



مقایسه جمعیت میکروبی شکمبه با مصرف علوفه خشبی در گاوهای سیستانی و هولشتاین

- هرمز منصوری، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
- علی نیکخواه و محمد رضائیان، اعضاء هیأت علمی دانشگاه تهران
- سیداحمد میرهادی، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: تیرماه ۱۳۸۴

E-mail: h-mansouri@asri.ir

چکیده

به منظور مقایسه تراکم جمعیت میکروبی شکمبه گاوهای سیستانی (*Bos indicus*) و هولشتاین (*Bos taurus*)، در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش آزمایش فاکتوریل، تعداد شش رأس گاو نر بالغ سیستانی پرورش یافته در شهرستان‌های زابل و کرج (با میانگین وزن 23 ± 395 کیلوگرم)، و تعداد سه رأس گاو نر هولشتاین (با میانگین وزن 12 ± 378 کیلوگرم) فیستول گذاری شکمبه‌ای شده و در سه مرحله جداگانه با سه خوراک پایه علف یونجه، علف نی و کاه گندم، دو بار در روز، و در حد نگهداری تغذیه شدند. از مایع شکمبه گاوها در زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ ساعت پس از مصرف خوراک صبح، نمونه برداری گردید. جمعیت کل باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه، با تغذیه علف یونجه به ترتیب $10^{11} \times 1/423$ و $10^{11} \times 1/367$ و $10^{11} \times 1/298$ ، با مصرف علف خشک نی $10^{11} \times 1/193$ ، $10^{11} \times 1/143$ و $10^{11} \times 1/089$ و با مصرف کاه گندم $10^{11} \times 1/028$ و $10^{11} \times 1/019$ و $10^{11} \times 9/10$ بود اما تفاوت‌ها معنی دار نبود. جمعیت کل تک یاخته‌ها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه با مصرف علف یونجه ($10^4 \times 5/19$ در مقابل $10^4 \times 3/71$ و $10^4 \times 2/96$)، و کاه گندم ($10^4 \times 3/03$ در مقابل $10^4 \times 2/17$ و $10^4 \times 2$) به ترتیب در گاوهای سیستانی زابل بیشتر از سیستانی کرج و هولشتاین بود ($p < 0/05$). با مصرف علف نی تفاوت معنی‌داری بین سه گروه مشاهده نگردید. جمعیت تک‌یاخته‌های هولوتریج (دسته‌ای از تک‌یاخته‌های شکمبه که تمام بدن آنها از مژه پوشیده شده است) نیز در گاوهای سیستانی زابل با مصرف علف یونجه، علف نی و کاه گندم به‌طور معنی‌داری بیشتر از گاوهای سیستانی کرج و هولشتاین بود ($p < 0/05$). با مصرف سه نوع خوراک تفاوتی بین جمعیت کل قارچ‌های بی‌هوازی در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه، بین سه گروه مشاهده نگردید و بیشترین تراکم زواسپور قارچ‌ها در هنگام تغذیه کاه وجود داشت.

کلمات کلیدی: گاو سیستانی، گاو هولشتاین، باکتری، تک‌یاخته، قارچ.

Pajouhesh & Sazandegi No:72 pp: 66-73

Comparison of microbial population in ruminal fluid of Sistani and Holstein cattle fed different roughages.

By: Mansouri H., Scientific Member of Animal Science Research A. Nik- Khah, and M. Rezaeian Institute Scientific Member of Tehran University S. A. Mirhadi, Scientific Member of Animal Science Research .

In order to compare rumen microbial population between sistani (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) breeds, three ruminally fistulated Sistani steers in Karaj (SK), three Sistani steers in Zabol (SZ) and three Holstein steers in Karaj (HK) were used in a completely randomized design with factorial arrangement. These three groups of steer, in three different periods, fed three type of roughage diets including either alfalfa hay (ALF) , *Phragmites australis* (PA) or wheat straw (WS). The feed offered twice a day (8:00 and 16:00) at about maintenance level of requirements. The total population of bacteria per ml of rumen liquor were not significantly different among the groups fed different

diets. Feeding of PA did not affect the protozoa concentration in the rumen liquor of Holstein (2.28×10^4) and Sistani (3.00×10^4), but when the animals fed ALF or WS the total protozoa number (per ml of rumen liquor) of SZ were significantly ($p < 0.05$) higher than SK and HK groups (5.19×10^4 vs 3.71×10^4 and 2.96×10^4 respectively). Also when animal received WS, total protozoa number of SZ were significantly ($p < 0.05$) higher than SK and HK groups (3.03×10^4 vs 2.17×10^4 and 2.00×10^4 respectively). Holotrich protozoa number in three diets were significantly ($p < 0.05$) higher in SZ than the other groups. No significantly differences were observed among the groups for the density of ruminal anaerobic fungal zoospore. It can be concluded that, the Holstein steers could have better potential to digestion of ALF, whereas the Sistani steers may ferment and digest PA and WS diets more efficiently.

Key words: Cattle, Sistani, (*Bos indicus*), Holstein (*Bos Taurus*), Rumen microbes.

مقدمه

در بین حیوانات اهلی علفخوار، نشخوارکنندگان دارای بیشترین سهم در تبدیل مواد گیاهی غیر قابل استفاده انسان، به فرآورده‌های غذایی قابل استفاده و همچنین تأمین خوراک و سلامت بشر را دارا می‌باشند. این حیوانات ۷۰٪ کل پروتئین حیوانی قابل مصرف و ۱۰٪ الیاف طبیعی مورد استفاده انسان را تأمین می‌کنند. اگرچه قسمت عمده خوراک نشخوارکنندگان را دیواره سلول‌های گیاهی تشکیل می‌دهد ولی خود این حیوانات توانایی تولید آنزیم‌های لازم برای تجزیه سلولز و همی سلولز، که جزء اصلی این خوراک‌های الیافی هستند، را ندارند. به همین علت حیوانات نشخوارکننده برای دستیابی و استفاده از ترکیبات دیواره سلولی گیاهان، متکی به تخمیر این ترکیبات توسط میکروارگانیسم‌های مستقر در شکمبه خود هستند (۲۸، ۲۷).

