.12[ab]	1.82[ab]	1.77[ab]	2.02[ab]	2.07[ab]	L
0.01	0.01	0.48	0.01	0.01	0.01	0.27	118[a]	95.7[b]	71.9[c]	66.8[c]	106[b]	69.0[c]	68.6[c]	68.9[c]	GP
0.69	0.01	0.02	0.02	0.69	0.01	0.01	23.5[e]	25.6[b]	24.4[d]	22.3[f]	26.0[b]	25.3[bc]	25.0[c]	27.1[a]	Methane متان
0.16	0.12	0.82	0.25	0.01	0.80	0.19	711[a]	738[a]	676[b]	587[c]	715[a]	667[b]	684[ab]	651[b]	OMD
0.01	0.01	0.48	0.01	0.01	0.01	0.27	18.7[a]	15.6[b]	12.9[c]	11.6[e]	16.9[b]	11.9[c]	11.8[c]	11.9[c]	ME
0.01	0.01	0.48	0.01	0.01	0.01	0.19	129[a]	108[b]	81.2[c]	74.4[e]	115[ab]	77.5[c]	76.4[c]	77.7[c]	GY
0.24	0.08	0.86	0.21	0.01	0.13	0.19	639[b]	648[b]	690[a]	709[a]	656[b]	700[a]	707[a]	696[a]	MCP

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها؛ حرف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

[۱] b: پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ c: نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)؛ L: فاز تاخیر (ساعت)؛ GP: گاز تجمعی تولید شده تا زمان ۲۴ (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ متان (میلی‌لیتر به ۱۰۰ میلی‌لیتر)؛ OMD: قابلیت هضم ماده آلی (گرم در کیلوگرم ماده خشک)؛ ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)؛ GY: بازده گاز: تولیدی در زمان ۲۴ (میلی‌لیتر گاز به قابلیت هضم ماده خشک)؛ MCP: پروتئین میکروبی (میلی‌گرم به گرم ماده خشک).

[۲] CON: کنترل (بدون افزودنی میکروبی)؛ Me: مگاسفرا السلنی؛ SC: ساکارومایسیس سرویسیه؛ FP: لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ MSC: مگاسفرا السلنی+ساکارومایسیس سرویسیه؛ MFP: مگاسفرا السلنی+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ SCFP: ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ MSCFP: مگاسفرا السلنی+ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم.

SEM, standard error of means; [a-f] Means in the same column with different superscript letters are different (P<0.05).

[1] *b* is the asymptotic gas production (GP) from the fermentable fraction (mL/200 mg DM); *c* is the gas production rate constant (mL/hr); *L* (h) is the discrete lag time prior to initiation of GP; Methane (mL/100 mL) Organic matter disappearance (OMD) (g/kg DM); metabolizable energy (ME) (MJ/kg DM); microbial CP (MCP) (mg/g DM); gas yield (GY) (mL gas/g DMD).

[2] CON, without microbial additive (control); Me, *Megasphaera elsdenii*; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; FP, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum*; MSC, Me plus SC; MFP, Me plus FP; SCFP, SC plus FP; MSCFP, Me plus SC plus FP.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: تاثیر تیمارهای آزمایشی (افزودنی‌های خوراکی میکروبی) بر قابلیت هضم مواد مغذی.

Table 3. Effect of different source of microbial feed additives on digestibility.

پارامترها[1] Parameter	تیمارهای آزمایشی[2] Treatments							SEM	سطح احتمال P-value			
	CON	Me	SC	FP	MSC	MFP	SCFP	MSCFP	M×SC	M×FP	SC×FP	M×SC×FP
DMD	733	761	772	771	726	739	788	766	32.1	0.32	0.49	0.31	0.35	0.58	0.57	0.24
CPD	650^{b}	629^{c}	609^{c}	719^{a}	664^{bc}	693^{a}	687^{ab}	668^{bc}	23.9	0.48	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
NDFD	489^{a}	490^{a}	485^{a}	460^{ab}	417^{b}	476^{ab}	498^{a}	494^{a}	31.8	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
ADFD	503^{c}	610^{a}	585^{ab}	521^{bc}	491^{c}	471^{c}	622^{a}	635^{a}	35.5	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها؛ حرف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

[1] DMD: قابلیت هضم ماده خشک (گرم در کیلوگرم ماده خشک)؛ CPD: قابلیت هضم پروتئین خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک)؛ NDFD: قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی (گرم در کیلوگرم ماده خشک)؛ ADFD: قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (گرم در کیلوگرم ماده خشک).