دستگاه گوارش همه علف‌خواران بالغ حاوی جمعیت‌هایی از باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها و قارچ‌های بی‌هوازی است که نقش عمده‌ای در هیدرولیز مواد خوراکی دارند و علاوه بر آن همزیستی مسالمت آمیزی با حیوان میزبان دارند. در حیوانات نشخوارکننده، عمده تخمیر میکروبی در شکمبه و نگاری (که به عنوان پیش معده محسوب می‌شوند) صورت می‌گیرد، که علت آن وجود شرایط بی‌هوازی، دمای نسبتاً یکنواخت (۳۸ تا ۴۰ درجه سانتیگراد)، جریان نسبتاً ثابت آب و مواد گوارشی، جریان منظم مواد خوراکی با قابلیت تخمیر بالا، وجود بخش مایع و بخش جامد، pH نسبتاً پایدار (بین ۶ تا ۷) و کندتر بودن سرعت عبور مواد خوراکی نسبت به سرعت تکثیر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. تمامی این حالات، شرایط مناسبی برای انتقال، استقرار و رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه تخمیر میکروبی مواد خوراکی را در شکمبه فراهم کرده است (۱۶).

شکمبه نوزاد نشخوارکنندگان، عاری از میکروارگانیسم بوده و در این مرحله محتویات آن را موکوس، بزاق و سلول‌های کنده شده دستگاه گوارش تشکیل می‌دهد. پس از تولد به سرعت میکروارگانیسم‌ها در شکمبه استقرار پیدا می‌کنند. باکتری‌های بی‌هوازی از روز دوم پس از تولد در شکمبه غالب می‌شوند و

باکتری‌های سلولولیتیک و متان‌زا در حدود روز چهارم ظاهر می‌شوند. قارچ‌های بی‌هوازی نیز از حدود ۸ تا ۱۰ روز پس از تولد، و تک‌یاخته‌های مژکدار در خلال هفته دوم و سوم در شکمبه ظاهر می‌شوند (۳۲، ۹).

زمانی که نوزاد نشخوارکننده از شیر گرفته می‌شود و عمل نشخوار کردن در آن کامل می‌گردد، تراکم میکروارگانیسم‌ها در شکمبه همانند نشخوارکننده بالغ می‌شود به طوری که در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه حدود 10^9 تا 10^{11} عدد باکتری، 10^4 تا 10^6 عدد تک‌یاخته و 10^5 عدد قارچ یافت می‌شود. جمعیت میکروبی شکمبه همواره ثابت و یکنواخت نیست بلکه عوامل فیزیولوژیکی مانند سن دام، رفتارهای تغذیه‌ای، سطح تولید، سلامت دام، ماهیت و روابط بین جمعیت‌های میکروبی مختلف و همچنین عوامل خارجی از قبیل ترکیب شیمیایی جیره غذایی، ماهیت جیره، مقدار خوراک، تعداد دفعات خوراک، تغییر جیره غذایی، تغییر فصل، تغییرات در طول شبانه‌روز و عوامل جغرافیایی، نسبت و تراکم گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌های شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۹).

از طرف دیگر اختلاف‌های معنی‌داری در تعداد و نوع گونه‌های میکروبی موجود در شکمبه نشخوارکنندگان با توجه به تفاوت‌های ژنتیکی و محیطی (۱۲، ۱۷، ۱۴، ۲۱، ۲۵، ۲۹) گزارش گردیده است، که این امر می‌تواند توانایی هضم و تخمیر خوراک مصرفی توسط حیوان را تحت تأثیر قرار دهد. در مورد توان هضمی گاوهای *Bos indicus* و *Bos taurus* نیز تفاوت‌هایی گزارش شده است (۱۵، ۱۶، ۲۰، ۲۲، ۲۴). هدف از انجام این تحقیق، مقایسه جمعیت میکروبی شکمبه (از نظر کمی) در این دو نژاد می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه اغلب مطالعات انجام شده برای تعیین ارزش غذایی مواد خوراکی با استفاده از دام‌های نژادهای اروپایی انجام شده و با عنایت به تفاوت‌های گزارش شده در مورد توان هضمی بین گاوهای *Bos* و *Bos indicus* لزوم شناخت و مقایسه استعدادهای هضمی آنها، با تکیه بر تعیین تراکم جمعیت‌های میکروبی شکمبه آنها، با مصرف خوراک‌های خشبی مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

حیوان و محل آزمایش: جهت بررسی جمعیت میکروبی در گاو سیستانی و هولشتاین، و مطالعه اثر منطقه جغرافیایی بر نسبت و تراکم میکروارگانیسم‌های شکمبه، از تعداد شش رأس گاو نر بالغ سیستانی (سه رأس در شهرستان کرج و سه رأس در شهرستان زابل) با میانگین وزن 23 ± 378 کیلوگرم، و سه رأس گاو نر بالغ هولشتاین با میانگین وزن 12 ± 378 کیلوگرم استفاده شد. گاوهای سیستانی زابل در ایستگاه تحقیقاتی زهک و گاوهای سیستانی کرج و گاوهای هولشتاین در مزرعه آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران واقع در کرج، با عمل جراحی اخته و پس از بهبود، جهت تعبیه فیستول در شکمبه به روش دو مرحله‌ای مورد عمل جراحی قرار گرفتند (۲۶، ۱).

علوفه مورد آزمایش و جیره غذایی: علوفه مورد استفاده شامل علف خشک یونجه، علف خشکنی^۱ و کاه گندم بود. با مصرف هر یک از سه علوفه، دام‌های آزمایشی به مدت ۱۵ روز جهت عادت پذیری و تطابق میکروارگانیسم‌های شکمبه با جیره غذایی، در سطح نگهداری (دام) و دو بار در روز در ساعاتی ۸ صبح و ۱۶ تغذیه شدند. در هنگام مصرف کاه، برای تأمین نیاز نیتروژنی میکروارگانیسم‌ها، در حد تأمین نیاز نگهداری دام، خوراک کنسانتره به جیره گاوها اضافه گردید. در تمام مدت آزمایش، سنگ نمک و آب بطور آزاد در دسترس دامها قرار داشت.

تخمین تراکم باکتری های شکمبه

تهیه محیط کشت: محیط کشت مورد استفاده جهت شمارش باکتری‌ها به روش حداکثر تعداد احتمالی^۲ (MPN)، بر اساس روش Obispo و Dehority (۱۹) و Dehority و همکاران (۸) تهیه شد. اجزاء محیط کشت بی‌هوازی به شرح جدول شماره ۲ بوده و در شرایط اشباع از گاز دی‌اکسید کربن و با pH معادل ۶ تهیه گردید.