[2] CON: کنترل (بدون افزودنی میکروبی)؛ Me: مگاسفر/ السلنی؛ SC: ساکارومایسیس سرویسیه؛ FP: لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ MSC: مگاسفر/ السلنی+ساکارومایسیس سرویسیه؛ MFP: مگاسفر/ السلنی+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ SCFP: ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ MSCFP: مگاسفر/ السلنی+ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم.

SEM, standard error of means; [a-c] Means in the same column with different superscript letters are different ($P<0.05$).

[1] Dry matter digestibility (DMD) (g/kg DM); crude protein digestibility (CPD) (g/kg DM); *in vitro* digestibility of NDF (NDFD) (g/kg DM); *in vitro* digestibility of ADF (ADFD) (g/kg DM).

[2] CON, without microbial additive (control); Me, *Megasphaera elsdenii*; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; FP, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum*; MSC, Me plus SC; MFP, Me plus FP; SCFP, SC plus FP; MSCFP, Me plus SC plus FP.

www.SID.ir

Archive of SID

در برخی مطالعات استفاده از مخمر تاثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشت (۲۸) و در برخی دیگر منجر به افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد (۳۹). کاهش در غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای حاوی مخمر می‌تواند به دلیل افزایش استفاده نیتروژن آمونیاکی جهت سنتز پروتئین میکروبی (١٦) و افزایش نرخ رشد و فعالیت باکتری‌های شکمبه‌ای باشد (٥٦). همچنین گزارش شده است که مکمل کردن با مخمر سبب افزایش سنتز اسیدهای چرب شاخه‌دار می‌شود که منجر به افزایش سنتز اسیدهای آمینه شاخه‌دار و در نتیجه افزایش سنتز پروتئین میکروبی می‌شوند (٥٥).

میزان pH تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵) (جدول ٤). در ارتباط با تاثیر *مگاسفرا السدنی* بر pH شکمبه گزارش شده است که برخی سویه‌های *مگاسفرا السدنی* تاثیر بهتری در جلوگیری از تجمع اسید لاکتیک و کاهش pH دارند. در مطالعه ما که از *مگاسفرا السدنی* سویهGU1 استفاده شده تاثیری معنی‌داری بر pH مشاهده نشد. با این حال در آزمایشی برون‌تنی گزارش شده است که استفاده از *مگاسفرا السدنی* سویه B159 سبب جلوگیری از تجمع لاکتات و کاهش pH در محیط حاوی کربوهیدرات‌های قابل تخمیر شد (۲۹). از این رو مایسنر و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که ٤٨ تا ۹٦ ساعت عادت‌پذیری برای تاثیر معنی‌دار *مگاسفرا السدنی* بر پایداری pH نیاز می باشد (۳٤). در رابطه با تاثیر *ساکارومایسیس سرویسیه* بر پایداری pH شکمبه نیز به نظر می‌رسد که *ساکارومایسیس سرویسیه* سبب تحریک *مگاسفرا السدنی* و *سلنوموناس رومینانتیوم* می‌شود (۸). همچنین مطابق با نتایج ما استفاده از *ساکارومایسیس سرویسیه* و *مگاسفرا السدنی* به صورت تنهایی و ترکیب با هم تاثیری بر pH شکمبه‌ای نداشت (۳۸). در ارتباط با تاثیر باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک بر pH نیز موافق با نتایج ما عدم تاثیر بر میزان pH گزارش شده است (٤، ۱۰).

غلظت کل اسیدهای چرب فرار به طور معنی‌داری برای تیمار MSCFP افزایش یافت (٤۱/۸ میلی‌مولار) (P<۰/۰۵) (جدول ٤). بیش‌ترین میزان درصد استات در تیمار کنترل مشاهده شد (٤٦/۸) (P<۰/۰۵) و در مقابل استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی سبب افزایش درصد پروپیونات و بوتیرات به ترتیب در تیمارهای MSC و FP (به ترتیب ۲۹/۳ و ۳۳/۲ درصد) شد (P<۰/۰۵). با این حال غلظت بوتیرات تحت تاثیر تیمارهای آزمایش قرار نگرفت (P>۰/۰۵). همچنین استفاده از افزودنی‌های خوراکی میکروبی سبب کاهش نسبت استات به پروپیونات و همچنین کاهش نسبت استات+بوتیرات به پروپیونات شد (P<۰/۰۵) (جدول ٤). افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش قابلیت هضم مواد مغذی هم‌خوانی داشت. افزایش تخمیر ماده آلی می‌تواند دلیل افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار باشد (۳۳). با این حال عدم تاثیر استفاده از باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده اسید لاکتیک بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار گزارش شده است (۲٦، ٥۳). استات اسید چرب غالب شکمبه در جیره‌های بر پایه علوفه می‌باشد، با این حال غلظت آن در جیره‌های بر پایه کنسانتره کاهش و غلظت پروپیونات افزایش می‌یابد. همان طور که در جدول ٤ مشاهده می‌شود با توجه به ماهیت جیره غلظت پروپیونات افزایش یافت. با این حال در رابطه با استفاده از *مگاسفرا السدنی* و *ساکارومایسیس سرویسیه* گزارش شده است که سبب افزایش غلظت پروپیونات می‌شوند (۱۱، ۳۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤: تاثیر تیمارهای آزمایشی (افزودنی‌های خوراکی میکروبی) بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول بر لیتر)، نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و pH.

Table 4. Effect of different source of microbial feed additives on *in vitro* rumen VFA, ammunia-N and pH after 24 h incubation

P-value سطح احتمال						SEM	Treatments[1] تیمارهای آزمایشی						پارامترها Parameter
M×SC×FP	SC×FP	M×FP	M×SC	FP	SC	Me		MSCFP	SCFP	MFP	MSC	FP	SC	Me	CON	
0.53	0.02	0.39	0.05	0.02	0.07	0.16	1.15	41.8^{a}	39.5^{ab}	38.3^{bc}	38.5^{bc}	37.8^{bc}	36.6^{c}	37.2^{bc}	38.2^{bc}	کل اسیدهای چرب فرار Total volatile fatty acid
0.01	0.16	0.01	0.63	0.12	0.01	0.01	1.21	41.0^{c}	43.4^{bc}	44.6^{ab}	41.9^{c}	42.9^{bc}	42.6^{bc}	42.6^{bc}	46.8^{a}	استات (٪) Acetate
0.27	0.01	0.06	0.03	0.73	0.01	0.01	0.3	27.6^{b}	24.5^{e}	26.4^{c}	29.3^{a}	23.9^{ef}	25.0^{de}	25.4^{d}	22.5^{g}	پروپیونات (٪) Propionate
0.31	0.11	0.13	0.43	0.27	0.82	0.06	1.4	31.4	32.0	29.0	28.8	33.2	32.4	32.0	30.7	بوتیرات (٪) Butyrate
0.01	0.01	0.001	0.52	0.06	0.01	0.01	0.03	1.49^{d}	1.77^{b}	1.69^{c}	1.43^{d}	1.79^{b}	1.71^{bc}	1.68^{c}	2.08^{a}	استات/پروپیونات Acetate/ Propionate
0.78	0.01	0.06	0.34	0.39	0.01	0.01	0.05	2.63^{d}	3.08^{b}	2.79^{d}	2.41^{e}	3.18^{b}	3.01^{bc}	2.94^{c}	3.44^{a}	استات+بوتیرات/پروپیونات Acetate+ Butyrate / Propionate
0.06	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.22	9.96^{a}	9.41^{a}	7.00^{d}	8.43^{c}	8.32^{c}	6.66^{d}	9.17^{b}	7.35^{d}	نیتروژن آمونیاکی Ammonia-N
0.30	0.88	0.65	0.65	0.45	0.88	0.88	0.02	6.70	6.71	6.71	6.72	6.70	6.71	6.70	6.73	pH