تهیه رقت‌های مختلف از مایع شکمبه تازه: از هر دام در زمان‌های صفر (قبل از وعده خوراک صبح)، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ ساعت پس از مصرف وعده خوراک صبح، نمونه مایع شکمبه از طریق فیستول جمع‌آوری و پس از صاف کردن آن توسط پارچه مخصوص، در بطری پلاستیکی حاوی گاز کربنیک ریخته شد و با قرار دادن در فلاسک محتوی آب ۳۹ درجه سانتیگراد، برای کشت دادن بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید (۷).

تلقیح و نگهداری کشت‌های انجام شده: برای هر یک از زمان‌های نمونه برداری، بلافاصله پس از تهیه رقت‌های مختلف مایع شکمبه، رقت‌های 10^{-6} 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 درجه سانتیگراد منتقل گردید. ده لوله حاوی محیط 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 درجه سانتیگراد نگهداری شده و هر روز دوبار محتویات لوله‌ها به آرامی همزده شد (۸).

تخمین تعداد باکتری‌ها: پس از طی مدت انکوباسیون، از دو معیار تغییر رنگ (کدر شدن) با مشاهده 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 (۲۷).

شمارش تک‌یاخته‌ها: در هر یک از زمان‌های نمونه برداری، پس از جمع‌آوری و انتقال مایع شکمبه تازه به آزمایشگاه، از هر نمونه در سه لوله آزمایش، سه نمونه کوچکتر به حجم ۵ میلی‌لیتر تهیه شد. برای ثابت کردن (کشتن) تک‌یاخته‌ها، از محلول ثابت کننده فرمالدئید ۱۰٪ در محلول کلرور سدیم ۰/۹ درصد استفاده گردید (۳۳). به ازاء هر یک میلی‌لیتر مایع شکمبه یک قطره محلول ثابت کننده به آن اضافه شد و بعد از ثابت شدن تک‌یاخته‌ها، 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 درشت‌نمایی $10 \times$ تک‌یاخته‌ها در سلول‌های چهار گوشه و وسط لام شمارش گردید. تعداد تک‌یاخته‌های هولوتریج نیز در تمام سطح لام (در ۱۰۰ سلول) شمارش شد. برای هر شمارش در هر زمان ۳ تکرار وجود داشت.

شمارش قارچ‌های بی‌هوازی: در هر یک از زمان‌های نمونه برداری، بلافاصله پس از جمع‌آوری مایع تازه شکمبه، تعداد زواسپور قارچ‌های بی‌هوازی در نمونه، با استفاده از میکروسکوپ نوری در تمام حجم لام مدرج، به‌طور مستقیم شمارش گردید و سپس تعداد زواسپور در یک میلی‌لیتر مایع شکمبه محاسبه شد.

مدل آماری طرح: داده‌های بدست آمده از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش فاکتوریل تجزیه و تحلیل گردید. با توجه به اینکه بین دام‌های مورد استفاده در هر نژاد، تفاوت فردی مشاهده نگردید، اثر دام در مدل در نظر گرفته نشد. مدل آماری طرح به شرح زیر می‌باشد:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\delta_{ik} + \beta\delta_{jk} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \xi_{ijk}$$

X_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین، α_i اثر جیره غذایی، β_j اثر نژاد، δ_k اثر منطقه، $\alpha\beta_{ij}$ اثر متقابل جیره \times نژاد، $\alpha\delta_{ik}$ اثر متقابل جیره \times منطقه، $\beta\delta_{jk}$ اثر متقابل نژاد \times منطقه، $\alpha\beta\delta_{ijk}$ اثر متقابل نژاد \times منطقه \times جیره و ξ_{ijk} خطای آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

همان‌گونه‌که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، اگرچه با مصرف علف خشک یونجه، علف خشکنی یا کاه گندم، تفاوت معنی‌داری در تراکم جمعیت باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه بین سه گروه گاوهای سیستانی زابل، سیستانی کرج و هولشتاین وجود نداشت، ولی با مصرف علف خشک یونجه، جمعیت باکتری‌ها در گاوهای هولشتاین ($10^{11} \times 1/423$) بیشتر از گاوهای سیستانی زابل ($10^{11} \times 1/367$) و سیستانی کرج ($10^{11} \times 1/298$) بود اما تفاوت معنی‌دار نبود. با مصرف علف خشک نی، جمعیت باکتری‌ها در گاوهای هولشتاین ($10^{11} \times 1/089$) کمتر از گاوهای سیستانی زابل ($10^{11} \times 1/193$) و سیستانی کرج ($10^{11} \times 1/423$) بود. با مصرف کاه گندم نیز اگرچه جمعیت باکتری‌ها در گاوهای هولشتاین ($10^{11} \times 9/1$) کمتر از گاوهای سیستانی زابل ($10^{11} \times 10/28$) و سیستانی کرج ($10^{11} \times 10/19$) بود، اما تفاوت بین گروه‌ها معنی‌دار نبود.

عوامل متعددی در استقرار و توسعه جمعیت‌های میکروبی در شکمبه موثر می‌باشند. این عوامل عمدتاً به حیوان میزبان و جیره غذایی (ترکیب جیره، تعداد دفعات غذا خوردن، مواد افزودنی، شکل عرضه خوراک و ...)

جدول شماره ۱ ترکیب خوراک مورد استفاده (درصد در ماده خشک)

خوراک	ماده خشک	پروتئین خام	دیواره سلولی	دیواره سلولی بدون همی سلولز	لیگنین	چربی خام	کلسیم	فسفر	خاکستر
علف یونجه	۹۲/۰	۱۴/۹۴	۵۲/۷۰	۳۷/۳۰	۱۰/۲۰	۲/۰۰	۱/۲۵	۰/۲۲	۱۰/۰۰
علف نی	۹۴/۵	۷/۴۰	۷۳/۰۵	۴۳/۰۵	۹/۵۵	۱/۴۴	۰/۴۰	۰/۰۷	۱۰/۵۰
کاه گندم	۹۳/۰	۳/۵۷	۸۸/۳۳	۵۲/۰۴	۱۴/۰۰	۱/۸۰	۰/۳۰	۰/۰۷	۷/۸۰

مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر، که تراکم کل باکتری‌های زنده را در حیوانات مختلف تغذیه شده با جیره‌های پر علوفه یا پر کنسانتره مقایسه نموده‌اند، نشان می‌دهند که به‌طور کلی تراکم باکتری‌ها، در حیوانات تغذیه شده با جیره کنسانتره‌ای بیشتر است. به‌عبارت دیگر تراکم باکتری‌ها، با افزایش انرژی قابل دسترس جیره، افزایش می‌یابد. حجم شکمبه نیز می‌تواند به وسیله نوع خوراک مصرفی تحت تاثیر قرار گیرد (۸، ۲۳، ۳۱).