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها؛ حرف غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

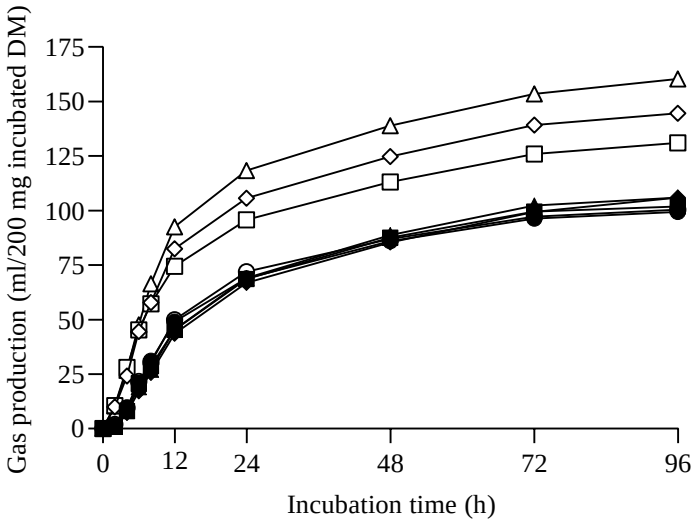
[1] CON: کنترل (بدون افزودنی میکروبی)؛ Me: مگاسفر/ السانسی؛ SC: ساکارومایسیس سرویسیه؛ FP: لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ MSC: مگاسفر/ السانسی+ساکارومایسیس سرویسیه؛ MFP: مگاسفر/ السانسی+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ SCFP: ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم؛ MSCFP: مگاسفر/ السانسی+ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم.

SEM, standard error of means; [a-g] Means in the same column with different superscript letters are different ($p<0.05$).

[1] CON, without microbial additive (control); Me, *Megasphaera elsdenii*; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; FP, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum*; MSC, Me plus SC; MFP, Me plus FP; SCFP, SC plus FP; MSCFP, Me plus SC plus FP.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر به ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) در زمان‌های مختلف انکوباسیون. ●: کنترل (بدون افزودنی میکروبی)؛ ■: *مگاسفرا السدنی*؛ ▲: *ساکارومایسیس سرویسیه*؛ ◊: *لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم*؛ ♦: *مگاسفرا السدنی+ساکارومایسیس سرویسیه*؛ ○: *مگاسفرا السدنی+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم*؛ □: *ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ؛ Δ: *مگاسفرا السدنی+ساکارومایسیس سرویسیه+لاکتوباسیلوس فرمنتوم+لاکتوباسیلوس پلانتاروم*.

Figure 1. The cumulative gas production (ml/200 mg DM) during different incubation times. ● (CON), without microbial additive (control); ■ (Me), *Megasphaera elsdenii*; ▲ (SC), *Saccharomyces cerevisiae*; ◊ (FP), *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum*; ♦ (MSC), Me plus SC; ○ (MFP), Me plus FP; □ (SCFP), SC plus FP; Δ (MSCFP), Me plus SC plus FP.