تعداد معدودی گزارش نیز وجود دارد که با مصرف جیره پر علوفه یا پر کنسانتره، تعداد باکتری‌ها یا مساوی بوده و یا حتی در بعضی موارد در دام‌های تغذیه شده با جیره پرعلوفه، تراکم بیشتر بوده است. تفاوت‌هایی مانند اثر نسبت کنسانتره جیره، دفعات غذا خوردن، زمان نمونه‌گیری و تفاوت‌های فردی بین حیوانات، همگی می‌توانند تراکم باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار داده و مقایسه را مشکل کنند (۱۳).

به‌طور کلی افزایش جمعیت باکتری‌ها، متناسب با بهبود مواد مغذی محتوی جیره، که توسط محققین مختلف (۶، ۸، ۱۳، ۲۳، ۳۱) گزارش گردیده با افزایش تراکم باکتری‌ها در گاوهای تغذیه شده با کاه گندم، علف خشک نی و علف خشک یونجه در تحقیق حاضر همخوانی دارد. به‌طوری‌که وقتی گاوها با علف خشکی یونجه تغذیه شدند، تعداد کل باکتری‌ها ($10^{11} \times 1/363$) در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه بالاترین تراکم را در بین سه جیره غذایی داشت، با مصرف علف خشک نی ($10^{11} \times 1/142$) در مقایسه با علف یونجه، تراکم کل باکتری‌ها کاهش پیدا کرد و با مصرف کاه گندم کمترین تراکم باکتری‌ها ($10^{11} \times 0/986$) در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه مشاهده گردید ($p < 0/05$).

بررسی تغییرات شبانه‌روزی تعداد کل باکتری‌های شکمبه با مصرف جیره‌های مختلف نشان داد که تا حدود ۴ ساعت پس از مصرف خوراک وعده صبح، تراکم باکتری‌های شکمبه کاهش پیدا کرد و سپس شروع به افزایش نمود و تا هنگام مصرف وعده دوم خوراک (در ساعت ۱۶) این روند افزایشی همچنان ادامه داشت. به دنبال مصرف وعده دوم خوراک مجدداً کاهش در تراکم باکتری‌ها مشاهده گردید و از ۴ ساعت پس از وعده دوم خوراک (۱۲ ساعت پس از وعده اول خوراک)، تراکم تا هنگام مصرف وعده بعدی خوراک، افزایش تدریجی را نشان می‌دهد. بیشترین نوسان در دامنه تغییرات شبانه‌روزی تراکم باکتری‌های شکمبه، در هنگام

و همچنین ماهیت و روابط بین جمعیت‌های میکروبی مختلف (رقابت، همکاری^۲، خنثی‌سازی^۴، اثر متقابل گونه‌ها بر یکدیگر^۵، شکار کردن^۶ و همچنین فیزیولوژی گونه‌های مختلف (حداکثر سرعت رشد، سوپسترای مورد استفاده، متابولیسم انرژی، مقاوم بودن به pH اسیدی و مواد سمی و توانایی چسبیدن به ذرات گیاهی...) مربوط می‌شود (۲۹، ۳۰).

جدول شماره ۲ - اجزای محیط کشت جهت رشد باکتری‌های شکمبه

اجزاء محیط کشت	درصد در محیط کشت
Mineral Solution I* (V/V)	۱۵
Mineral Solution II ** (V/V)	۱۵
Resazurin ۰/۱% (V/V)	۰/۱
Rumen Fluid*** (V/V)	۴۰
Distilled Water (V/V)	۲۳/۷
Glucose (W/V)	۰/۱
Cellobiose (W/V)	۰/۱
Maltose (W/V)	۰/۱
Xylose (W/V)	۰/۱
Cellose Suspension ۳% (V/V)	۰/۷۵
Hemin Solution ۰/۱% (V/V)	۰/۱
Trypticase (W/V)	۰/۲
Yeast Extract (W/V)	۰/۰۵
VFA Mixture**** (V/V)	۰/۴۵
Cystein-HCl - Water ۳% (V/V)	۱/۶۷
Sodium Carbonate Solution ۱۲% (V/V)	۳/۳۳

* محلول مواد معدنی شماره I: شامل ۳ گرم دی‌پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) در یک لیتر آب مقطر.

** محلول مواد معدنی شماره II: شامل ۳ گرم مونوپتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، و ۶ گرم کلرور سدیم ($NaCl$)، ۰/۶ گرم سولفات منیزیم ($MgSO_4$) و ۰/۶ گرم کلرور کلسیم ($CaCl_2$) و ۶ گرم سولفات آمونیوم ($(NH_4)_2SO_4$) در یک لیتر آب مقطر.

*** مخلوط مایع شکمبه به نسبت مساوی از ۳ رأس گاو سیستانی و ۳ رأس گاو هولشتاین تهیه، صاف و ۱۰ دقیقه در $1000 \times$ سانتریفوژ شد.

**** مخلوط اسیدهای چرب فرار: شامل اسیدهای استیک (۱۷ میلی‌لیتر)، پروپیونیک (۶ میلی‌لیتر)، بوتیریک (۴ میلی‌لیتر)، ایزوبوتیریک (۱ میلی‌لیتر)، n والریک (۱ میلی‌لیتر)، ایزوالریک (۱ میلی‌لیتر) و آلفا متیل - بوتیریک اسید (۱ میلی‌لیتر).

جدول شماره ۳- تعداد کل باکتری‌ها ($10^{11} \times$)، کل تک یاخته‌ها ($10^4 \times$) و تک یاخته‌های هولوتریج ($10^2 \times$) در هر میلی لیتر مایع شکمبه در گروه‌های مختلف با مصرف علوفه متفاوت ($SE \pm X$)

متغیرها	گروه	تعداد نمونه	کل باکتری‌ها	کل تک یاخته‌ها	تک یاخته‌های هولوتریج
بین نژادها	سیستانی	۱۰۸	$1/135 \pm 0/85$	$b 3/35 \pm 0/15$	$b 4/213 \pm 0/35$
	هولشتاین	۵۴	$1/141 \pm 1/14$	$a 2/41 \pm 0/13$	$a 1/968 \pm 0/30$
بین گروه‌ها	زابل	۵۴	$1/196 \pm 1/13$	$b 3/77 \pm 0/23$	$b 5/674 \pm 0/55$
	کرج	۵۴	$1/153 \pm 1/27$	$a 2/93 \pm 0/17$	$a 2/752 \pm 0/33$
	هولشتاین	۵۴	$1/141 \pm 1/14$	$a 2/41 \pm 0/13$	$a 1/968 \pm 0/30$
	یونجه	۵۴	$b 1/363 \pm 1/18$	$b 3/95 \pm 0/21$	$b 4/937 \pm 0/45$
بین جیره‌ها	نی	۵۴	$b 1/142 \pm 1/21$	$a 2/76 \pm 0/16$	$a 3/194 \pm 0/50$
	کاه گندم	۵۴	$a 0/986 \pm 1/10$	$a 2/40 \pm 0/15$	$a 2/262 \pm 0/35$
	سیستانی	۳۶	$1/322 \pm 1/46$	$b 4/45 \pm 0/31$	$b 5/798 \pm 0/50$
یونجه	هولشتاین	۱۸	$1/423 \pm 2/04$	$a 2/96 \pm 0/25$	$a 3/216 \pm 0/77$
	زابل	۱۸	$1/367 \pm 1/92$	$b 5/19 \pm 0/40$	$b 7/470 \pm 0/55$
	کرج	۱۸	$1/298 \pm 2/26$	$a 3/71 \pm 0/26$	$a 4/126 \pm 0/64$
	هولشتاین	۱۸	$1/423 \pm 2/04$	$a 2/96 \pm 0/25$	$a 3/216 \pm 0/77$
علف نی	سیستانی	۳۶	$1/168 \pm 1/49$	$3/00 \pm 0/21$	$b 3/960 \pm 0/73$
	هولشتاین	۱۸	$1/089 \pm 2/15$	$2/28 \pm 0/24$	$a 1/660 \pm 0/22$
	زابل	۱۸	$1/193 \pm 2/19$	$3/10 \pm 0/23$	$b 5/429 \pm 1/23$
کاه گندم	کرج	۱۸	$1/143 \pm 2/07$	$2/90 \pm 0/36$	$a 2/492 \pm 0/59$
	هولشتاین	۱۸	$1/089 \pm 2/15$	$2/28 \pm 0/24$	$a 1/660 \pm 0/22$
	سیستانی	۳۶	$1/023 \pm 1/45$	$b 2/60 \pm 0/15$	$b 2/880 \pm 0/48$
بین نژادها	هولشتاین	۱۸	$0/910 \pm 1/61$	$a 2/00 \pm 0/30$	$a 1/027 \pm 0/23$
	زابل	۱۸	$1/028 \pm 1/77$	$b 3/03 \pm 0/34$	$b 4/123 \pm 0/84$
	کرج	۱۸	$1/019 \pm 2/34$	$a 2/17 \pm 0/17$	$a 1/637 \pm 0/30$
	هولشتاین	۱۸	$0/910 \pm 1/61$	$a 2/00 \pm 0/20$	$a 1/027 \pm 0/23$

در هر ستون در هر دسته، حروف غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین صفات می‌باشد

جدول شماره ۴ - تراکم زواسپور قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه ($10^2 \times$) در هر میلی لیتر مایع شکمبه بین گروه‌ها با مصرف خوراک‌های مختلف ($SE \pm X$)

گروه / نژاد	تعداد نمونه	علف یونجه	علف نی	کاه گندم
نژاد سیستانی	۳۶	$41/75 \pm 10/75$	$64/91 \pm 15/75$	$139/70 \pm 31/50$
نژاد هولشتاین	۱۸	$44/50 \pm 11/65$	$55/23 \pm 8/25$	$127/36 \pm 15/70$
سیستانی زابل	۱۸	$39/80 \pm 14/50$	$68/08 \pm 19/20$	$135/67 \pm 27/60$
سیستانی کرج	۱۸	$43/35 \pm 8/20$	$61/75 \pm 12/30$	$143/74 \pm 35/40$
هولشتاین	۱۸	$44/50 \pm 11/65$	$55/23 \pm 8/25$	$127/36 \pm 15/70$
کل	۵۴	$42/55 \pm 10/35$	$61/20 \pm 1/35$	$135/59 \pm 24/30$

یونجه تعداد تک یاخته‌ها در هر میلی لیتر از مایع شکمبه گاوهای سیستانی زابل ($10^4 \times 5/19$)، بیشتر از گاوهای سیستانی کرج ($10^4 \times 3/71$) و گاوهای هولشتاین ($10^4 \times 2/96$) بود، اختلاف تراکم کل تک یاخته‌ها در گاوهای سیستانی زابل با دو گروه دیگر معنی دار بود ($p < 0/05$). با مصرف علف‌نی، تفاوتی بین جمعیت تک یاخته‌ها در گروه‌های مختلف مشاهده نگردید. با تغذیه کاه گندم نیز تراکم جمعیت کل تک یاخته‌ها در گاوهای سیستانی زابل ($10^4 \times 3/03$)، بیشتر از گاو سیستانی کرج ($10^4 \times 2/17$) و هولشتاین ($10^4 \times 2$) بود ($p < 0/05$).

تعداد گونه و تراکم تک یاخته‌ها می‌تواند بین حیوانات یک گونه از نشخوارکنندگان و همچنین بین گونه‌های مختلف متفاوت باشد. یک عامل مؤثر در این مورد، موقعیت جغرافیایی می‌تواند باشد، که احتمالاً انعکاسی از جیره حیوان، منشأ حیوان و ایزوله بودن احتمالی آن از دیگر نشخوارکنندگان است. خصوصیات ویژه تک یاخته‌های شکمبه و همچنین تضاد بین گونه‌های تک یاخته‌ها نیز ممکن است در این تنوع نقش داشته باشد (۱۳).