که به طور مشابه در تیمارهای حاوی هر دو افزودنی (MSCFP و MSC) غلظت پروپیونات افزایش یافت. اگرچه گزارش شده است که *مگاسفرا السدنی* سبب افزایش غلظت بوتیرات می‌شود (۲۳)، ولی در این تحقیق غلظت بوتیرات تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. همچنین با توجه به افزایش قابلیت هضم ماده آلی و افزایش تولید پروپیونات، نسبت استات به پروپیونات کاهش یافت. همچنین کاهش نسبت استات+بوتیرات به پروپیونات نشان دهنده افزایش تولید پروپیونات و افزایش رقابت بر سر مصرف هیدروژن با متانوژن‌ها می‌باشد. چرا که استات و بوتیرات به عنوان تولید کننده و پروپیونات به عنوان مصرف کننده هیدروژن در نظر گرفته می‌شوند (۳۷). همچنین در جیره‌های با کنسانتره بالا باکتری‌های آمیلولیتیک با متانوژن‌ها بر سر مصرف هیدروژن برای تولید پروپیونات رقابت می‌کنند (٤٦).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مثبت سه تیمار FF، SCFP و MSCFP بر تولید گاز، کاهش تولید متان و همچنین قابلیت هضم مواد مغذی، شاید بتوان استفاده از این افزودنی‌های میکروبی در جیره با کنسانتره بالا در بره پرواری توصیه کرد. از این رو این تیمارها کاندیدای خوبی برای استفاده هستند. همچنین با توجه تاثیر افزودنی‌های میکروبی مورد استفاده بر غلظت اسیدهای چرب فرار، احتمال کاهش خطر ابتلا به اسیدوز با استفاده از افزودنی‌های میکروبی وجود دارد. با این حال برای تعیین اثر بخشی این تیمارها

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش‌هـای بـیش‌تـری در زمینـه دام‌هـای شـیری و پرواری مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علـوم کشاورزی و منابع خوزستان بـه خـاطر حمایـت مـالی این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل آورند.

منابع

1. Al Ibrahim, R. M., Kelly, A. K., O'Grady, L., Gath, V. P., McCarney, C. and Mulligan, F. J. 2010. The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, and rumen fermentation of dairy cows in early lactation. Journal of Dairy Science. 93. 5318–5328.
2. AOAC. 2005 International. Official Methods of Analysis. 18th rev. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
3. Asa, R., Tanaka, A., Uehara, A., Shinzato, I., Toride, Y., Usui, N., Hirakawa, K. and Takahashi, J. 2010. Effects of protease-resistant antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria on rumen methanogenesis. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 23(6): 700–707.
4. Astuti, W. D., Wiryawan, K. G., Wina, E., Widyastuti, Y., Suharti, S. and Ridwan, R. 2018. Effects of selected *Lactobacillus plantarum* as probiotic on *in vitro* ruminal fermentation and microbial population. Pakistan Journal of Nutrition. 17: 131–139.
5. Beauchemin, K. A., Krehbiel, C. R. and Newbold, C.J. 2006. Enzymes, bacterial directfed microbials and yeast: Principles for use in ruminant nutrition. Pages 251–284 in Biology of nutrition in growing animals. Vol. 4. R. Mosenthin, J. Zentek, and T. Żebrowska, ed. Elsevier Science Health Science Division.
6. Blümmel, M., Steingaβ, H. and Becker, K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15 N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. British Journal of Nutrition. 77(6): 911–921.
7. 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 of Dairy Science. 63(1): 64-75.
8. Callaway, E. S. and Martin, S. A., 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. Journal of Dairy Science. 80: 2035–2044.
9. Calsamiglia, S., Blanch, M., Ferret, A. and Moya, D. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. Journal of Animal Feed Science and Technology. 172(1-2): 42-50.
10. Chen, L., Ren, A., Zhou, C. and Tan, Z. 2017. Effects of Lactobacillus acidophilus supplementation for improving in vitro rumen fermentation characteristics of cereal straws. Italian Journal of Animal Science. 216 (1): 52–60.
11. Drouillard, J. S., Henning, P. H., Meissner, H. H. and Leeuw, K. J. 2012. *Megasphaera elsdenii* on the performance of steers adapting to a high-concentrate diet, using three or five transition diets. South African Journal of Animal Science. 42(2): 195–199.
12. Elghandour, M. M., Rodríguez-Ocampo, I., Parra-Garcia, A., Salem, A. Z., Greiner, R., Márquez-Molina, O., Barros-Rodríguez, M. and Barbabosa-Pilego, A. 2018. Biogas production from prickly pear cactus containing diets supplemented with Moringa oleifera leaf extract for a cleaner environmental livestock production. Journal of Cleaner Production. 185: 547–553.
13. Elghandour, M. M.Y., Vázquez, J. C., Salem, A. Z. M., Kholif, A. E.,

www.SID.ir

Archive of SID

Cipriano, M. M., Camacho, L. M. and Márquez, O. 2017. *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Animal Research. 45: 389–395.