با توجه به اینکه جمعیت تک یاخته‌ها در گاوهای سیستانی زابل، با تغذیه از هر سه ماده خوراکی، بیشتر از گاوهای هولشتاین و حتی گاوهای سیستانی کرج می‌باشد، از آنجایی که شرایط تغذیه‌ای برای هر سه گروه مشابه بود، به نظر می‌رسد که بالاتر بودن جمعیت تک یاخته‌ها در گاوهای سیستانی زابل، احتمالاً ناشی از اثر عوامل جغرافیایی خاص منطقه زابل باشد.

دام، بوسیله فاکتورهای فیزیولوژیکی ناشناخته‌ای می‌تواند روی جنس و گونه‌های تک یاخته‌هایی که در شکمبه استقرار پیدا می‌کنند، اثر بگذارد. از جمله این فاکتورها می‌توان مقدار و نوع خوراک مصرفی، سرعت خوردن خوراک، میزان تولید بزاق (که می‌تواند pH شکمبه را تحت تاثیر قرار دهد)، سرعت تخمیر، فشار اسمزی و زمان روگشت^۷ مایعات و ذرات در شکمبه را نام برد (۱۳).

تغییرات شبانه‌روزی جمعیت تک یاخته‌های هولوتریج، با جمعیت کل تک یاخته‌ها و باکتری‌های شکمبه متفاوت بود، به طوری که پس از مصرف خوراک وعده صبح، تعداد باکتری‌های هولوتریج افزایش پیدا کرد و در فاصله ۴ تا ۸ ساعت پس از مصرف خوراک وعده صبح، روند کاهشی داشته و با مصرف وعده بعدی خوراک، مجدداً افزایش و متعاقب آن کاهش یافت.

Abe و همکاران (۲) با مشاهده میکروسکوپی دیواره داخلی شکمبه و نگاری پیشنهاد نمودند که هولوتریج‌ها چند ساعت پس از مصرف خوراک به دیواره شکمبه چسبیده و متوقف^۸ می‌شوند و در زمان مصرف خوراک بعدی، دوباره به داخل شکمبه مهاجرت می‌کنند. این محققین پیشنهاد نمودند که این مهاجرت در زمان غذا خوردن می‌تواند یک پاسخ شیمیایی^۹ به قندهای محلول خوراک تازه وارد شده به شکمبه باشد. این محققین همچنین نشان دادند که مقدار خوراک و عمل بلعیدن خوراک می‌تواند محرک‌های دیگری برای مهاجرت هولوتریج‌ها باشد.

داده‌های گزارش شده توسط Warner (۳۳) و Dehority (۷) حاکی از آن است که اگرچه تراکم هولوتریج‌ها قبل از غذا خوردن شروع به افزایش می‌کند، افزایش دیگری هم بعد از غذا خوردن وجود دارد. که احتمالاً به دلیل پاسخ شیمیایی به خوراک وارد شده به شکمبه می‌باشد و این امر توسط Dehority و همکاران (۸) نیز نشان داده شده است. افزایش جمعیت

مصرف علف خشک یونجه مشاهده گردید. روند تغییرات شبانه روزی جمعیت باکتری‌ها با گزارش دیگر محققین (۸، ۳۰) همخوانی دارد.

مقایسه تراکم تک یاخته‌ها با مصرف جیره‌های مختلف (جدول ۳) نشان داد که تراکم کل تک یاخته‌ها با مصرف علف خشک یونجه ($10^4 \times 3/95$)، تفاوت قابل توجهی با تراکم آنها در هنگام مصرف علف خشک نی ($10^4 \times 2/76$) یا کاه گندم ($10^4 \times 2/4$) داشت ($p < 0/05$). از طرف دیگر در سه گروه دام با مصرف کاه گندم، علف خشک نی و علف یونجه جمعیت تک یاخته‌ها در هر میلی لیتر مایع شکمبه (به ترتیب $10^4 \times 2/4$ ، $10^4 \times 2/76$ و $10^4 \times 3/95$) افزایش یافت.

همچنین جمعیت تک یاخته‌های هولوتریج بین دو نژاد تفاوت معنی داری را نشان داد و تعداد تک یاخته‌های هولوتریج، در هر میلی لیتر از مایع شکمبه، در گاوهای نژاد سیستانی ($10^3 \times 4/213$) بیشتر از نژاد هولشتاین ($10^3 \times 1/968$) بود ($p < 0/05$). بنابراین بین گروه‌های مختلف نیز تفاوت معنی دار می‌باشد، به طوری که بیشترین تراکم در گاوهای سیستانی زابل ($10^3 \times 5/674$) مشاهده گردید ($p < 0/05$).

مصرف جیره‌های غذایی مختلف نیز منجر به تغییر در تراکم تک یاخته‌های هولوتریج گردید. بیشترین تراکم تک یاخته‌های هولوتریج با مصرف علف خشک یونجه ($10^3 \times 4/937$) مشاهده شد که به طور معنی داری با تراکم آنها در هنگام مصرف علف خشک نی ($10^3 \times 3/194$) و کاه گندم ($10^3 \times 2/262$) متفاوت بود ($p < 0/05$). در هر سه گروه دام، بیشترین تراکم تک یاخته‌های هولوتریج با مصرف علف یونجه و کمترین تراکم با مصرف کاه گندم تعیین گردید.

مقدار انرژی قابل دسترس جیره اثر مهمی روی تعداد تک یاخته‌ها ($13,30$) و تک یاخته‌های هولوتریج (۵) دارد. با مصرف جیره غنی از کنسانتره یا جیره غنی از کربوهیدرات‌های محلول، تراکم جمعیت میکروبی در مقایسه با مصرف جیره غنی از علوفه بالاتر است. جمعیت تک یاخته‌ها در گاو تغذیه شده با علف و دانه جو، ۲ تا ۴ برابر بیشتر از گاو است که فقط با علوفه تغذیه شده باشد. با این حال وقتی جیره جو حبه شده به طور آزاد مورد تغذیه دام قرار می‌گیرد، جمعیت تک یاخته‌ها به طور کلی ناپدید می‌شود و فقط وقتی علوفه در جیره حیوان وارد شود، دوباره جمعیت تک یاخته ظاهر می‌گردد. بنابراین حضور کربوهیدرات‌های ساختمانی برای توسعه تک یاخته‌ها در شکمبه ضروری است (۳۰).

افزایش جمعیت تک یاخته‌های شکمبه متناسب با افزایش مواد مغذی محتوی خوراک‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر، با روند کلی افزایش جمعیت تک یاخته‌ها ناشی از افزایش انرژی جیره‌های غذایی همخوانی دارد.

روند تغییرات شبانه‌روزی تعداد تک یاخته‌ها (با دوبار تغذیه در روز) تقریباً مشابه تغییرات در جمعیت باکتری‌ها بود، به طوری که به دنبال مصرف خوراک، با رقیق شدن محتویات شکمبه، تراکم تک یاخته‌ها در مایعات شکمبه کاهش پیدا کرد و از حدود ۴ ساعت پس از مصرف خوراک تراکم آنها افزایش یافت. مجدداً با مصرف وعده دوم خوراک، تراکم تک یاخته‌ها کاهش یافته و از ۱۲ ساعت پس از مصرف وعده اول خوراک تراکم تک یاخته‌ها در مایعات شکمبه افزایش پیدا کرد و به تدریج به تراکم تک یاخته‌ها قبل از مصرف خوراک نزدیک شد.

همان گونه که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، با مصرف علف

توان هضمی مناسب‌تر گاوهای هولشتاین (*Bos taurus*) نسبت به گاوهای سیستانی (*Bos indicus*) تحت شرایط تغذیه‌ای مناسب بود. تراکم نسبتاً بالاتر جمعیت باکتری‌های شکمبه در گاو سیستانی با مصرف علف خشک نی و یا کاه گندم، در شرایطی که مواد مغذی به ویژه نیتروژن محتوی این خوراک‌ها برای تأمین فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه کافی نیست، می‌تواند نشان دهنده استعداد هضمی بهتر گاوهای سیستانی با مصرف خوراک‌های فقیر باشد. بالاتر بودن جمعیت تک‌یاخته‌ها نیز در گاوهای *Bos indicus* (حتی با مصرف علف یونجه)، ممکن است با غلظت بالای نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه ارتباط داشته باشد و به استعداد گاوهای سیستانی در بالاتر نگهداشتن غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه از طریق باز چرخ^۱ بیشتر نیتروژن اوره‌ای به شکمبه و تأمین نیتروژن کافی برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه مربوط باشد.

پاورقی‌ها

- 1 - *Phragmites australis*
- 2 - Most Probable Number
- 3 - Synergy
- 4 - Neutralism
- 5 - Amensalism
- 6 - Predation
- 7 - Turn over
- 8 - Sequestration
- 9 - Chemical response
- 10 - Recycle

منابع مورد استفاده

- ۱ - امینی ف. و ح. فضائی ۱۳۸۰؛ مقایسه چهار روش فیستول گذاری در گاو، گوسفند و بز. مجموعه مقالات سومین سمینار پژوهشی تغذیه دام و طیور کشور- موسسه تحقیقات علوم دامی کشور - کرج.
- 2- Abe, M., T. Iriki, N. Tobe, and H. Shibui. 1981; Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Applied & Environmental Microbiology* 19: 758-765.
- 3- Akin, D. E., and W. S. Borneman. 1990; Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science* 73: 3023-3032.
- 4- Bauchop, T., and T. J. Clarke. 1976; Attachment of the ciliate *epidinium crawley* to plant fragments in the sheep rumen. *Applied & Environmental Microbiology* 32: 417-422.
- 5- Dehority, B. A. 1963; Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from in vitro rumen fermentation. *Journal of Dairy Science* 46: 217-222.
- 6- Dehority, B. A. 1969; Pectin- fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. *Journal of General Microbiology* 99: 189-196.
- 7- Dehority, B. A. 1984; Evaluation of sub-sampling and

تک‌یاخته‌های هولوتریچ پس از مصرف خوراک در تحقیق حاضر با نتایج Stewart و Hobson (۱۳) همخوانی دارد. همچنین افزایش جمعیت تک‌یاخته‌های هولوتریچ همگام با افزایش کل تک‌یاخته‌ها به ترتیب با مصرف کاه گندم، علف خشک نی و علف خشک یونجه مطابق دارد.

همان‌گونه‌که در جدول ۴ ملاحظه می‌گردد، با مصرف علف یونجه، علف خشک نی و کاه گندم تفاوت معنی‌داری بین تراکم جمعیت قارچ‌های شکمبه گاوهای سیستانی کرج، سیستانی زابل و هولشتاین و بطور کلی بین دو نژاد سیستانی و هولشتاین مشاهده نگردید اما بیشترین تراکم جمعیت زواسپور قارچ‌ها با مصرف کاه گندم مشاهده شد. به‌طوری‌که جمعیت زواسپور قارچ‌ها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه با مصرف کاه گندم ($1.0^2 \times 135/59$) بیشتر از علف نی ($1.0^3 \times 61/2$) و علف یونجه ($1.0^2 \times 42/55$) بود ($p < 0.05$).

به عقیده Stewart و Habson (۱۳) بعضی از جیره‌ها برای استقرار قارچ‌های شکمبه مطلوب‌تر هستند. جیره‌های غنی از علوفه خشبی مثل کاه یا مواد سیلو شده یا جیره‌های بر اساس مواد سیلو شده، که مدت زمان ماندگاری آنها در شکمبه زیاد است، منجر به توسعه جمعیت متراکمی از قارچ‌های بی‌هوازی می‌شوند. زیرا قارچ‌های بی‌هوازی معمولاً به بافت‌های خیلی لیگنینی شده متصل می‌شوند و در جیره‌های پلیت شده که عبور آنها از شکمبه سریع‌تر است، سرعت شسته شدن قارچ‌ها از شکمبه هم زیاد شده و تراکم قارچ‌ها کاهش پیدا می‌کند. اگر کاه نیز خیلی ریز آسیاب شود یا به صورت پلیت خورنده شود یا به همراه آن مکمل کنسانترهای که حاوی کربوهیدرات‌های محلول باشد به دام‌خورنده شود، تراکم قارچ‌ها کاهش می‌یابد.

تحقیقات Bauchop (۴) نیز بیانگر آن است که جیره غذایی تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی جمعیت قارچ‌ها دارد، مصرف جیره‌های الیافی در مقایسه با جیره‌های حاوی برگ علوفه‌ها، شرایط بهتری را برای رشد قارچ‌ها فراهم می‌کند. ترکیبات گیاه، تولید زواسپورها را تحریک کرده و منجر به افزایش جمعیت آنها می‌شود. تأثیر جیره بر روی جمعیت قارچ‌ها یا ناشی از اثرات مستقیم مانند تأمین عامل رشد قارچ‌ها، یا به دلیل اثرات غیر مستقیم مثل رقابت میکروارگانیسم‌ها با یکدیگر است.