14. Elghandour, M. M., Chagoyán, J. C. V., Salem, A. Z., Kholif, A. E., Castañeda, J.S.M., Camacho, L.M. and Cerrillo-Soto, M.A. 2014. Effects of Saccharomyces cerevisiae at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. Italian Journal of Animal Science. 13(2): 3075.
15. Ellis, J. L., Bannink, A., Hindrichsen, I. K., Kinley, R. D., Pellikaan, W. F., Milora, N. and Dijkstra, J. 2016. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* rumen organic matter digestibility, total gas and methane production. Journal of Animal Feed Science and Technology. 34-9.
16. Erasmus, L.J., Botha, P.M. and Kistner, A. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. Journal of Dairy Science. 75: 3056–3065.
17. Erasmus, L. J., Robinson, P. H., Ahmadi, A., Hinders, R. and Garrett, J. E. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. Journal of Animal Feed Science and Technology. 122: 219 –239.
18. France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S., and Bannink, A. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. British Journal of Nutrition. 83: 143–150.
19. Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals. In ‘‘Probiotics: A Critical Review’’ (G.W. Tannock, ed.), pp. 15–22. Horizon Scientific Press. Wymondham. UK.
20. Girard, I. D. and Dawson, K. A. 1995. Stimulatory activities from low-molecular weight fractions derived from Saccharomyces cerevisiae strain 1026. Page 23 in 23rd biennial conference on rumen function. Chicago. Illinois.
21. Henning, P. H., Horn, C. H., Steyn, D. G., Meissner, H. H. and Hagg, F. M. 2010. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. Journal of Animal Feed Science and Technology. 157(1-2): 13-9.
22. Hernandez, A., Kholif, A. E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M. M. Y., Cipriano, M., Rodríguez, G. B., Odongo, N. E. and Salem, A. Z. M. 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. Journal of Cleaner Production. 142: 2384–2392.
23. Horn, C. H., Kistner, A. and Fouche, G. 2009. Selective enrichment, isolation and characterization of fast-growing acid-tolerant and ionophores-resistant lactate utilisers from rumen contents of animals on high-energy diets. In: Ruminant Physiology – Digestion, Metabolism and Effects of Nutrition on Reproduction and Welfare. 216–217.
24. Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H. P., Adesogan, A. T., Yang, W., Lee, C. and Gerber, P. J. 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. Journal of Animal Science. 91: 5045–5069.
25. Jaramillo-López, E., Itza-Ortiz, M. F., Peraza-Mercado, G. and Carrera-Chávez, J. M. 2017. Ruminal acidosis: strategies for its control. Austral Journal of Veterinary Sciences. 49(3): 139-48.
26. Kenney, N. M., Vanzant, E. S., Harmon, D. L. and McLeod, K. R., 2015. Effect of direct-fed microbials on utilization of degradable intake protein in receiving steers. Canadian Journal of Animal Science. 95: 93–102.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Kholif, A. E., Elghandour, M. M. Y., Rodríguez, G. B., Olafadehan, O. A. and Salem, A. Z. M. 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. Journal of Cleaner Production. 142: 2649–2655.
28. Křížová, L., Richter, M., Třináctý, J., Říha, J. and Kumprechtová, D. 2011. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redox potential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. Czech Journal of Animal Science. 56: 37–45.
29. Kung Jr. L., and Hession, A. O. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. Journal of Animal Science. 73: 250–256.
30. Lettat, A., Nozière, P., Silberberg, M., Morgavi, D. P., Berger, C. and Martin, C. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. BMC Microbiology . 12: 142.
31. Luo, J., Ranadheera, C. S., King, S., Evans, C. and Baines, S. 2017. *In vitro* investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids. Journal of Integrative Agriculture. 16(7): 1566-75.
32. Mao, H. L., Mao, H. L., Wang, J. K., Liu, J. X. and Yoon, I. 2013. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on *in vitro* fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets. Journal of Animal Science. 91: 3291–3298.
33. McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D. and Morgan, C. A. 2002. Animal Nutrition, 6th ed. Pearson Education Inc. Harlow. UK.
34. Meissner, H. H., Henning, P. H., Leeuw, K. J., Hagg, F. M., Horn, C. H., Kettunen, A. and Apajalahti, J. H. A. 2014. Efficacy and mode of action of selected non-ionophore antibiotics and direct-fed microbials in relation to *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 during *in vitro* fermentation of an acidosis-causing substrate. Livestock Science. 162: 115–125.
35. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science. 93(1): 217–222.
36. Menke, K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Animal Research and Development. 28: 7–55.
37. Moss, A. R., Jouany, J. P. and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Annales De Zootechnie. 49: 231–253.
38. Mulaudzi, T. 2018. *In vitro* effects of *Megasphaera elsdenii* ncimb 41125 and *Saccharomyces Cerevisiae* 1026 on rumen fermentation in early lactating cows. University of South Africa (Master of Science thesis). 30-32.
39. Newbold, C. J., McIntosh, F. M. and Wallace, R.J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. Canadian Journal of Animal Science. 7: 241–244.
40. Nollet, L., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D. and Verstraete, W. 1998. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. Journal of Animal Feed Science and Technology. 71 (1-2): 49–66.
41. NRC. 2007. *Nutrient Requirments of Dairy Cattel* (7th rev. Ed.). The National Academies Press, Washington, DC.
42. Oba, M. and Wertz-Lutz, A.E. 2011. Ruminant nutrition symposium: Acidosis: New insights into the persistent problem. Journal of Animal Science. 89 (4): 1090-1.
43. Reich, L. J. and Kung, L. J. 2010. Effects of combining *Lactobacillus*

www.SID.ir

Archive of SID

buchneri 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. Journal of Animal Feed Science and Technology. 159: 105–109.

44. Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S. and Gouet, P. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose, avicel of the rumen bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 56: 3081–3087.
45. Rooke, J. A. and Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. Journal of Animal Science and Technology. 95–139.
46. Russell, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. Journal of Dairy Science. 81: 3222–3230.
47. Seo J. K., Kim, S.W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D.K. and Ha, J. K. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 12: 1657–1667.
48. Soriano, A. P., Mamuad, L. L., Kim, S. H., Choi, Y.J., Jeong, C. D., Bae, G. S., Chang, M. B. and Lee, S. S. 2014. Effect of Lactobacillus mucosae on *in vitro* rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production, and bacterial diversity. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 27(11): 1562–1570.
49. Statistical Analysis System (SAS). 2008. SAS/STAT 9.2 user's guide. Cary (NC): SAS Institute Inc.
50. Tilley J. M. A. and Terry, R. A. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Grass Forage Science. 18(2): 104-111.
51. Tung, R. S. and Kung, Jr.L. 1993. *In vitro* effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. Journal of Dairy Science. 76(4): 1083-90.
52. Van Soest, P.V., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74 (10): 3583–3597.
53. Vyas, D., McGeough, E. J., McGinn, S. M., McAllister, T. A. and Beauchemin, K. A., 2014. Effect of Propionibacterium spp. on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and methane emissions in beef heifers fed a high-forage diet. Journal of Animal Science. 92(5): 2192–2201.
54. Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B. and Newbold, C. J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 15. 1458–1468.
55. Wambui, C. C., Awano, T., Ando, S., Abdulrazak, S. A. and Ichinohe, T. 2010. Effect of yeast supplementation on *in vitro* ruminal degradability of selected browse species from Kenya. Journal of Food, Agriculture and Environment. 8(2): 553–7.
56. Weinberg, Z. G., Shatz, O., Chen, Y., Yosef, E., Nikbahat, M., Ben-Ghedalia, D. and Miron, J. 2007. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* digestibility of wheat and corn silages. Journal of Dairy Science. 90: 4754–4762.
57. Williams, P. E., Tait, C. A., Innes, G. M. and Newbold, C. J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. Journal of Animal Science. 69: 3016–3026.
58. Wolin, M. J. and Miller, T. L., 1988. Microbe-microbe interactions. In: Hobson, P.N. (Ed.), the Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Essex. England. UK. 343–360.
59. Zicarelli, F., Calabro, S., Cutrignelli, M. I., Infascelli, F., Tudisco, R., Bovera, F. and Piccolo, V. 2011. *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. Journal of the Science of Food and Agriculture. 91(7): 1213–1221.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 7(4), 2019
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of lactate producing and utilizing bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* on anaerobic biofermentation and digestibility in Arabi sheep