در تحقیق حاضر تراکم زواسپور قارچ‌ها در ساعات مختلف پس از مصرف خوراک نسبتاً یکنواخت بود. Rezaeian (۲۷) نیز تغییرات قابل توجهی در کیتین محتوی نمونه‌های بخش مایع و جامد شکمبه در طول ۲۴ ساعت، مشاهده نکرد. یکنواختی در غلظت کیتین محتویات شکمبه بیانگر آن است که در یک جیره غذایی خاص، میزان کیتین در شکمبه در زمان‌های مختلف پس از مصرف خوراک، تغییر معنی‌داری پیدا نمی‌کند.

Obispo و Dehority (۱۹) نیز دریافتند تراکم قارچ‌های شکمبه در یک دوره ۲۴ ساعته نسبتاً ثابت می‌ماند. به‌علاوه تراکم قارچ‌ها به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر دفعات مصرف خوراک (۱ تا ۳ بار در روز) قرار نمی‌گیرد. نتایج تحقیق حاضر با گزارش Rezaeian (۲۷) و Obispo و Dehority (۱۹) و دیگر محققین (۳، ۱۰، ۱۱، ۱۸) همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

با مصرف سه نوع مختلف خوراک، در تراکم جمعیت قارچ‌ها بین دو نژاد تفاوتی مشاهده نگردید، اما تراکم نسبتاً بالاتر جمعیت باکتری‌های شکمبه با مصرف علف یونجه در گاوهای هولشتاین، بیانگر عملکرد بهتر و

- fixation procedure used for counting rumen protozoa. *Applied & Environmental Microbiology* 48: 182-185.
- 8- Dehority, B. A., P. A. Tirabasso and A. P. Grifo. 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.
- 9- Fonty, G., and Ph. Gout. 1989; Establishment of microbial populations in the rumen. Utilization of an animal model to study the role of the different cellulolytic microorganisms in vivo. In: *The role of protozoa and fungi in ruminant digestion.* (Nolan, J. V., R. A. Leng and D. I. Demeyer, editors). Armidale NSW 2351, Australia: Penambul Books.
- 10- Grenet, E., A. Breton, P. Barry, and G. Fonty. 1989; Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Animal feed Science and Technology* 26: 55-70.
- 11- Grenet, E., and P. Barry. 1988. Colonization of thick-walled plant tissues by anaerobic fungi. *Animal feed Science and Technology* 19: 25-31.
- 12- Hidayat, H. K., C. J. Newbold, C. S. Stewart. 1993; The contribution of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation *in vitro* as determined by microbial gas production. *Animal Feed Science and Technology* 42: 193-208.
- 13- Hobson, P. N., and C. S. Stewart. 1997; *The rumen microbial ecosystem.* Chapman & Hall . London.
- 14- Hopson, J. D., R. R. Johnson, and B. Dehority. 1963; Evaluation of the dacron bag technique as a method for measuring cellulose digestibility and rate of forage digestion. *Journal of Animal Science* 22: 448-453.
- 15- Huhtanen, P., and H. Khalili. 1992; The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethyl cellulase and xylanase activities in cattle given grass silage based diets. *British Journal of Nutrition* 67: 245-255.
- 16- Hungate, R. E., G. D. Phillips, and A. McGregor. 1960; A comparison of the rumen fermentation in European and Zebu cattle. *Journal of Agriculture Science* 54: 196-201.
- 17- Hungate, R. E. 1966; *The rumen and its microbes.* Academic Press Inc., New York.
- 18- Lowe, S. E., G. G. Griff, A. Milne, M. K. Theodorou, and A. P. J. Trinci. 1987; Life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *Journal of General Microbiology* 133: 1829-1834.
- 19- Obispo, N. E., and B. A. Dehority. 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.
- 20- Orpin, C. G. 1983/84; The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology* 10: 121-143.
- 21- Orskov, E. R. 1992; *Protein nutrition in ruminants.* Second edition, Academic Press.
- 22- Orskov, E. R., I. Ojwang, and G. W. Reid. 1988; A study on consistency of differences between cows in rumen outflow rate of fibrous particles and other substrate and consequences for digestibility and intake of roughage. *Animal Production* 47: 45-51.
- 23- Orskov, E. R., and M. Ryle. 1990; *Energy nutrition in ruminants.* Elsevier Applied Science, London.
- 24- Ortolani, E. L., and C. Takimoto. 1987; Comparative study of the rumen fauna in *Bos taurus*, *Bos indicus*, and crossbreeds. Quantitative aspects. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria-e- Zootecnia.* 39: 81-91.
- 25- Owens, F. N., and C. F. Hanson. 1992; External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of Dairy Science* 75: 2605-2614.
- 26- Preston, T. R., 1995; *Tropical Animal Feeding.* F. A. O. Animal Production and Health Paper, No 126.
- 27- Rezaeian, M., 1996; Assessment and distribution of anaerobic fungi in the ruminant gut. Ph.D. Thesis, University of Newcastle.
- 28- Russell. J.B., 1986; Ecology of rumen microorganism: Energy use, In: *Aspect of digestive physiology in ruminants.* (Dabson, A., and M. J. Dobson, eds.), Comstock publishing association, London.
- 29- Russell. J.B., H.J. Strovel, and G. Chen. 1988; Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied & Environmental Microbiology* 54: 872-877.
- 30- Srivastava, R. V. N., and M. I. Chaturvedi. 1973; Study on the rumen microbes of cattle and buffalo. *Indian Journal of Animal Science* 43: 615-617.
- 31- Thorley, C. M., M. E. Sharpe, and M. P. Bryant, 1968; Modification of rumen bacterial flora by feeding cattle ground and pelted roughage as determined with culture media with and without rumen fluid. *Journal of Dairy Science* 51: 1811-1816.
- 32- Van Soest, P. J., 1994; *Nutritional ecology of the ruminant.* Cornell University Press, Ithaca, NY.
- 33- Warner, A. C. I., 1966; Diurnal changes in concentration of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets once daily. *Journal of General Microbiology* 45: 213-235.