E. Direkvandi[1], *T. Mohammadabadi[2], A.Z.M. Salem[3]
[1]Ph.D student and [2]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan.
[3]Professor, Dept. of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Autonomous University of the State of Mexico
Received: 12/02/2019; Accepted: 02/03/2020

Abstract

Background and objectives: Acidosis is a nutritional disorder that is often caused by intake of the high amount of fermentable carbohydrate and an inadequate amount of fiber to induce buffering in the rumen. Hence, a strategy such as the use of microbial additives to prevent acidosis has been suggested. So, this study performed to investigate the effect of using three microbial feed additives (lactate producing and utilizing bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*) in high-concentrate diet on *in vitro* anaerobic fermentation and digestibility in sheep. Our hypothesis was that the combination of microbial additives compared with individual use and without additives will have a positive effect on *in vitro* gas production parameters and digestibility in sheep.

Materials and methods: For investigating the effect of microbial additives on the *in vitro* gas production (GP) parameter, ruminal fermentation and digestibility, eight treatments were studied based on as factorial experiment based on a completely randomized design; (1) control (basal diet (70% concentrate and 30% forage) without additive; (CON); (2) basal diet + *Megasphaera elsdenii* (Me); (3) basal diet + *Saccharomyces cerevisiae* (SC); (4) basal diet + *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* (FP); (5) basal diet + Me + SC (MSC); (6) basal diet + Me + FP (MFP); (7) basal diet + SC + FP (SCFP) and (8) basal diet + Me + SC + FP (MSCFP). Gas production techniques and two step digestion were used to evaluate the effectiveness of experimental treatments. Ruminal fluid was collected from three adult male Arabi sheeps that fed a diet based on forage.

Results: Results showed that use of microbial feed additive improved GP and the highest amount of GP was observed in treatment MSCFP ($P < 0.05$). However, the lowest amount of methane production was observed in MSC ($P < 0.05$). Application microbial feed additives lead to improve *in vitro* fermentation parameter (OMD and ME) ($P < 0.05$). Also, the highest amount of MCP was observed in MSC ($P < 0.05$). Digestibility of CP and ADF significantly increased by FP and MSCFP ($P < 0.05$). Although, digestibility of NDF numerically increased for SCFP. The concentration of total VFA and acetate significantly increased by MSCFP and CON. But, the highest concentration of propionate and butyrate were observed in MSC and FP. The use of microbial food additives decreased the ratio of acetate to propionate and also the ratio of acetate + butyrate to propionate ($P < 0.05$). The highest concentration of ammonia N was observed in MSCFP and SCFP treatments ($P < 0.05$).

Conclusion: Given the positive results of the experimental treatments on gas production, reduced methane production and nutrient digestibility, the use of these microbial additives may be recommended for testing in high concentrated rations in sheep. Therefore, these FF, SCFP and MSCFP treatments are good candidates for using.

Keywords: Digestibility, Fermentation parameter, Gas production parameter, Microbial additives

*Corresponding author; mohammadabadi@asnrukh.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir